



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

**Análisis de control de preparados farmacéuticos mediante
técnicas analíticas de espectroscopía vibracional**

Diego Alonso Gómez Salazar

TESIS DOCTORAL

PROGRAMA DE DOCTORADO EN QUÍMICA

Directores: Santiago Maspoch Andrés y Jordi Coello Bonilla

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

FACULTAD DE CIENCIAS

2017

Memoria presentada para aspirar al grado de doctor por **Diego Alonso Gómez Salazar**

Diego Alonso Gómez Salazar

VºBº,

Prof. Santiago Maspoch

Prof. Jordi Coello

Bellaterra, 23 de junio de 2017

RESUMEN

La tendencia actual en el control de calidad farmacéutico va dirigida hacia que los fabricantes tengan un mayor entendimiento del proceso de manufactura, de forma que la calidad del producto se construya a lo largo del proceso de fabricación y no sea algo que se evalúa durante la validación del proceso de manufactura, y luego en los análisis de rutina en los cuales se examina un número limitado de unidades del producto terminado. El número de parámetros que deben tenerse bajo control es tan elevado que no es factible realizar métodos que requieran la extracción de una cantidad del material, y seguidamente analizarlo siguiendo un procedimiento de varios pasos. En este contexto, las técnicas espectroscópicas tales como el infrarrojo cercano (NIR) y la espectroscopía Raman son herramientas analíticas adecuadas para realizar el control de las diferentes etapas de la manufactura, así como de los productos terminados (este último control siempre debe hacerse).

Existen diferentes formas farmacéuticas sólidas de las cuales las más comunes son los comprimidos, y esta forma de administración oral fue el material objeto de estudio de los diferentes proyectos que se realizaron como parte de esta tesis doctoral. La idoneidad de las técnicas espectroscópicas mencionadas anteriormente fue demostrada en varios estudios, y de hecho actualmente hay una amplia gama de instrumentos disponibles a nivel comercial que pueden ser contemplados por los fabricantes de medicamentos, para el desarrollo de métodos de análisis basados en estas técnicas. Una gran ventaja de estas técnicas es que el análisis es no destructivo y el tiempo de registro del(los) espectro(s) es mucho menor en comparación a un método tradicional por cromatografía líquida. En este último, generalmente se procesa el comprimido completo, mientras que en las técnicas espectroscópicas lo que se conoce *a priori* es el área de irradiación, pero poco se puede predecir respecto a la profundidad de la cual se va a obtener el espectro.

A lo largo de la tesis doctoral cuya memoria se presenta, se realizaron varios proyectos en los que se quiso determinar el impacto del error de muestreo al seguir prácticas de registro de espectros que pueden considerarse comunes y viables en términos prácticos. El factor 'tiempo de registro' siempre se tuvo en cuenta. En ninguna de las mediciones realizadas, se propuso una estrategia de registro que implicara más de 5 min para el análisis de cada unidad de dosificación. 5 min está claramente por debajo del tiempo requerido para un análisis destructivo por HPLC. Los experimentos se realizaron mediante espectroscopia Raman y NIR (principalmente con la primera técnica), y aunque la

interacción de la radiación de excitación con los materiales es diferente en cada caso (dispersión de la radiación, y absorción de radiación en Raman y NIR, respectivamente), las propiedades físicas de los materiales impactan significativamente en la respuesta obtenida. En este sentido se realizó un estudio específico sobre la evolución de las intensidades Raman con el tamaño de partícula. Hay varios trabajos publicados en los que se han reportado distintas tendencias, como resultado de la medición de varias fracciones con distintos tamaños de partícula de un mismo material, y además existen predicciones teóricas al respecto que son específicas para la espectroscopia Raman desde finales de los años 1960. Los resultados encontrados en nuestros experimentos se acompañan de una discusión sobre los motivos que podrían estar detrás de las tendencias reportadas en otros trabajos, dado que existen algunas contradicciones entre algunos de ellos. Estas mediciones se hicieron con un compuesto puro molturado y tamizado en diferentes fracciones, y estas fracciones que contienen partículas de composición homogénea también se utilizaron para realizar un primer estudio sobre el muestreo de un material homogéneo usando espectroscopia Raman. La Teoría de Muestreo predice que el análisis de este tipo de material está libre de problemas relacionados con el muestreo, sin embargo se verá que los espectros obtenidos en cada posición donde se hace una irradiación tienen cierta dispersión inicial. Se explicará el origen de esta dispersión y la contribución que la quimiometría puede hacer al respecto, concretamente a través de las herramientas que constituyen los pretratamientos espectrales.

En orden de complejidad creciente, las mezclas binarias constituyen un material típico en estudios de Teoría de Muestreo, y como parte de esta tesis se realizaron una serie de experimentos en los que se evaluó una estrategia de registro de espectros por mapeo que está dentro del límite de los 5 min mencionados anteriormente, para el análisis de comprimidos hipotéticos que se acercan o están en el límite de la dosis baja. Comúnmente cuando se habla de "situaciones límite" en los análisis que utilizan técnicas espectroscópicas, se hace mención del bajo porcentaje en peso en el cual se encuentra el compuesto que se está analizando. Por tanto, en otro de los trabajos realizados como parte de esta tesis se puso a prueba este concepto para la irradiación mediante un láser que ocurre en las mediciones por espectroscopía Raman, y con este fin se prepararon dos familias de comprimidos constituidos por dos componentes, los cuales tienen un mismo excipiente en común pero distinto supuesto API. El compuesto que corresponde al API es el más activo en Raman, y en cada familia de comprimidos se añadió en la misma proporción en masa, pero cada uno de los supuestos API's tiene un tamaño de partícula diferente (anteriormente se habló de familia de comprimidos porque se prepararon mezclas que contienen distintos porcentajes en peso del API). Los experimentos planteados dieron lugar a una serie de comparaciones, y como se demostrará en ese

trabajo, los resultados no fueron los mismos para cada familia de comprimidos. El impacto de la calidad de los espectros, la cual se midió a través de su relación señal-ruido, también se evaluó respecto a la capacidad de extraer información que se puede hacer de ellos.

Finalmente todos los hallazgos encontrados en el análisis del material de composición homogénea y en las mezclas binarias, se utilizaron para un estudio comparativo realizado con 4 espectrómetros Raman (los cuales operaban en modo retrodispersión o transmisión), y un instrumento NIR con el que se realizaron mediciones por reflectancia difusa y transmitancia, en el cual se desarrollaron diferentes modelos de calibración para el análisis cuantitativo de dos medicamentos de baja dosificación. Los resultados obtenidos son la suma de las diferencias debidas a la naturaleza intrínseca de las mediciones en modo retrodispersión y transmisión, de las diferentes áreas irradiadas, y de las dimensiones de los distintos comprimidos con los cuales se prepararon los conjuntos de calibración, y de los comprimidos que fueron analizados cuantitativamente. Todos estos factores tienen que ver con la cantidad de material muestreado, y con todo lo relacionado con la calidad de los espectros luego de la selección de ciertos parámetros de adquisición. Posteriormente se utilizaron los valores determinados por las técnicas espectroscópicas para evaluar el contenido de ingrediente activo de los comprimidos analizados, de acuerdo a la prueba que actualmente está incluida en la Farmacopea Europea y la Farmacopea de los Estados Unidos.

En adición, uno de los comprimidos comerciales que se investigó posee unas ranuras grabadas en una de sus caras, las cuales en la práctica se usan para obtener dosis de menor concentración (ya sea mitad o cuarto de comprimido). En realidad los dos medicamentos que se analizaron en el estudio comparativo mencionado en el párrafo anterior, también se estudiaron en el primer trabajo realizado durante el periodo de tesis. Este trabajo se encuentra publicado, y del producto que tiene las ranuras debe mencionarse que al momento del primer trabajo, en su ficha técnica no se mencionaba nada sobre la funcionalidad de esta. Sin embargo para el segundo conjunto de comprimidos que se estudió, ahora el fabricante aclara que la ranura únicamente sirve para facilitar la deglución y no para obtener dosis iguales. La FDA publicó en 2013 una guía específica sobre comprimidos ranurados, en la cual se propone una estrategia para la evaluación de los posibles fragmentos que se pueden obtener luego de su división; y a pesar de que ahora el fabricante aclara que no debe usarse la marca para obtener dosis menores, como parte de los trabajos realizados se propone el uso de la espectroscopía Raman como técnica para la determinación del contenido de API en estos posibles fragmentos de comprimido, evidentemente haciendo el análisis de forma no destructiva. Seguidamente los valores de contenido de API predichos para los posibles fragmentos se evaluaron siguiendo la guía de la FDA.

ABSTRACT

The current trend in pharmaceutical quality control is aimed at increasing manufacturers' understanding of the production process, so that the quality of the product is built throughout the manufacturing process, instead of being a characteristic that is evaluated during the validation of the manufacturing process, and afterwards in routine analysis by testing some few units of the ended product. The number of parameters to have under control is so high that it is not feasible to do analysis that require the extraction of an amount of the material and its subsequent processing in some steps. In this context, spectroscopic techniques such as near infrared (NIR) and Raman spectroscopy are excellent candidates to be the analytical tool for controlling the different stages of manufacture, as well as the ended products (this last check should always be done).

There are different solid pharmaceutical forms, however the most common are tablets and this kind of oral administration form was the material used for the different projects that were done along this thesis. The suitability of the aforementioned spectroscopic techniques has been demonstrated in several studies and currently there is a wide range of commercially available instruments that can be contemplated by a drug manufacturer who wants to develop a method of analysis based on these techniques. A great advantage of these techniques is that the analysis is non-destructive and the recording time of the spectrum(s) is much lower compared to a traditional procedure by liquid chromatography. In the latter, the whole tablet is usually processed, whereas in spectroscopic techniques what is known a priori is the irradiated area, but little can be predicted regarding the depth from which the spectrum will be obtained.

Throughout the doctoral thesis whose report is being presented, several projects were carried out in which the goal was to determine the impact of sampling error for several strategies for recording spectra that can be considered common and feasible in practical terms. The time required for acquiring spectra was always taken into account. None of the measurements performed involved more than 5 min for the analysis of each dosage unit. 5 min is clearly below the time required for HPLC destructive analysis. The experiments were performed both by Raman and NIR spectroscopy (mainly with the first technique), and even though the interaction of the excitation radiation with the materials is different in each case (scattering of radiation and absorption in Raman and NIR, respectively), the

physical properties of the materials have a significant impact on the response obtained. In this sense a specific study was made on the evolution of Raman intensities with particle size. There are several published works that have reported different trends as a result of these measurements, and in addition there are specific theoretical predictions for Raman spectroscopy since the late 1960s. The results found in our experiments are accompanied by a discussion on the reasons that could be behind the trends reported in other works, given that there are considerable contradictions among some of them. These measurements were made with a pure compound ground and sieved in different fractions, and these fractions of particles of homogeneous composition were also used to make a first study about sampling of a homogeneous material using Raman spectroscopy. The Theory of Sampling predicts that this type of material is considerably free of problems related to sampling, however as it will be shown, the measurements obtained at each position where a spectrum is recorded have some initial dispersion. The origin of this dispersion will be explained, as well as the contribution that chemometrics can do on this respect, specifically through the tools given by the spectral pretreatments.

Moving to a more complex situation, binary mixtures are a typical material in Theory of Sampling studies, and as part of this thesis a series of experiments were made that tested a strategy of recording of spectra that is within the limits of the 5 min mentioned above, for the analysis of hypothetical tablets that are approaching, or are at the limit of the low dosage. Commonly when referring to "limit situations" in the analyzes that use spectroscopic techniques, mention is made of the low percentage (in weight) that is being analyzed. Therefore, as part of this thesis another work was performed that tested this concept for Raman spectroscopy: two families of two-component tablets were prepared, and both have the same excipient in common, but not the supposed API. The latter is the most Raman active compound and was added in the same mass ratio, but each starting material has a different particle size (we mentioned 'families of tablets' because several mixtures were prepared that contain different API percentages in weight). Several comparisons were done, and as it will be demonstrated in that work the results were not the same for each family of tablets. The impact of the quality of the spectra, with a metric such as signal-to-noise ratio, was also evaluated with respect to the information that can be extracted.

Finally all the findings from the analysis of the homogeneous composition material, and from the binary mixtures experiments, were used for a comparative study carried out with 4 different Raman spectrometers, operating in backscatter or transmission mode, and a NIR instrument with which measurements were performed by diffuse reflectance and

transmittance, in which different calibration models were developed for the quantitative analysis of two low-dosage drugs. The results obtained are the sum of the differences due to the intrinsic nature of the backscatter and transmission mode measurements, different irradiation areas, and the dimensions of the different tablets that were used for the preparation of calibration sets, as well as from the tablets that were quantitatively analyzed. All these factors have to do with the amount of material sampled, and with everything related to the quality of the spectra acquired for a selected combination of parameters. Subsequently the values determined by the spectroscopic techniques were used to assess the active ingredient content per tablet according to the current test in the European Pharmacopoeia and the United States Pharmacopoeia.

In addition, one of the commercial tablets analyzed has grooves engraved on one of the faces, that in practice are used to obtain lower concentration doses (either half or quarter tablet). The two drugs analyzed in the comparative study mentioned above, were also investigated in a first study conducted during the thesis period. This work is already published, and regarding the product that has engraved marks should be mentioned that at the time of the first work, the Patient Information Leaflet did not indicate anything about the functionality of the marks. However, for the second set of products analyzed, the producer now indicates that the grooves only serve to facilitate swallowing and not to obtain equal doses. Regarding scored tablets, the FDA published a guide in 2013 for the assessment of the possible fragments that can be obtained after splitting, and although the manufacturer now clarifies that tablet grooves should not be used to obtain smaller doses, Raman spectroscopy was proposed as a technique for the determination of the content of API in these possible fragments of tablet. The predicted values were then evaluated following the guidance mentioned before.

OBJETIVOS

El objetivo general de la tesis fue traer los conceptos de la Teoría de Muestreo al análisis de comprimidos farmacéuticos mediante espectroscopía Raman y NIR. Dado que el análisis usando técnicas espectroscópicas es no destructivo, no puede afirmarse que cada unidad de dosis bajo análisis ha sido muestreada en su totalidad (como sí ocurre en un método por HPLC o UV); de manera que, a pesar de las ventajas de estas técnicas respecto a los métodos tradicionales (no se requieren disolventes, son rápidas y por ese motivo se pueden analizar más unidades, y son no destructivas), se abre a discusión la posibilidad de que hayan problemas debidos al submuestreo durante la irradiación de cada uno de los comprimidos.

Como objetivos específicos se pueden citar:

- la evaluación de una estrategia de mediciones por mapeo para el registro de comprimidos, usando un instrumento con un diámetro de irradiación considerablemente pequeño. Estos comprimidos podían estar constituidos por un material de composición homogénea, o estar preparados a partir de una mezcla de dos componentes.
- el estudio de la evolución de las intensidades Raman con el tamaño de partícula. Se hicieron experimentos con fracciones de distinto tamaño y se presentan los resultados obtenidos, pero en adición se hizo un análisis de los trabajos previos, en los cuales se han reportado entre ellos tendencias considerablemente diferentes.
- estudiar el efecto de la presión de compactación de distintos materiales puros en los espectros adquiridos.
- estimar la profundidad en el espesor de los comprimidos preparados con materiales puros a la cual las intensidades Raman dejan de crecer. Esto sirve para hacer una estimación del volumen muestreado, aunque en realidad todos los fotones se dispersan radialmente en el interior del material.
- el desarrollo de metodologías Raman y NIR para la determinación del contenido de ingrediente activo en comprimidos de baja concentración.
- demostrar la factibilidad de la espectroscopía Raman para la cuantificación del ingrediente activo en las posibles mitades o cuarto de comprimido que se pueden obtener luego de su división, y hacer el análisis en los comprimidos ranurados para los cuales se desarrollaron modelos de calibración.

Índice

CAPÍTULO 1. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA EN ESTUDIO. TEORÍA DEL MUESTREO. 1

1.1. CASO EN ESTUDIO: EL CONTROL DE CALIDAD DE LOS COMPRIMIDOS FARMACÉUTICOS. MÉTODO DE ANÁLISIS TRADICIONAL Y MÉTODOS ALTERNATIVOS NO DESTRUCTIVOS.....	1
1.2. SITUACIONES CLÁSICAS DE MUESTREO EN LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA: LOTES DE DIMENSIÓN CERO Y UNIDIMENSIONALES.....	3
1.3. DESCRIPCIÓN DE LAS DIMENSIONES DE LOS COMPONENTES QUE CONSTITUYEN EL PROBLEMA EN ESTUDIO: TAMAÑO DEL LOTE, INSTRUMENTOS PARA REALIZAR EL MUESTREO, Y DESCRIPCIÓN DE LOS FRAGMENTOS QUE CONFORMAN CADA LOTE.....	4
1.3.1. Heterogeneidad de los comprimidos farmacéuticos.....	5
1.3.2. Características del ingrediente activo.....	6
1.3.3. Características de los excipientes.....	7
1.3.4. El mezclado del ingrediente activo y los excipientes.....	8
1.4. NIVELES DE HETEROGENEIDAD EN UN COMPRIMIDO FARMACÉUTICO: HETEROGENEIDAD CONSTITUCIONAL Y DISTRIBUCIONAL.....	10
1.5. DEFINICIÓN DEL ERROR CORRECTO DE MUESTREO.....	13
1.6. DEFINICIÓN DEL ERROR INCORRECTO DE MUESTREO.....	13
1.6.1. Error de delimitación del incremento.....	13
1.6.2. Error de extracción del incremento.....	14
1.6.3. Error de preparación del incremento.....	15
1.7. DEFINICIÓN DEL ERROR TOTAL DE MUESTREO Y EL ERROR GLOBAL DE LA ESTIMACIÓN.....	15
1.8. PRINCIPIO FUNDAMENTAL DEL MUESTREO.....	16
1.9. CONSIDERACIONES FINALES RESPECTO AL USO DE LA ESPECTROSCOPIA RAMAN PARA EL ANÁLISIS DE COMPRIMIDOS FARMACÉUTICOS, EN TÉRMINOS DE LA TEORÍA DE MUESTREO.....	17
1.10. CIERRE DE CAPÍTULO.....	18
1.11. REFERENCIAS.....	19

CAPÍTULO 2. TEORÍA DE LA ESPECTROSCOPIA RAMAN. 1

2.1. INTRODUCCIÓN.....	21
2.2. TEORÍA BÁSICA DE LA ESPECTROSCOPIA RAMAN.....	23
2.3. ESTUDIO DE LA GENERACIÓN DE LOS FLUJOS DE RADIACIÓN RAMAN EN EL INTERIOR DE UNA MUESTRA.....	24
2.3.1. Consideraciones previas.....	24
2.3.2. Descripción de la difusión aleatoria de los fotones para una muestra de dispersión múltiple luego de una irradiación difusa.....	26

2.3.3.	Propiedades ópticas de las muestras que influyen en las intensidades de las bandas Raman	27
2.4.	APLICACIÓN DE LA TEORÍA DEL TRANSPORTE RADIATIVO A LA ESPECTROSCOPIA RAMAN PARA UNA MUESTRA IRRADIADA DIFUSAMENTE	29
2.5.	EL SIGUIENTE PASO: APLICACIÓN DE LA TEORÍA DEL TRANSPORTE RADIATIVO PARA UNA INCIDENCIA NORMAL.....	32
2.5.1.	Estimación de los flujos de radiación para un disco cilíndrico irradiado mediante un láser	32
2.5.2.	Impacto del coeficiente de absorción en la intensidad de la radiación Raman reflejada y transmitida.....	36
2.5.3.	Generación axial de perfiles de profundidad de señales Raman, para materiales de dispersión múltiple que no absorben.....	37
2.5.4.	Propagación radial de las intensidades Raman para materiales de dispersión múltiple que no absorben	38
2.6.	CIERRE DE CAPÍTULO.....	40
2.7.	REFERENCIAS	41
CAPÍTULO 3. INSTRUMENTACIÓN RAMAN. 43		
3.1.	INTRODUCCIÓN	43
3.2.	GEOMETRÍA DEL INSTRUMENTO RAMAN	45
3.2.1.	Espectroscopía Raman por retrodispersión.....	46
3.2.2.	Espectroscopía Raman espacialmente desplazada	47
3.2.3.	Espectroscopía Raman por transmisión.....	49
3.3.	COMPONENTES PRINCIPALES DE UN INSTRUMENTO RAMAN.....	53
3.3.1.	Láseres	53
3.3.2.	Espectrómetro	59
3.3.3.	Detectores.....	62
3.4.	LA RELACIÓN SEÑAL/RUIDO EN LA ESPECTROSCOPIA RAMAN	63
3.4.1.	Obtención de una señal Raman.....	64
3.4.2.	Fuentes de ruido.....	67
3.4.3.	Cálculo de la relación Señal/Ruido para instrumentos dispersivos y no dispersivos.....	71
3.5.	COMPARATIVA FINAL DE LOS INSTRUMENTOS DISPERSIVOS Y NO DISPERSIVOS	74
3.6.	CIERRE DE CAPÍTULO.....	75
3.7.	REFERENCIAS	76
CAPÍTULO 4. QUIMIOMETRIA..... 1		
4.1.	INTRODUCCIÓN	79
4.2.	DEFINICIÓN DE QUIMIOMETRÍA.....	80
4.2.1.	Algo de historia.....	82

4.3.	LA QUIMIOMETRÍA EN LAS TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS	83
4.3.1.	Pretratamiento de los datos.....	85
4.3.2.	El análisis multivariable	90
4.4.	CIERRE DE CAPÍTULO.....	100
4.5.	REFERENCIAS	100
CAPÍTULO 5. CONTROL DE CALIDAD EN LA PRODUCCIÓN DE COMPRIMIDOS FARMACÉUTICOS DE BAJA DOSIFICACIÓN. APORTES DE LA ESPECTROSCOPIA RAMAN. 1		
5.1.	INTRODUCCIÓN	103
5.2.	RETOS EN EL DESARROLLO DE MEDICAMENTOS DE BAJA DOSIFICACIÓN.....	104
5.3.	MARCO REGULATORIO VIGENTE, Y SU IMPACTO EN EL DESARROLLO DE NUEVOS MEDICAMENTOS .	105
5.4.	UNIFORMIDAD DE CONTENIDO DE MEZCLAS EN POLVO Y PRODUCTOS TERMINADOS.....	107
5.4.1.	Estado actual de los requisitos que deben cumplir los fabricantes	107
5.4.2.	Alternativas propuestas a la aplicación de la prueba de Uniformidad de las Unidades de Dosificación incluida actualmente en las Farmacopeas.....	109
5.4.3.	Particularidades de la determinación de uniformidad de contenido en el caso de productos de baja dosificación.....	113
5.5.	DIVISIÓN DE TABLETAS	113
5.6.	APORTES DE LA ESPECTROSCOPIA RAMAN AL CONTROL DE CALIDAD DE LOS MEDICAMENTOS DE BAJA DOSIFICACIÓN	115
5.7.	CIERRE DE CAPÍTULO.....	116
5.8.	REFERENCIAS	116
CAPÍTULO 6. EL MUESTREO DE UN MATERIAL HOMOGÉNEO USANDO ESPECTROSCOPIA RAMAN. INFLUENCIA DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA EN LA INTENSIDAD DE LOS ESPECTROS Y EN LA PRECISIÓN DEL ANÁLISIS. 1		
6.1.	INTRODUCCIÓN	119
6.2.	PRESENTACIÓN DEL INSTRUMENTO NO DISPERSIVO USADO EN ESTA TESIS.....	124
6.3.	MATERIALES Y MÉTODOS	125
6.3.1.	Preparación de las tabletas.....	125
6.3.2.	Adquisición de los espectros	127
6.3.3.	Pretratamientos espectrales.....	127
6.4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	127
6.4.1.	Efecto de la compactación de un material en polvo en las intensidades Raman.....	127
6.4.2.	Evolución de las intensidades Raman con el tamaño de partícula en muestras compactadas.....	130
6.4.3.	Interpretación de las mediciones de repetitividad y por mapeo en términos de la Teoría de Muestreo.....	138

6.4.4.	Efecto del tamaño de partícula sobre el ruido de la línea base	140
6.4.5.	Reproducibilidad de las bandas Raman de diferente nivel de intensidad	143
6.4.6.	Discusión sobre la evolución de las intensidades Raman en función del tamaño de partícula cuando se miden materiales compactados	145
6.5.	CONCLUSIONES	148
6.6.	REFERENCIAS	149
CAPÍTULO 7. EL MUESTREO DE UN MATERIAL HETEROGÉNEO USANDO ESPECTROSCOPIA RAMAN. INFLUENCIA DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA EN LA PRECISIÓN DEL ANÁLISIS DE MEZCLAS BINARIAS. 1		
7.1.	INTRODUCCIÓN	153
7.2.	MATERIALES Y MÉTODOS	157
7.2.1.	Preparación de las mezclas binarias en polvo, y obtención de las tabletas ..	157
7.2.2.	Tabletas preparadas con un solo compuesto	158
7.2.3.	Adquisición de los espectros de las mezclas binarias	158
7.2.4.	Adquisición de los espectros para las tabletas que contienen un solo compuesto	159
7.2.5.	Pretratamientos espectrales	160
7.3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	160
7.3.1.	Experimentos sobre tabletas que contienen un único compuesto	160
7.3.2.	Mediciones sobre las mezclas KHP/MCC, y PS/MCC	168
7.4.	CONCLUSIONES	185
7.5.	REFERENCIAS	187
CAPÍTULO 8. DESARROLLO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE ACENOCUMAROL EN TABLETAS DE SINTROM USANDO TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS VIBRACIONALES. 1		
8.1.	INTRODUCCIÓN	193
8.2.	FUNDAMENTOS DE LA ESPECTROSCOPIA EN EL INFRARROJO CERCANO	196
8.3.	PRESENTACIÓN DE LOS INSTRUMENTOS RAMAN DISPERSIVOS USADOS EN ESTA TESIS	200
8.3.1.	Instrumento Raman por retrodispersión dispersivo acoplado a una sonda PhAT	200
8.3.2.	Instrumentos Raman por transmisión	202
8.3.3.	Instrumento FT-NIR	205
8.4.	MATERIALES Y MÉTODOS	207
8.4.1.	Muestras comerciales y compuestos de referencia	208
8.4.2.	Tabletas preparadas en el laboratorio	208
8.4.3.	Método de referencia por cromatografía líquida	209
8.5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	211

8.5.1.	Obtención de los modelos de calibración con el equipo Bruker MultiRAM	211
8.5.2.	Obtención de los modelos de calibración con el equipo Kaiser Raman RXN1	226
8.5.3.	Obtención de los modelos de calibración con el equipo Horiba AccuRA.....	236
8.5.4.	Obtención de los modelos de calibración con el equipo Cobalt TRS100.....	242
8.5.5.	Obtención de los modelos de calibración para el Sintrom 1 con el equipo de infrarrojo cercano Bruker MPA (modos reflectancia difusa y transmitancia)	246
8.5.6.	Sobre el uso de distintos intervalos espectrales y combinaciones de pretratamientos para la obtención de los modelos cuantitativos por espectroscopía Raman	253
8.5.7.	Comparativa de los modelos por espectroscopía Raman y NIR.....	256
8.6.	CONCLUSIONES	260
8.7.	REFERENCIAS	261

CAPÍTULO 9. EVALUACIÓN DE LA UNIFORMIDAD DE LAS UNIDADES DE DOSIFICACIÓN EN LOS COMPRIMIDOS SINTROM 1 Y SINTROM 4. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE API EN LAS MITADES Y CUARTOS DE LOS COMPRIMIDOS DE SINTROM 4 POR ESPECTROSCOPIA RAMAN. 5

9.1.	INTRODUCCIÓN	265
9.2.	MATERIALES Y MÉTODOS	268
9.2.1.	Pruebas para la determinación del efecto de la dispersión de la radiación en el interior de los comprimidos de Sintrom 4.....	269
9.3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	269
9.3.1.	Aplicación de la prueba UDU a los lotes analizados de Sintrom 1 y Sintrom 4	269
9.3.2.	Análisis del contenido de API en los posibles fragmentos de las tabletas de Sintrom 4 por espectroscopía Raman.....	272
9.3.3.	Evaluación de las masas de los fragmentos que se obtienen al dividir los comprimidos de Sintrom 4	282
9.4.	CONCLUSIONES	285
9.5.	REFERENCIAS	286

CAPÍTULO 1

DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA EN ESTUDIO

TEORÍA DE MUESTREO

1.1 Caso en estudio: El control de calidad de los comprimidos farmacéuticos. Método de análisis tradicional y métodos alternativos no destructivos.

Con el fin de introducir el problema en estudio, vamos a trasladarnos al momento de la realización de alguno de los ensayos establecidos, por ejemplo, en una Farmacopea, para la determinación del contenido de ingrediente farmacéutico activo (API por sus siglas en inglés) en tabletas. El procedimiento de la prueba establece un número de unidades que deben analizarse, las cuales han sido seleccionadas aleatoriamente y son fieles representantes del lote constituido por cientos o miles de tabletas bajo verificación. Tenemos por ejemplo, 10 tabletas, que deben procesarse una a una.

Tradicionalmente el método analítico para cuantificar el contenido de ingrediente activo en cada tableta, requiere la extracción del API del comprimido mediante desintegración de la tableta al ponerse en contacto con un disolvente específico. Por lo general no es necesario hacer ningún paso de trituración de la tableta: el uso de un disolvente adecuado, unido a algún tipo de agitación (ya sea mecánica o con la ayuda de un baño ultrasónico) es suficiente para dispersar todo el sólido en el volumen de extracción. El compuesto de interés queda disuelto en el líquido, y puede que también algunos de los otros componentes de la formulación. Finalmente un análisis por cromatografía líquida de una porción de la disolución, es lo que permite determinar la cantidad del ingrediente activo en la tableta procesada.

Esta es la estrategia clásica seguida por la industria farmacéutica para el ensayo de ingrediente activo en tabletas. Su efectividad está más que comprobada, sin embargo presenta una serie de inconvenientes, tales como el uso de reactivos químicos, el tiempo que lleva cada etapa del procesamiento de la muestra, y evidentemente, su destrucción.

En el presente trabajo se propondrán distintas vías no destructivas para llegar a un resultado que no difiera significativamente del obtenido con el método destructivo. Todas

las estrategias consisten en la irradiación de cada tableta individual y posterior registro de un espectro, el cual es el resultado de la interacción de la radiación con el material en estudio. Por ahora vamos a decir que este espectro contiene muchísima información, referente a las propiedades físicas y químicas de la muestra. Posteriormente, mediante las herramientas de la quimiometría, es posible extraer diversos datos de interés, siendo uno de estos, la cantidad de ingrediente activo en cada tableta.

Todo esto suena muy bien, sin embargo con el fin de obtener resultados de calidad, es indispensable conocer las posibilidades y limitaciones de esta estrategia. Una primera limitación tiene que ver con la gran variabilidad en la forma y tamaño de las muestras (tabletas en este caso) que será necesario medir, mientras que por otro lado, tenemos un instrumento de construcción "rígida", en el sentido de que por ejemplo, tenemos un diámetro de irradiación no ajustable en la gran mayoría de los espectrómetros. Esto se ejemplifica en la Figura 1.1, donde se muestran 3 formas típicas de comprimidos farmacéuticos, cada uno con un tamaño distinto. En el caso del análisis tradicional por cromatografía líquida, si no queremos alterar de ninguna manera la tableta antes de iniciar el análisis, para la tableta verde no es posible efectuar la desintegración del comprimido

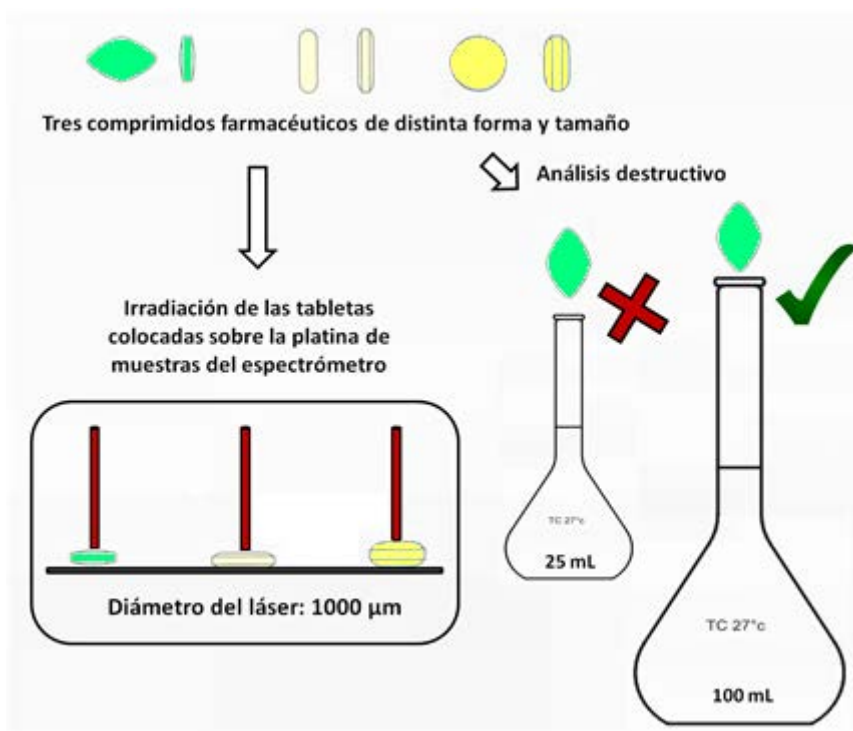


Figura 1.1. Comparación del método tradicional destructivo para la estimación del contenido de API en una tableta, con el método alternativo por espectroscopía Raman, en el cual se registra uno o más espectros de cada tableta mediante la irradiación con un láser de diámetro fijo.

en un matraz de 25 mL, básicamente porque no es posible colocarla dentro de él. Esta tableta sí pasa por el cuello del matraz de 100 mL, y entonces se procede a añadir el primer volumen de disolvente para iniciar la extracción del ingrediente activo.

Considerando la medición no destructiva de tabletas usando alguna técnica espectroscópica (por ejemplo espectroscopía Raman, o espectroscopía en el infrarrojo cercano), se procede a colocarlas en la superficie del compartimento de muestras, y a continuación se irradian con un láser de diámetro definido, el cual en el ejemplo de la Figura 1.1 mide 1000 μm . Teniendo en cuenta únicamente el área irradiada de la cara de la tableta que mira al láser, es evidente que en la tableta blanca estamos irradiando un porcentaje de área menor, aunque como se explicará posteriormente, el espectro adquirido proviene de un volumen que contiene cierto número de partículas y no de un área muestreada. Como resultado de esta situación, en el arrastre total de errores de esta estrategia de análisis no destructiva, es necesario incorporar un posible error por submuestreo. La aplicación de los conceptos dados por la Teoría de Muestreo al proceso de toma de espectro(s), para posteriormente determinar el contenido de ingrediente activo en comprimidos farmacéuticos, ha sido la hoja de ruta del trabajo realizado en esta tesis doctoral, con el fin de comprender de una mejor manera el impacto del modo de adquisición del(los) espectro(s) en los resultados obtenidos.

1.2 Situaciones clásicas de muestreo en la industria farmacéutica: lotes de dimensión cero y unidimensionales.

Una manera de clasificar los distintos procesos de muestreo consiste en considerar la naturaleza espacial específica del material que se va a muestrear. La Teoría de Muestreo puede aplicarse sobre lotes de 0, 1, 2 y 3 dimensiones. Sin embargo, la gran mayoría de situaciones de muestreo que pueden presentarse en la industria farmacéutica, desde la verificación de materias primas, en pasos intermedios de fabricación, y a los productos terminados, corresponden a ejemplos de lotes de dimensión 0 y 1, los cuales se explican a continuación ¹.

- *Dimensión cero*: el material a ser muestreo está definido en el espacio. Algunos ejemplos son un contenedor, una bolsa grande o la carga de un camión. En principio estos lotes pueden ser manipulados, por ejemplo, mediante mezclado por agitación.

- *Lotes unidimensionales*: una dimensión en el espacio domina completamente el lote. Los dos ejemplos más importantes son las cintas transportadoras y las tuberías que transportan un flujo de material.

Los ejemplos mencionados anteriormente corresponden a situaciones donde el volumen de material que se pretende muestrear puede ser medido como kilogramos (decenas o miles de kilogramos). Y no es extraño que en trabajos de Teoría de Muestreo lo que se trate de determinar es la cantidad de material a extraer del total que constituye, por ejemplo, un lote de producción ^{2,3}.

Volviendo al caso en estudio, que es la irradiación de un comprimido farmacéutico con un haz de diámetro fijo para obtener un espectro de la muestra, para empezar se puede decir que la situación de muestreo tiene dimensión cero. Cada tableta medida se va a considerar como un lote que se va a muestrear. El material en estudio tiene dimensiones definidas, y existen ciertas limitaciones respecto a su manipulación: no es posible hacer ningún paso previo de homogenización de la muestra (no la vamos a alterar de ninguna forma, ni antes ni durante el muestreo), y no vamos a extraer ninguna partícula de la tableta durante la medición del(los) espectro(s).

1.3 Descripción de las dimensiones de los componentes que constituyen el problema en estudio: tamaño del lote, instrumentos para realizar el muestreo, y descripción de los fragmentos que conforman cada lote.

Como resultado de la exposición anterior, el tamaño del lote que vamos a muestrear viene dado por las dimensiones de cada tableta que se midió. Las tabletas serán descritas en detalle en las secciones experimentales correspondientes, pero por ahora se puede mencionar que todas son de perímetro circular, con diámetros y espesores comprendidos entre los 5.1 y 13.2 mm, y entre los 1.9 y 3.5 mm respectivamente, por lo que se trata de pequeños cilindros.

Respecto a los instrumentos utilizados para realizar el muestreo, ahora vamos a acotar el problema a la medición de comprimidos farmacéuticos usando espectroscopía Raman. Durante el trabajo experimental fue posible utilizar distintos espectrómetros, donde el dato que se puede conocer *a priori* para determinar la compra de uno u otro instrumento Raman, es el diámetro del láser con el cual se va a irradiar la muestra. Nuevamente es indispensable aclarar que el espectro obtenido no se debe a un área muestreada, sino a un volumen muestreado en el que se encuentra cierta cantidad de partículas. Al respecto, la

estimación de la cantidad de material de la que se ha generado un espectro no es para nada trivial, y es algo que fue estudiado en esta tesis. Por ahora se puede decir que esto es función de las propiedades físicas y químicas del material que se esté midiendo. Dejando de lado un microscopio Raman que fue utilizado en algunos trabajos, porque como su nombre lo indica, es un microscopio, y de entrada se puede decir que un microscopio no es en lo absoluto adecuado para determinar el contenido de ingrediente activo de una tableta (al menos de una manera práctica para el de control de calidad de comprimidos farmacéuticos terminados), el diámetro de láser de menor tamaño utilizado fue de 0.5 mm y el de mayor tamaño de 13 mm, siendo posible con este último irradiar prácticamente toda la superficie de las tabletas de mayor diámetro.

Por último queda describir el "qué hay" dentro de los lotes. Para esto es necesario adentrarse en la caracterización de la heterogeneidad de las tabletas en estudio. Esto es básico porque el concepto de heterogeneidad está íntimamente relacionado al de representatividad, y es fundamental que los espectros sean registrados siguiendo las reglas de un muestreo representativo ¹.

1.3.1 Heterogeneidad de los comprimidos farmacéuticos.

La observación de cierto número de tabletas (blancas por ejemplo) contenidas en un blíster, ya sea a través de él, o retirándolas y observando en detalle a simple vista, inicialmente haría pensar que aquellas son un material homogéneo. Si se toma una tableta y se mira en un microscopio, ya se empezarían a observar diferencias según qué punto esté bajo visualización. Un comprimido farmacéutico está constituido por un conjunto de granos o partículas de distinta forma, tamaño, densidad, y con cierta importancia en especial, de distinta composición. Según la terminología de la Teoría de Muestreo estos granos o partículas se llaman *fragmentos* ¹. Si se hace una inspección hasta llegar al nivel de cada fragmento, y poniendo especial atención en su composición, se observaría que nuestros lotes (cada tableta) son materiales significativamente heterogéneos. En un comprimido farmacéutico se pueden diferenciar claramente dos tipos de componentes: el/los ingrediente(s) activo(s), la(s) sustancia(s) responsable(s) de la acción farmacológica; y los excipientes, que son todos los otros componentes diferentes del(los) principio(s) activo(s), los cuales se utilizan para conseguir la forma farmacéutica deseada, y facilitan la preparación, conservación y administración de los medicamentos ⁴. A continuación se hará una descripción de las características de los ingredientes activos y

excipientes, considerándolos como distintos tipos de fragmentos que varían en composición y tamaño.

1.3.2 Características del ingrediente activo.

Anteriormente se dio una idea del tamaño de los lotes que están bajo estudio, y ya se ha dado un rango de diámetros de láser con los que se irradiaron las muestras, por lo que ahora queda poner dimensiones a los fragmentos que componen los lotes. La importancia de la caracterización de las partículas de los materiales en polvo va mucho más allá de lo que se pretende en esta discusión, que es brindar una idea de las dimensiones de los constituyentes de las tabletas. Esta determinación es uno de los aspectos cruciales durante el desarrollo de un producto farmacéutico, y en el control de calidad de las formas sólidas de dosificación oral (una tableta por ejemplo) ⁵.

El tamaño de partícula es una característica fundamental de los ingredientes activos, aunque en la práctica los fabricantes el dato que manejan es el de una distribución de tamaños de partícula. Esta distribución puede tener efectos significativos en el rendimiento final de un medicamento, determinando propiedades tales como su disolución, biodisponibilidad, uniformidad de contenido y estabilidad. Aún más, la distribución de tamaños de partícula, tanto del ingrediente activo como de los excipientes, puede influir en la manufacturabilidad del fármaco, pudiendo afectar parámetros tales como la fluidez, uniformidad de mezcla y compactabilidad. Todos estos parámetros, ultimadamente, pueden tener un impacto sobre la seguridad, eficacia y calidad del producto terminado ⁵.

La selección de un tamaño de API correcto para la formulación de un nuevo posible fármaco es un asunto complejo. Las opciones posibles van desde hacer muchos ensayos a prueba y error, hasta la utilización de métodos matemáticos que predigan opciones de formulación adecuada. En este sentido, los modelos predictivos muestran por ejemplo, que los API's de elevada potencia (de dosis baja), requieren distribuciones de partícula más pequeñas. Por tanto, mediante el incremento del número de partículas del API, y disminuyendo el tamaño de partícula, se aumentan las probabilidades de alcanzar la *uniformidad de contenido* necesaria en la formulación ⁶. Esto se retomará en secciones posteriores con más detalle, dado que el medicamento estudiado durante esta tesis son tabletas de baja dosificación. En términos prácticos, la *uniformidad de contenido* depende del número de partículas, porque durante la preparación de todo comprimido

farmacéutico deben haber suficientes partículas del ingrediente activo, para que estas puedan distribuirse uniformemente entre las unidades individuales de dosificación que se van produciendo ⁷.

Habitualmente el API es micronizado antes o durante el proceso de formulación, y su tamaño se controla rigurosamente. Pero a pesar de esto, el tamaño de partícula luego de la micronización no siempre refleja su tamaño en una matriz de dosificación compleja (la tableta comercial). Las partículas de API se someten a distintos estreses físicos durante las etapas de la formulación, tales como el mezclado, granulación, secado, formación de las tabletas y su recubrimiento, e incluso durante el almacenamiento del producto terminado, dependiendo de la formulación y empaquetamiento. La determinación del tamaño de API en el producto terminado, usando técnicas como el tamizado, difracción de láser y la dispersión dinámica de la luz no permiten una evaluación específica, por lo que la estimación del tamaño de API en tabletas terminadas representa un reto mayor en el desarrollo farmacéutico. Al respecto, se ha propuesto la microscopía Raman para la estimación del tamaño del API en tabletas de baja dosificación, usando objetivos 50 X y 100 X, los cuales brindan diámetros de láser que pueden estar por debajo de 1 μm . En estos estudios, el tamaño de partícula promedio del API en las tabletas terminadas que se ha reportado está entre los 5 y 20 μm ^{8,9}.

1.3.3 Características de los excipientes.

Una selección adecuada de los excipientes, en especial de los rellenos-aglutinantes (*filler-binders*), puede determinar significativamente la uniformidad de contenido de las tabletas. En la gran mayoría de los casos, el tamaño de partícula de los excipientes es bastante superior al del ingrediente activo. Por ejemplo, haciendo una búsqueda bibliográfica de excipientes a considerar para la fabricación de tabletas por *compresión directa*, se mencionan productos tales como la lactosa monohidrato de tamaño nominal 120 μm , lactosa anhidra de tamaño nominal 150 o 200 μm y celulosa microcristalina (MCC) de 100 μm ⁷. Aparte de la compactación directa, los comprimidos farmacéuticos también pueden fabricarse siguiendo un proceso de *granulación*, la cual puede ser húmeda o seca. Volviendo a la celulosa microcristalina, en el caso de la fabricación por granulación húmeda se recomienda usar MCC de tamaño nominal 50 μm ¹⁰.

1.3.4 El mezclado del ingrediente activo y los excipientes.

En las secciones 1.3.2 y 1.3.3 se pusieron números al posible tamaño de los constituyentes de las tabletas en estudio. Se han mencionado dos detalles a tener en cuenta respecto a los cambios en los tamaños de las partículas que pueden surgir durante el proceso de fabricación. Por un lado, que no necesariamente el tamaño del ingrediente activo en la matriz de la tableta, se corresponde con el que se venía midiendo durante la micronización del ingrediente activo. Y número dos, se mencionaron dos procesos para la producción de comprimidos farmacéuticos: compresión directa y granulación. Lo que vamos a definir como fragmentos de nuestros lotes, dependerá del tipo de proceso con el que se hayan fabricado las tabletas, por lo que a continuación se describe cada uno de ellos.

1.3.4.1 Producción de tabletas por compresión directa.

La compresión directa es el proceso por el cual las tabletas son directamente comprimidas a partir de mezclas en polvo del API y los excipientes necesarios (que incluyen los rellenos, desintegrantes y lubricantes, entre otros), las cuales deben fluir uniformemente a la cavidad de un molde para convertirse en un comprimido firme. Tomando en cuenta todos los componentes (ingrediente(s) activo(s) y excipientes), si las diferencias entre ellos respecto a su tamaño de partícula, forma, o densidad son significativas, la mezcla podría tender a segregarse, lo que puede resultar en una uniformidad de mezcla no adecuada. La segregación es particularmente probable que ocurra en mezclas donde los componentes difieren marcadamente en su tamaño, siendo factores secundarios las diferencias respecto a la forma y densidad ⁵. Aun cuando la mezcla final en polvo cumpla el criterio de aceptabilidad respecto a la uniformidad de mezcla, el API puede segregarse o aglomerarse entre el mezclado y el momento de la compresión, debido a las diferencias de tamaño de partícula, forma o densidad entre los distintos componentes en la mezcla ⁵. En cualquier caso, y muy importante para lo que se está investigando en esta tesis, en las tabletas fabricadas por compresión directa aún están presentes las partículas individuales del API y los excipientes. Desde el punto de vista de la Teoría de Muestreo, tenemos una serie de fragmentos cuya composición es la de cada uno de los componentes de la formulación.

1.3.4.2 Producción de tabletas por granulación.

Aparte de la compresión directa, las tabletas pueden fabricarse siguiendo procesos de granulación, ya sea húmeda o seca. La granulación básicamente es un proceso de aumentación de tamaño, que puede servir para mejorar las características de flujo y compresión de la mezcla. En un proceso de granulación seca, se hacen agregados a partir de las partículas en polvo del API y los diluyentes al someterse a una alta presión, que posteriormente se rompen en gránulos mediante molienda y tamizado antes de hacer el paso de la compresión. Por otro lado, en un proceso de granulación húmeda, se añade un líquido a las partículas en polvo del API y los diluyentes para formar aglomerados, que posteriormente también se rompen para formar gránulos mediante secado, molienda y tamizado antes de la compresión. En ambos casos, dado que las propiedades de las partículas individuales del API y los diluyentes están enmascaradas hasta cierto punto por la granulación, la calidad de las tabletas está directamente influenciada por los gránulos (los cuales contienen una mezcla de API y diluyentes), en lugar de depender de las partículas individuales de cada tipo de componente. Lo mismo ocurre cuando se pone en perspectiva este proceso de fabricación de tabletas respecto a la Teoría de Muestreo: en las tabletas obtenidas mediante granulación no se podrían considerar como fragmentos las partículas individuales del API y los excipientes, sino que los fragmentos vendrían a ser los gránulos, que tienen más de un componente de la formulación ⁵.

Dicho lo anterior, a lo largo de los trabajos realizados en esta tesis se va a considerar que las tabletas comerciales fueron fabricadas por compresión directa. Este dato es parte de la información confidencial que le pertenece al fabricante, y que es conocida únicamente en adición, por la autoridad que aprueba la venta y distribución del medicamento luego de pasar por un proceso de registro. Aparte del análisis de tabletas comerciales, en otros de los trabajos realizados en esta tesis se prepararon tabletas constituidas por un material de composición homogénea, así como tabletas constituidas por mezclas binarias, todas éstas fueron preparadas mediante mezclado de los materiales en polvo y posterior compresión directa.

1.4 Niveles de heterogeneidad en un comprimido farmacéutico: heterogeneidad constitucional y distribucional.

Hemos considerado que las tabletas en estudio están constituidas por fragmentos que corresponden a cada uno de los componentes de la formulación. Podemos entonces describir una *heterogeneidad constitucional* en los comprimidos analizados, la cual es una característica del material relacionada con las diferencias de composición *entre* los pequeños fragmentos, fundamentales e indivisibles, que componen toda la tableta. En una tableta firme no existe la posibilidad de hacer alguna homogeneización de los fragmentos (evidentemente morturar, mezclar y recomprimir no es una opción a tener en cuenta); pero de tratarse por ejemplo, de una mezcla de distintos compuestos en polvo colocada en una bolsa, su agitación no tendría ningún efecto en la heterogeneidad constitucional, ya que se trata de una propiedad intrínseca del material. Como consecuencia de esta heterogeneidad no constante del material, se puede introducir un primer componente para la suma de un error total de muestreo, el cual se denomina *error fundamental de muestreo* (*FSE* por sus siglas en inglés) ¹¹.

Como resultado de la descripción de los componentes que constituyen el problema del análisis no destructivo de un comprimido farmacéutico:

- Dimensiones de las tabletas: magnitud de varios milímetros.
- Diámetro de los láser de irradiación: desde 500 µm hasta varios milímetros (pudiendo incluso cubrir todo el área de la cara irradiada de la tableta).
- Dimensiones de los fragmentos de las tabletas: desde pocas decenas de micrómetros (para el caso del API), hasta cientos de micrómetros (para el caso de los excipientes).

En todos los casos los espectros obtenidos corresponden a la contribución de más de un fragmento. Según la terminología de la Teoría de Muestreo, un *incremento* es un grupo de fragmentos vecinos en el espacio. Cada espectro registrado sobre una tableta corresponde a un incremento, pero no necesariamente un incremento es idéntico a una muestra. El medir un único espectro sobre una tableta en la práctica es tomar una *muestra al azar*, y como su nombre lo indica, esto puede resultar bien o mal: si resulta bien tenemos una *muestra*, si resulta mal la teoría del muestreo define lo que tenemos como un *espécimen*. Para evitar tener un espécimen, con el cual se puede, pero no se debe trabajar, la Teoría de Muestreo establece que siempre debe emplearse la composición de varios incrementos del lote. Las *muestras compuestas* están, por definición, hechas de varios incrementos ¹.

A este punto hemos pasado de ver el lote en el nivel de los fragmentos, a verlo desde un "nivel superior": el de los incrementos. Medir más de un incremento en nuestros lotes corresponde a tomar más de un espectro en cada tableta, pero para asegurarnos que la señal obtenida proviene de distintos grupos de fragmentos, los distintos espectros registrados con el fin de cuantificar el ingrediente activo en las tabletas no se tomaron sobre la misma área de la tableta, sino que fueron registrados en distintos puntos de la cara irradiada. A este tipo de medición se le llamará en este trabajo '*medición por mapeo*', y será explicado en detalle más adelante. No obstante, a pesar de lo que estipula la Teoría de Muestreo, en algunos casos se evaluarán las predicciones para la cuantificación del ingrediente activo, habiendo tomado un único incremento (espectro) sobre cada lote (tableta). La decisión estuvo basada en la proporción que representaba cada diámetro de láser del diámetro de cada tableta. Por ejemplo, considerando un diámetro de láser de 500 μm , se dio por asumido que un único espectro registrado sobre tabletas de 5 y 13 mm de diámetro, sería el resultado de irradiar un área muy pequeña de la tableta. No obstante con este instrumento es posible desplazar la tableta por indicación desde el ordenador del espectrómetro, de manera que no es difícil programar una serie de mediciones por mapeo. Por otro lado, en otro de los instrumentos se disponía de un diámetro de láser de 4000 μm , 8 veces más grande que el descrito anteriormente, y éste es uno de los casos donde se consideró realizar la cuantificación usando un único incremento. También se tomaron medidas haciendo un mapeo con el láser de 4000 μm de diámetro, en la práctica mediante la rotación cada 90 grados de las tabletas (en total 4 espectros en la cara irradiada); pero esta rotación se hizo a mano, lo cual permitió hacer una comparación interesante a nivel científico, pero que no es una estrategia práctica de cara a la industria para la determinación no destructiva de ingrediente activo en tabletas.

Al igual que se definió una heterogeneidad constitucional cuando se consideraron los distintos fragmentos de las tabletas, al aplicar una estrategia para obtener una muestra constituida por varios incrementos, aparece lo que la Teoría de Muestreo llama *heterogeneidad distribucional*. Esto representa la preocupación más directa previo al paso de toma de muestra, porque todo muestreo en la práctica se realiza mediante la extracción de incrementos (o en nuestro caso, por el registro de espectros irradiando uno o más grupos de fragmentos). La heterogeneidad distribucional puede usarse para caracterizar la variabilidad añadida que viene de la necesidad práctica de medir un volumen '*práctico*' de muestra. Siguiendo lo indicado por la Teoría de Muestreo, respecto a tomar más de un incremento, lo que debe conocerse entonces es el *volumen del incremento* (o *masa del incremento*) cuando se va a realizar un muestreo en la práctica ¹.

La heterogeneidad distribucional está sumamente ligada a la heterogeneidad constitucional, y por definición toma en cuenta la heterogeneidad espacial entre todos los incrementos que conforman la totalidad del lote. Este aspecto de la heterogeneidad del lote está determinado por componentes que van desde la gravedad, hasta cualquier otro agente o fuerza que intervenga, en nuestro caso específico, en la obtención de los comprimidos farmacéuticos. Anteriormente se dijo que las tabletas terminadas no se pueden mezclar de ninguna forma, lo cual serviría para reducir la heterogeneidad distribucional. Por tanto, si existe segregación de los fragmentos que las constituyen, aquí sí va a haber un incremento en la heterogeneidad distribucional ¹.

En resumen, la heterogeneidad constitucional se debe a la contribución de todos los fragmentos que en conjunto forman el lote. Algo muy similar se puede decir de la heterogeneidad distribucional, pero en este caso se debe a la contribución de todos los incrementos en los que se puede cubrir la geometría espacial completa del lote (Figura 1.2). De lo anterior se puede inferir que la heterogeneidad distribucional es siempre menor que la heterogeneidad constitucional. La variabilidad asociada a la distribución espacial de los grupos de fragmentos (incrementos) dentro de un lote, representa un nuevo valor a sumar para el error total de muestreo. A este se le denomina *error por agrupamiento y segregación (GSE por sus siglas en inglés)* ¹².

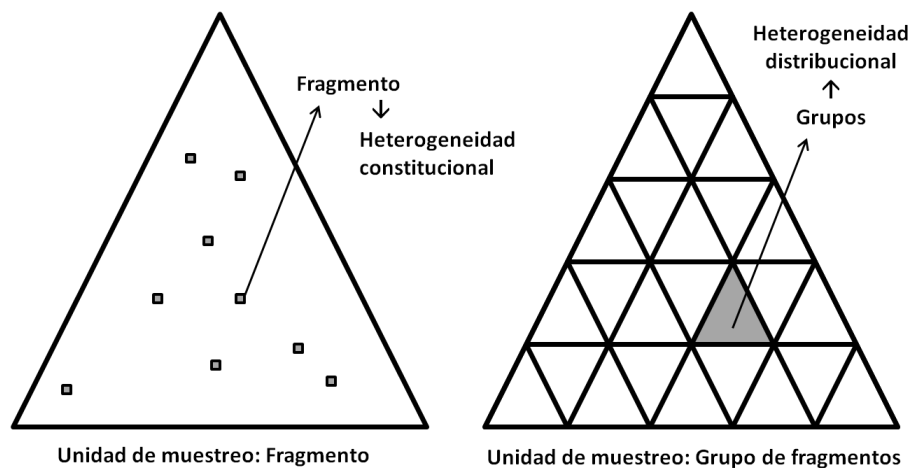


Figura 1.2. Explicación de los conceptos de heterogeneidad constitucional y heterogeneidad distribucional para una misma muestra, considerando su observación en distintas escalas: la primera se refiere a las diferencias en composición entre todos los fragmentos del lote (figura de la izquierda), mientras que la segunda refleja las diferencias composicionales entre todos los incrementos en los cuales se podría cubrir todo el espacio del lote (figura de la derecha). Reproducido de Esbensen, K.H. y Paasch-Mortensen, P. *Process Sampling: Theory of Sampling-the Missing Link in Process Analytical Technologies (PAT)*.

1.5 Definición del error correcto de muestreo.

La situación de muestreo en el caso del análisis no destructivo de comprimidos farmacéuticos, que es resultado de los distintos constituyentes que contienen (los cuales varían en su composición y tamaño, función de la heterogeneidad constitucional), y del posible agrupamiento o segregación de éstos en la tableta terminada (función de la heterogeneidad distribucional), ANTES de llevar a cabo algún procedimiento físico en el que se defina un incremento (en nuestro caso mediante la irradiación de un grupo de fragmentos, pero en otros casos, mediante una extracción física de material del lote), puede caracterizarse por el *error correcto de muestreo* (*CSE* por sus siglas en inglés) ¹.

$$CSE = FSE + GSE \quad (1.1)$$

1.6 Definición del error incorrecto de muestreo.

Cuando se procede a realizar la acción de muestreo, el proceso de muestreo en sí mismo da lugar a 3 errores que son complementarios entre ellos, los cuales en conjunto se conocen como errores incorrectos de muestreo (*ISE* por sus siglas en inglés) ¹. Cada uno va a contribuir a incrementar el error total de muestreo, ahora que se estaría pasando de la "observación del lote", al acto de muestrear. La estrategia de muestreo debería tomar todas las precauciones para eliminar la contribución de ellos, pero en la práctica cada caso tiene sus particularidades.

El "manos a la obra" comienza por definir el incremento a extraer*, una operación conocida como *delimitación del incremento*. Luego de esto, el incremento debe ser físicamente extraído. Cada una de estas operaciones tiene un error potencial asociado, los cuales se llaman *error de delimitación del incremento* (*IDE*) y *error de la extracción del incremento* (*IEE* por sus siglas en inglés).

1.6.1 Error de delimitación del incremento.

Es el resultado de una forma incorrecta del volumen que delimita el incremento. Un ejemplo en el que no se incurre en este error, se encuentra en el caso de tomar una sección

* Se ha mencionado en varias ocasiones que la situación de muestreo en estudio no implica una extracción física de material, pero no se cambiará el término dado que la palabra extraer es necesaria para denominar uno de los tres componentes del ISE.

transversal de un flujo de material (una cinta transportadora), que está definida por dos límites paralelos. Considerando el muestreo no invasivo de comprimidos farmacéuticos usando espectroscopía Raman, en términos prácticos se podría decir que el *IDE* está fuera de control del operador. Primero hay que mencionar que la importancia que se le había dado hasta el momento a la dimensión del área irradiada (lo que sabemos que está incorporado en el instrumento debido al láser), se pierde cuando se estudia el origen de la señal Raman en el interior de un material. Uno de los planteamientos teóricos que se contemplan para entender de donde proviene el espectro registrado al hacer una irradiación, consiste en considerar que cada uno de los fotones incidentes camina independientemente dentro de la muestra ^{13,14}. La física de los movimientos que hacen los distintos tipos de radiación dentro de la tableta se explicará en detalle en los Capítulos 2 y 3, pero está claro que el destino de cada fotón depende del ambiente que se encuentra cada uno, que viene dado inicialmente por los fragmentos que están cerca del área de irradiación de la tableta, y seguidamente por los otros fragmentos que aparecen en el recorrido del fotón dentro de la muestra. Es importante mencionar que durante el trabajo experimental realizado se hicieron estimaciones de la profundidad con la cual las intensidades Raman de los espectros dejan de crecer (en modo reflectancia), utilizando algunos materiales de composición homogénea. Este dato se convierte por tanto en la única dimensión que aparentemente se puede medir con números (milímetros por ejemplo) de lo que ocurre en el interior de la muestra al medir un espectro. Igualmente importante es aclarar que el volumen de cada incremento no es el de un cilindro, debido a la distribución lateral de la radiación en el interior de la muestra, que va más allá del diámetro del láser. Teniendo en cuenta la distribución lateral de la radiación en el interior de la muestra, hay un aspecto adicional que se tomó en cuenta en las mediciones: no es lo mismo irradiar en el centro de la tableta, donde la radiación puede esparcirse por igual en todas direcciones, que irradiar cerca del borde de la tableta. En este caso parte de los fotones dispersados pueden escaparse al exterior de la tableta. La distribución lateral de la radiación es otro factor que también puede impactar en la delimitación del incremento.

1.6.2 Error de extracción del incremento.

En los casos donde es posible delimitar correctamente los límites del incremento, en el momento de la extracción debe tomarse todo el material ubicado en su interior. Anteriormente se dijo que para las mediciones que estamos estudiando, es

considerablemente difícil definir la forma del incremento, por lo que este error tampoco podrá ser eliminado y se sumará al error total de muestreo.

1.6.3 Error de preparación del incremento.

El *error de preparación del incremento* (IPE por sus siglas en inglés), se presenta si la muestra es alterada luego de su extracción. En otro tipo de muestreos esto podría ocurrir porque la muestra ha absorbido humedad, se ha derramado, ha habido contaminación cruzada, o cualquier cosa que no se advierta que haya ocurrido luego de la materialización de la muestra. Considerando la medición de espectros Raman en comprimidos farmacéuticos, se asumió que las tabletas no son alteradas durante el registro de los espectros, esto mediante la inspección visual antes y después de la irradiación. Dependiendo del tipo de muestra es posible que durante la medición del espectro se acumule calor en el material debido a la potencia del láser, lo que puede llevar a que la zona irradiada se quemé. Esto no ocurrió en las mediciones realizadas, y en este sentido fue una ventaja el que todas las tabletas medidas eran de color blanco.

La ecuación (1.2) resume lo que engloba el error incorrecto de muestreo:

$$ISE = IDE + IEE + IPE \quad (1.2)$$

1.7 Definición del error total de muestreo y el error global de la estimación.

La Teoría de Muestreo introduce los errores correctos e incorrectos de muestreo. Estos se combinan para dar el error total de muestreo (*TSE* por sus siglas en inglés):

$$TSE = CSE + ISE \quad (1.3)$$

El componente *CSE* recibe el nombre de 'error correcto' porque estos errores de muestreo ocurren aun cuando las acciones de toma de muestra se han realizado adecuadamente. Esto en realidad ocurre cuando se cumple el requisito de:

$$IDE = IEE = IPE = 0 \quad (1.4)$$

El *IDE* y *IEE* son variables aleatorias, que ya se sabe que distarán de ser cero en nuestras mediciones. Pero nuevamente, lo que se pretende en este trabajo es comprobar la

capacidad de la espectroscopía Raman para la determinación del ingrediente activo en comprimidos farmacéuticos de baja dosificación, a pesar de que los datos obtenidos parten de un muestreo donde no es posible eliminar estas contribuciones del *ISE*. El *IPÉ* se genera por accidente y por tanto es de naturaleza no estadística, y se asume que vale cero en los comprimidos analizados durante esta tesis por espectroscopía Raman.

La obtención de cualquier resultado analítico incluye la contribución de todos los errores de muestreo que han sido descritos a lo largo de este Capítulo. Pero además incluye el *error total analítico* (*TAE* por sus siglas en inglés). La suma de estas dos fuentes de error constituye el *error global de la estimación* (*GEE* por sus siglas en inglés):

$$GEE = TSE + TAE \quad (1.5)$$

La Figura 1.3 resume todos los posibles errores de muestreo en los que se puede incurrir cuando se hace la toma de muestra de un lote de cualquier dimensión. En la sección 1.4 se mencionó el uso de la medición por mapeo con el fin de cumplir lo que establece la Teoría de Muestreo respecto a la obtención de varios incrementos. De esta forma se podrá determinar la magnitud del TSE en cada una de las estrategias de medición de tabletas que se probaron. Pero adicionalmente, en los experimentos realizados también se hicieron mediciones para estimar la magnitud del TAE: este error se determinó a partir de una serie de espectros consecutivos registrados sin cambiar el punto de medición, asumiendo que en cada uno de los espectros adquiridos uno tras otro estaban involucradas las mismas partículas. Así fue posible hacer una estimación del TAE para los distintos modos de adquisición de los espectros Raman.

1.8 Principio fundamental del muestreo

El Principio Fundamental de Muestreo (FSP por sus siglas en inglés), se refiere a que todos los incrementos virtuales posibles deben tener la misma probabilidad de ser seleccionados. Considerando un caso genérico, el FSP establece que debe ser físicamente posible acceder a todas las unidades geométricas del lote ¹⁵. En el análisis no destructivo de un comprimido por espectroscopía Raman esto es factible, aunque dependiendo del punto de irradiación, se podría aumentar involuntariamente el *IDE* (debido a la irradiación cerca del borde de la tableta). Luego de la reducción del *ISE*, la prioridad debe

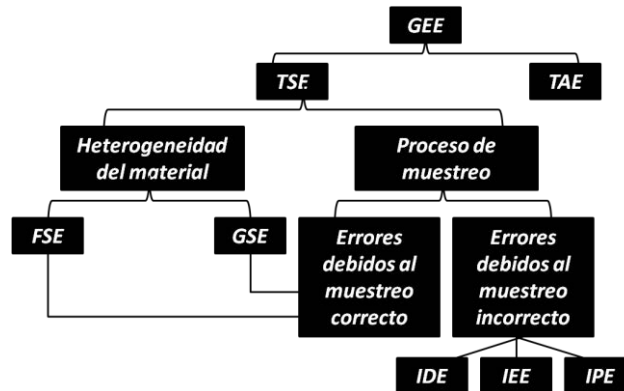


Figura 1.3. Interrelaciones entre los 5 errores básicos de muestreo originados en parte por la heterogeneidad del material que constituye el lote (FSE, GSE), y debidos a los procedimientos de muestreo incorrectos (IDE, IEE, IPE). Reproducido de Esbensen, K.H., Román-Ospino, A.D., Sánchez, A., Romañach, R.J. *Adequacy and verifiability of pharmaceutical mixtures and dose units by variographic analysis (Theory of Sampling)- A call for a regulatory paradigm shift*

ser reducir el *CSE* a un valor predeterminado. Esto incluía el *FSE* (no modificable) y el *GSE* (el cual se debe a la distribución espacial de los grupos de fragmentos); para reducir este último es que se utilizó la estrategia de las mediciones por mapeo (en función del diámetro de irradiación posible con cada instrumento).

Se ha definido una serie de operaciones unitarias de muestreo (SUOs por siglas en inglés), las cuales constituyen un conjunto de principios que se deben seguir para realizar en la práctica un muestreo representativo. En el caso de un lote de dimensión cero esto se hace mediante la realización de replicados del experimento (para la caracterización de la variación del muestreo) y el muestreo compuesto (*composite sampling*). El muestreo compuesto como principio propone tomar todos los incrementos que sean posibles para asegurar la máxima cobertura volumétrica posible del lote ¹⁶. Como se ha dicho esto se implementó con las mediciones por mapeo, no obstante al llevar este principio a la práctica, se debe sopesar la viabilidad práctica respecto al tiempo requerido para cubrir el número de puntos de medición seleccionado.

1.9 Consideraciones finales respecto al uso de la espectroscopía Raman para el análisis de comprimidos farmacéuticos, en términos de la Teoría de Muestreo

Como se mostró en la Figura 1.1, el volumen analítico efectivo durante la irradiación de una tableta en un instrumento Raman es significativamente menor que la cantidad

analizada por el método destructivo. En el primer caso, el no cumplimiento de los principios de la Teoría de Muestreo para la realización correcta del muestreo lleva a unos *IDE/IEE* inevitables, con la consecuencia de que los datos de alta calidad que se pueden obtener por una técnica como la espectroscopía Raman tienen un sesgo por muestreo significativo. Por tanto será posible darle un uso óptimo a esta técnica espectroscópica para el análisis de comprimidos farmacéuticos, sí y solo sí se dispone de muestras representativas y espectros representativos. La comparación de distintas estrategias para la adquisición de los espectros de las tabletas que se pretenden analizar fue uno de los objetivos de esta tesis. Se evaluarán los resultados obtenidos con cada estrategia, pero además se tendrá en cuenta la viabilidad práctica de cada una de ellas.

1.10 Cierre de Capítulo

En este Capítulo se han discutido los aspectos a tomar en cuenta cuando se considera el uso de la espectroscopía Raman para el análisis no destructivo de un medicamento sólido. La estrategia como tal implica un cambio muy importante en la "manera habitual de hacer las cosas" de la industria farmacéutica. Como se discutirá en el Capítulo 5, se trata de algo que en la actualidad está siendo altamente incentivado por las autoridades regulatorias más importantes a nivel mundial en el tema de los medicamentos. No obstante, como se ha explicado a lo largo de este Capítulo, también se abre como tema de investigación el posible error por submuestreo al hacer el análisis individual no destructivo de las tabletas.

Las Farmacopeas incluyen una serie de pruebas en las que deben medirse un número dado de unidades de dosificación con el fin de determinar la uniformidad de contenido; tales pruebas son un requisito durante el proceso de desarrollo de un medicamento, y también forman parte del proceso de control de calidad previo a la liberación de los lotes de fabricación. Entonces, como parte de esta tesis, se propone el uso de la espectroscopía Raman para el análisis de este conjunto de tabletas, en lugar del método tradicional por cromatografía líquida.

El análisis basado en la espectroscopía Raman requiere un paso de extracción de información de los datos generados, que son los espectros Raman registrados en cada tableta. El Capítulo 2 tratará sobre la generación de la señal Raman, la cual depende de las características físicas y químicas del material bajo estudio. En el Capítulo 3 se describirán los principales tipos de instrumentación Raman que están disponibles actualmente en el mercado. Posteriormente el Capítulo 4 se referirá a las herramientas mediante las cuales

se extrae la información de los espectros Raman, con especial énfasis en las herramientas necesarias para una determinación de contenido de ingrediente activo en tabletas farmacéuticas.

1.11 Referencias

- (1) Esbensen, K. H.; Paasch-Mortensen, P. In *Process Analytical Technology*; Bakeev, K., Ed.; John Wiley & Sons, Ltd., 2010.
- (2) Laitinen, H. A.; Harris, W. E. *Chemical Analysis: An advanced text and reference*, 2nd ed.; McGraw-Hill, 1975.
- (3) Zygmunt, B.; Namiesnik, J. In *Comprehensive Analytical Chemistry. Volume 37*; Pawliszyn, J., Ed.; Elsevier, 2002.
- (4) ¿Qué es un excipiente?. Agencia Española de Medicamentos Genéricos <http://www.engenerico.com/que-es-un-excipiente/> (accessed Feb 12, 2017).
- (5) Sun, Z.; Ya, N.; Adams, R. C.; Fang, F. S. Particle Size Specifications for Solid Oral Dosage Forms: A Regulatory Perspective <http://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/36779-Particle-Size-Specifications-for-Solid-Oral-Dosage-Forms-A-Regulatory-Perspective/> (accessed Feb 12, 2017).
- (6) Am Ende, D. J.; Rose, P. R. In *Fundamentals of Early Clinical Drug Development: From Synthesis Design to Formulation*; Abdel-Magid, A. F., Caron, S., Eds.; Wiley, 2006; pp 247–267.
- (7) *Content Uniformity of Direct Compression tablets. DFE pharma*; Goch, Alemania.
- (8) Henson, M. J.; Zhang, L. I. N. *Appl. Spectrosc.* **2006**, *60* (11), 1247–1255.
- (9) Kuriyama, A.; Ozaki, Y. *AAPS PharmSciTech* **2014**, *15* (2), 375–387.
- (10) Avicel for Solid Dose Forms. FMC Health and Nutrition <http://www.fmcbiopolymer.com/Pharmaceutical/Products/Avicelforsoliddoseforms.aspx> (accessed Feb 12, 2017).
- (11) Esbensen, K. H.; Román-Ospino, A. D.; Sanchez, A.; Romañach, R. J. *Int. J. Pharm.* **2016**, *499* (1–2), 156–174.
- (12) Petersen, L.; Minkinen, P.; Esbensen, K. H. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2005**, *77*, 261–277.
- (13) Oelkrug, D.; Brun, M.; Rebner, K.; Boldrini, B.; Kessler, R. *Appl. Spectrosc.* **2012**, *66* (8), 934–943.
- (14) Oelkrug, D.; Ostertag, E.; Kessler, R. W. *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, *405* (10), 3367–3379.

- (15) Esbensen, K. H.; Julius, L. P. In *Comprehensive Chemometrics*; Brown, S. D., Tauler i Ferré, R., Walczak, B., Eds.; Elsevier, 2009; pp 1–18.
- (16) Wagner, C.; Esbensen, K. H. *J. AOAC Int.* **2015**, *98* (2), 275–281.

CAPÍTULO 2

TEORÍA DE LA ESPECTROSCOPÍA RAMAN

2.1 Introducción

Las principales espectroscopías usadas para la detección de las vibraciones de las moléculas están basadas en los procesos de absorción infrarroja y la dispersión Raman. Ambas son ampliamente utilizadas con el fin de obtener información sobre estructuras químicas y formas físicas, para la identificación de sustancias a partir de su patrón espectral característico, y para determinar cuantitativamente la cantidad de una sustancia en una muestra ¹.

En las últimas tres décadas han surgido múltiples aplicaciones de la espectroscopía Raman para el análisis de polímeros, farmacéutico, biomédico, y de bioprocesos, como resultado de mejoras importantes en la tecnología de los detectores y el muestreo por láser ². A nivel de las ventajas e inconvenientes de la técnica, con estos avances se ha logrado reducir el impacto de dos limitaciones clásicas de la espectroscopía Raman: la posible degradación de la muestra durante la medición, y la aparición de una fluorescencia significativa en los espectros, la cual se manifiesta en un solapamiento importante sobre las distintas bandas Raman de la muestra ¹.

La Figura 2.1 muestra el espectro Raman de uno de los compuestos utilizados durante el desarrollo de esta tesis, el ftalato ácido de potasio, obtenido en modo reflectancia*. Como se puede apreciar, la medición de este compuesto con un espectrómetro Raman produce un espectro con un patrón claro de múltiples bandas, el cual contiene gran cantidad de información que posibilita el uso de la técnica para varios tipos de análisis, los cuales en ocasiones se pueden realizar sin necesidad de tener un conocimiento en profundidad de la naturaleza del efecto. Un ejemplo de esto sería la verificación de una materia prima que llega a un sitio de fabricación, y entonces un operario procede a hacer una medición con

* Durante este capítulo se usará el término reflectancia para el modo en el cual el espectro registrado proviene de la radiación Raman que es emitida por la misma cara en que se hace la irradiación usando un láser. No obstante en capítulos posteriores se usará mayoritariamente el término retrodispersión, traducción del término en inglés *backscattering*.

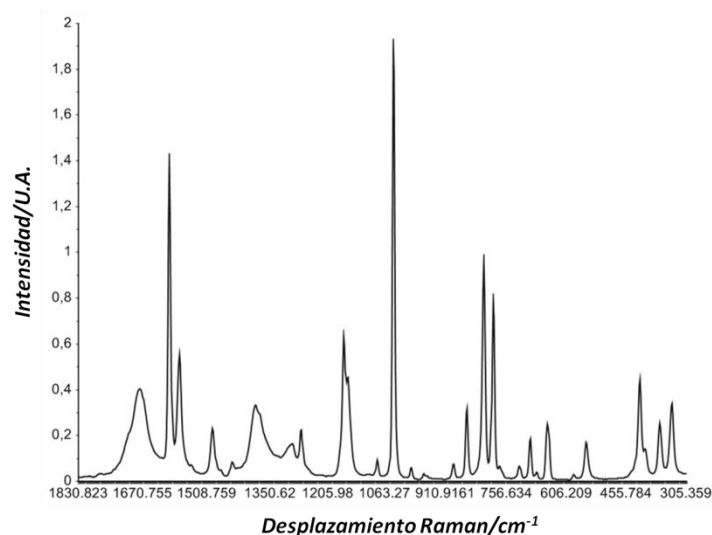


Figura 2.1. Espectro Raman obtenido en modo retrodispersión al irradiar una tableta de ftalato ácido de potasio (equipo MultiRAM, Bruker).

un espectrómetro Raman portátil para comprobar la identidad del material. Estos instrumentos incorporan programas informáticos cada vez más amigables al usuario, y mediante la aparición de un check en pantalla, es suficiente para dar por válido lo que viene descrito en el embalaje del producto.

Sin embargo, una mayor comprensión de la teoría detrás de la medición tiene muchas ventajas; en términos prácticos, respecto al provecho que se le puede sacar a la técnica en diversos campos. Esto es lo que se pretende mostrar a lo largo de este Capítulo. Primeramente se hará un repaso de los fundamentos de la espectroscopía Raman, y posteriormente el resto del capítulo se enfocará en la descripción de los procesos físicos que ocurren en el interior de una muestra que llevan a distintos niveles de generación de radiación Raman. Los procesos serán descritos tanto para la radiación que finalmente atraviesa la muestra, como para la que es reflejada (la que sale por la misma cara en que se hace la irradiación). La descripción se hará sin tomar en cuenta ninguna particularidad que dependa de las características específicas de los espectrómetros Raman disponibles actualmente en el mercado. Durante el desarrollo de la tesis se utilizaron espectrómetros fabricados por 4 casas comerciales distintas, por lo que se consideró incluir un Capítulo separado sólo sobre instrumentación Raman (Capítulo 3).

2.2 Teoría Básica de la Espectroscopía Raman

Cuando la luz interactúa con la materia, los fotones que conforman la luz pueden ser absorbidos o dispersados, o puede que no interactúen con el material y pasen directamente a través de él. En el caso de la espectroscopía Raman, es de interés el caso donde un fotón interactúa con una molécula y se dispersa de ella. A diferencia del proceso de absorción de radiación, no hay necesidad de que el fotón tenga una energía que coincida con la diferencia entre dos niveles energéticos de la molécula. Los fotones dispersados pueden observarse mediante la recolección de la luz a cierto ángulo del rayo de luz incidente, y en el caso de que no haya absorción de ninguna transición electrónica que tenga energías similares a la de la luz incidente, la eficiencia se incrementa con la cuarta potencia de la frecuencia de la luz incidente. La dispersión de la luz es una técnica usada comúnmente, por ejemplo, para la medición del tamaño de partícula y la distribución de tamaños hasta valores de menos de 1 μm , pero en el campo de la identificación molecular, la técnica de dispersión más utilizada es la espectroscopía Raman¹.

Los cambios energéticos que se detectan en la espectroscopía vibracional son aquellos que llevan a un movimiento nuclear. La Figura 2.2 muestra los procesos básicos que pueden ocurrir para una vibración. En el caso de que la dispersión de la radiación sólo produzca una distorsión de la nube de electrones, los fotones van a ser dispersados con cambios de frecuencia muy pequeños, dado que los electrones son comparativamente livianos. Este proceso de dispersión es conocido como dispersión elástica y es el proceso dominante. En el caso de moléculas se conoce como dispersión Rayleigh. No obstante, si durante el proceso de dispersión se induce un movimiento nuclear, habrá una transferencia de energía, ya sea del fotón incidente a la molécula (dispersión Stokes), o de la molécula al fotón dispersado (dispersión anti-Stokes). En estos casos el proceso es inelástico, y la energía del fotón dispersado es diferente de la del fotón incidente por una unidad vibracional. Esto es la dispersión Raman. La distorsión de una nube de electrones viene determinada por su polarizabilidad; y entonces una dispersión Raman intensa ocurre con vibraciones que ocasionan un cambio en la polarizabilidad de la nube de electrones que rodea a la molécula. Comúnmente, las vibraciones simétricas ocasionan los cambios más grandes, y dan las dispersiones mayores. Esto contrasta con la absorción infrarroja, donde la absorción más intensa ocurre cuando hay un cambio en un dipolo, por lo que las vibraciones asimétricas son las que llevan a absorciones más intensas ¹.

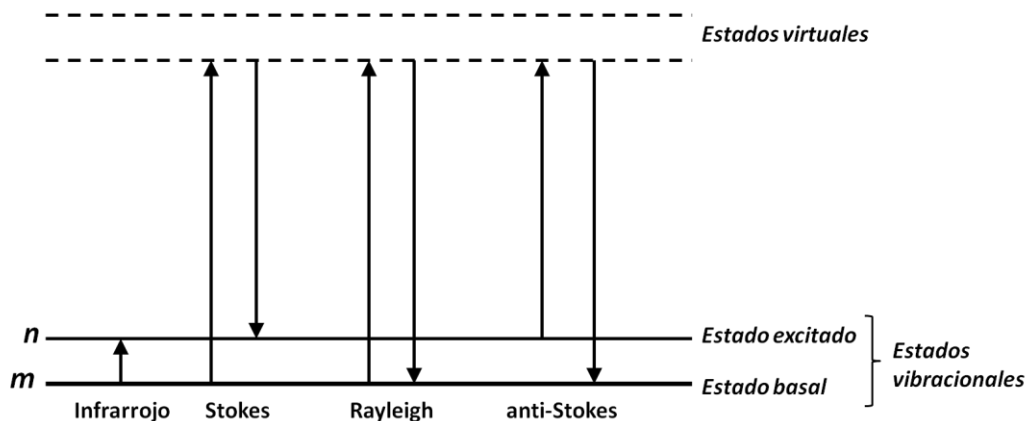


Figura 2.2. Diagrama de los procesos de absorción de radiación infrarroja, y los procesos de dispersión Rayleigh y Raman. El estado de energía vibracional de menor energía m se muestra al pie, y otros estados de mayor energía aparecen sobre este. Dado que los estados virtuales no son estados reales de la molécula, sino que se crean cuando el láser interactúa con los electrones y causan una polarización, la energía de estos estados está determinada por la frecuencia de la luz fuente que se utilice. El proceso Rayleigh es el más intenso de los procesos de dispersión. Este no involucra ningún cambio de energía y como consecuencia la luz retorna al mismo estado energético. El proceso de dispersión Raman desde el estado basal m conlleva a una absorción de energía por la molécula, y su promoción a un estado energético excitado n . Esta es la dispersión Stokes. No obstante, debido a la energía térmica, algunas moléculas pueden estar presentes en un estado excitado tal como n en la figura. La dispersión desde estos estados al estado basal m se conoce como dispersión anti-Stokes. Nótese que tanto la espectroscopía infrarroja como la Raman miden la diferencia energética entre m y n .

Se trata de un proceso inherentemente débil, en el cual sólo 1 de cada $10^6 - 10^8$ fotones que son dispersados, es dispersado inelásticamente. Pero luego en la práctica no se trata de un proceso que sea poco detectado, ya que con los láseres disponibles actualmente, es posible realizar la irradiación con densidades de potencia muy elevadas. Esto es bueno, aunque como resultado otros procesos tales como la degradación de la muestra, y la fluorescencia, pueden ocurrir con cierta facilidad ³.

2.3 Estudio de la generación de los flujos de radiación Raman en el interior de una muestra

2.3.1 Consideraciones previas

Los flujos de radiación que serán descritos en los apartados siguientes se hacen para una muestra constituida por material particulado. A pesar de su naturaleza particulada, el medio se tratará como si fuese cuasi-continuo, donde los distintos procesos físicos son

independientes de cualquier coordenada local. Toda la luz dispersada se distribuye en todos los ángulos esféricos ⁴. El análisis teórico que se mostrará está basado casi exclusivamente en el modelo del transporte radiativo. Este modelo utiliza ópticas geométricas, e ignora otros procesos tales como la interferencia, difracción, o polarización de la radiación ⁵.

Las soluciones más convenientes comienzan con el modelo de dos flujos de Kubelka-Munk, del cual en 1967 Bernhard Schrader y Gerhard Bergmann reportaron su ampliación añadiendo dos flujos adicionales, en las direcciones de transmisión y reflexión, correspondientes a la radiación Raman transmitida y reflejada respectivamente ⁶. Básicamente este modelo describe la dispersión Raman de los polvos cristalinos, y será lo que se explicará de primero. El sistema de ecuaciones diferenciales que describe el balance de radiación planteado por Schrader y Bergmann, fue resuelto primero para espesores de capa arbitrarios, con la aproximación de que la absorción y la dispersión son independientes de la longitud de onda de irradiación.

El modelo de Kubelka-Munk ⁷, y su extensión a la espectroscopía Raman ⁶, funcionan bien para la irradiación uniforme difusa de grandes áreas de muestra. Entonces aquí hay un punto de discrepancia, respecto a la realidad práctica de las configuraciones de los espectrómetros Raman disponibles en el mercado: la espectroscopía Raman mediante irradiación con un láser, emplea una radiación colimada que va dirigida a un área de muestra pequeña. Por tanto, el modelo debe modificarse para estas condiciones.

Al respecto, en un trabajo de 2012 en espectroscopía de reflectancia difusa, Oelkrug et al.⁴ concluyeron que la profundidad de penetración para una incidencia normal (es decir, que la radiación viene perpendicular al plano de la superficie), puede describirse sólidamente mediante la aproximación clásica de difusión de la teoría del transporte radiativo. Posteriormente en 2013 ⁵, el mismo grupo de investigación publicó un trabajo específico en espectroscopía Raman, en el que se hizo la estimación teórica cuantitativa de las intensidades Raman reflejadas y transmitidas, tanto para irradiación colimada como para irradiación difusa, en función del espesor de la capa y las propiedades ópticas de la muestra (los coeficientes de absorción y dispersión). Los principales hallazgos teóricos de este trabajo, así como la explicación de los parámetros con los que se cuantifican las propiedades ópticas de las muestras, están descritos en detalle en varias secciones de este Capítulo. Esto se consideró fundamental para entender de la mejor manera posible, los resultados experimentales de todas las mediciones realizadas durante esta tesis. En este capítulo se incluyeron sólo los hallazgos correspondientes a una incidencia normal, la cual

se aproxima a las condiciones experimentales de una medición Raman usando un láser. Los resultados para la irradiación difusa se encuentran en la referencia original ⁵.

2.3.2 Descripción de la difusión aleatoria de los fotones para una muestra de dispersión múltiple luego de una irradiación difusa

Para la siguiente descripción, la muestra se modela como una capa de material particulado de grosor z_0 , el cual es irradiado por una de las superficies planas con luz monocromática (Figura 2.3). Según la descripción original del trabajo de Schrader y Bergmann ⁶, esta capa se extiende infinitamente hacia los lados. Las polarizaciones primarias P se mueven en la muestra por múltiples procesos de dispersión elástica y finalmente salen del disco con una probabilidad w_R como reflectancia R , y con una probabilidad w_T como transmitancia T . Una parte de P es absorbida con una probabilidad w_A , y una parte es transformada con una probabilidad w_X en excitaciones Raman X . Estas últimas sufren procesos de dispersión y absorción similares a las experimentadas por P .

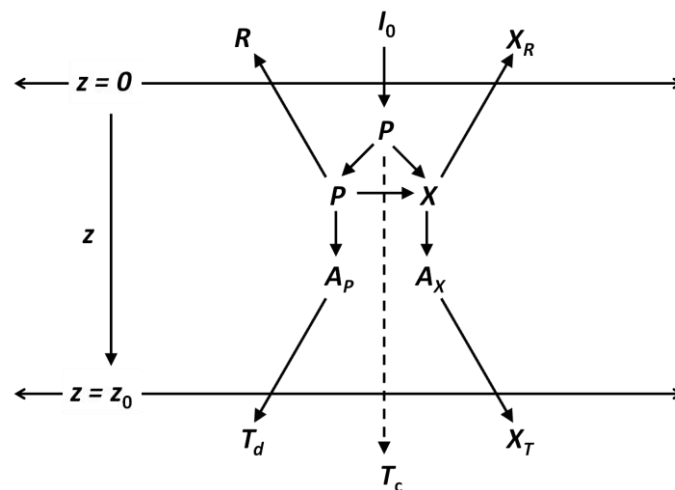


Figura 2.3. Esquema de la difusión aleatoria de los fotones a través de una capa que posee dos superficies paralelas, de grosor z_0 , las cuales se extienden infinitamente hacia los lados. La excitación primaria P se mueve aleatoriamente en esta capa dispersora, y puede ser reflejada difusivamente (R), transmitida difusivamente (T_d), transmitida directamente sin ser dispersada (T_c), absorbida (A_p), o convertida en excitaciones Raman (X). La excitación Raman también se mueve aleatoriamente en la capa, y puede ser reflejada a través del plano de irradiación de la muestra (X_R), transmitida a través del plano opuesto (X_T), o absorbida (A_x). Modificado de Oelkrug, D., Ostertag, E., Kessler, R.W. *Quantitative Raman spectroscopy in turbid matter: reflection or transmission mode?*

2.3.3 Propiedades ópticas de las muestras que influyen en las intensidades de las bandas Raman

Con el fin de entender el origen de un espectro Raman registrado, y además, que éste sea de la calidad adecuada según el fin que se le dará a la información contenida en él, es importante tomar en consideración (y además, hacer un buen uso), de las propiedades ópticas de la muestra. Las propiedades ópticas de los polvos cristalinos a tomar en cuenta son las siguientes ⁸:

- La dispersión inelástica (Raman).
- Las propiedades de absorción.
- La dispersión elástica (Rayleigh).

En general, las propiedades de absorción y emisión de una muestra están muy ligadas, y de hecho, el balance entre estos dos procesos tiene un impacto muy significativo sobre la intensidad que finalmente se detecta.

2.3.3.1 Intensidad de la dispersión Raman

La radiancia de una muestra que dispersa inelásticamente, entendiendo éste término en como la cantidad fotones que se generan luego del paso de irradiación, está dada por la ecuación (2.1):

$$L_R = \frac{I_0}{\pi r^2} d(\omega_0 - \Delta)^4 N_1 \frac{d\sigma_j}{d\Omega} d(\omega_{ref} - \Delta)^{-4} \quad (2.1)$$

Donde I_0 es el flujo radiante del rayo de excitación, r es el radio del haz del láser, ω_0 y ω_{ref} son los números de onda de la radiación de excitación, y la radiación con desplazamiento Raman respectivamente, d es el espesor de la muestra en el cual se recoge la dispersión Raman, N_1 es el número de moléculas por unidad de volumen, y $d\sigma_j/d\Omega$ es el diferencial absoluto de la sección transversal de la dispersión Raman (*Raman scattering cross-section* en inglés) para las moléculas de la muestra. L_R por tanto, es un término que depende principalmente de la muestra y el láser, y no de ningún otro parámetro instrumental. Por otro lado, la sección transversal (σ_j) sirve para caracterizar la eficiencia Raman de un dispersor, y ésta depende principalmente de la magnitud del cambio en la polarizabilidad asociado a un desplazamiento vibracional de la molécula. Se puede decir también que σ_j es

proporcional a la probabilidad de un fotón incidente, de ser dispersado como un fotón Raman, con cierto desplazamiento Raman en particular. Algo importante a destacar es que la ecuación (2.1) no contempla el valor numérico en sí de σ_j , sino que se trata del diferencial absoluto de la sección transversal de la dispersión Raman en función del ángulo sólido de recolección Ω . Esto se debe a que en la práctica sólo un pequeño rango de un ángulo sólido es observado, en una de todas las direcciones en las que dispersa la muestra. Este es el motivo por el cual se incluye el término $d\sigma_j/d\Omega$ ⁹. Las intensidades Raman además dependen de parámetros experimentales tales como la polarización y la longitud de onda de la radiación incidente. No obstante, las secciones transversales tienden a ser los mayores indicadores de la intensidad de la dispersión Raman, dado que los parámetros instrumentales mencionados anteriormente varían según cada configuración experimental¹⁰. Todos estos otros parámetros que por ahora no se van a discutir, serán explicados en el Capítulo siguiente (Instrumentación Raman).

Se puede definir entonces un coeficiente de dispersión Raman (o en otras palabras, un coeficiente de generación de la radiación Raman) como:

$$s = (\omega_0 - \Delta)^4 N_1 \frac{d\sigma_j}{d\omega} (\omega_{ref} - \Delta)^{-4} \quad (2.2)$$

Y la ecuación (2.1) se puede reescribir como:

$$L_R = \frac{0}{r^2 \pi} ds \quad (2.3)$$

2.3.3.2 Absorción de la muestra

La intensidad de la radiación de excitación, y la de la dispersión Raman, pueden verse reducidas debido a la absorción de la muestra. Esto en un experimento Raman se traduce en una reducción de la radiancia de la radiación Raman.

Es posible definir dos coeficientes de absorción, uno para la radiación de excitación (α_p) y otro para la radiación dispersada inelásticamente -Raman (α_x). Para los desarrollos que se mostrarán posteriormente, se usa la media aritmética de ambos coeficientes:

$$\alpha = \frac{(\alpha_p + \alpha_x)}{2} \quad (2.4)$$

2.3.3.3 Dispersión elástica de la muestra

Además de la posible absorción de los polvos cristalinos, la intensidad Raman que se observa está influenciada por múltiples procesos de dispersión. Se define un coeficiente de dispersión elástica, r , el cual es aproximadamente inversamente proporcional al diámetro de las partículas de los polvos cristalinos:

- Polvos gruesos, $r = 10 \text{ cm}^{-1}$.
- Polvos medianos, $r = 100 \text{ cm}^{-1}$.
- Polvos finos, $r = 1000 \text{ cm}^{-1}$.

Y en el caso de líquidos puros, disoluciones, y cristales individuales, r es aproximadamente cero.

2.4 Aplicación de la teoría del transporte radiativo a la espectroscopía Raman para una muestra irradiada difusamente

Como se dijo anteriormente, Schrader y Bergmann, en 1967 publicaron la extensión del procedimiento de Kubelka y Munk para describir la dispersión Raman de los polvos cristalinos, los cuales a la misma vez absorben y dispersan la radiación de excitación y la radiación Raman. En la descripción del procedimiento se utilizan las 3 propiedades ópticas mencionadas anteriormente:

s		r
el coeficiente de dispersión inelástica (Raman)	el coeficiente de absorción	el coeficiente de dispersión elástica

donde todos tienen dimensiones de longitud recíproca (por ejemplo, cm^{-1}).

El balance de radiación de una capa de grosor d , iluminada homogéneamente desde un lado con una radiación de excitación de intensidad I_0 , está dado por la solución del problema de valor de frontera de 4 ecuaciones diferenciales de primer orden acopladas. La Figura 2.4 muestra la ubicación de los parámetros relevantes para entender el flujo de radiación. Aquí, i y j son las intensidades intrínsecas paralelas y antiparalelas respecto a la dirección de la radiación de excitación, respectivamente; I y J son las intensidades que

emergen de las superficies, y los subíndices U y R se refieren a la radiación no desplazada, y la radiación Raman, respectivamente:

$$-di = -(r + \alpha)idx + rjdx \quad (2.5)$$

$$dj = -(r + \alpha)jdx + ridx \quad (2.6)$$

$$-di_R = -(r + \alpha)i_R dx + rj_R dx + s(i + j)dx \quad (2.7)$$

$$dj_R = -(r + \alpha)j_R dx + ri_R dx + s(i + j)dx \quad (2.8)$$

Con el fin de hacer las soluciones más sencillas, se introduce un parámetro k , que está relacionado con r y α :

$$k^2 = 2r\alpha + \alpha^2 \quad (2.9)$$

Las soluciones vienen dadas por las siguientes ecuaciones:

$$I_U = I_0 \frac{k}{(\alpha + r)\sinh kd + k \cosh kd} \quad (2.10)$$

$$I_R = I_0 \frac{s \cdot k}{\alpha} \cdot \frac{(k^2 d - r)\sinh kd + (r + \alpha) kd \cosh kd}{[(\alpha + r)\sinh kd + k \cosh kd]^2} \quad (2.11)$$

$$J_U = I_0 \frac{r \sinh kd}{(\alpha + r)\sinh kd + k \cosh kd} \quad (2.12)$$

$$J_R = I_0 \frac{sk}{\alpha} \cdot \frac{k \sinh^2 kd + (\alpha + r)\sinh kd \cosh kd - krd}{[(\alpha + r)\sinh kd + k \cosh kd]^2} \quad (2.13)$$

Asumiendo un valor constante del coeficiente de dispersión Raman (s), y del coeficiente de absorción (α), es posible estudiar el flujo de los dos tipos de radiación (Raman, y la radiación dispersada elásticamente) en las dos caras de la capa mostrada en la Figura 2.4, en función del tamaño de partícula. La Figura 2.5a muestra las intensidades Raman relativas para el modo reflectancia (J_R según la ecuación 2.13), y la Figura 2.5b muestra la reflectancia de la radiación de excitación (J_U/I_0) según la ecuación (2.12). Para estas figuras el coeficiente de absorción es igual a 0.1 cm^{-1} , un valor del orden correcto para la dispersión Raman usando como fuente de excitación un láser en el infrarrojo, en la región donde la absorción en muestras que contienen hidrógeno es posible (esto ocurre como consecuencia de usar un láser en el infrarrojo cercano, en lugar de usar un láser con una longitud de onda en el visible. De esto se hablará en el Capítulo 3). Como se puede apreciar

en la Figura 2.5a, hay un incremento en la intensidad Raman con el grosor de la muestra, el cual, para polvos finos ($r=1000$), alcanza un valor estacionario con grosores pequeños. Para partículas más grandes ($r=10$ o 100), también es posible encontrar un valor estacionario, eso sí a grosores mayores. Y muy importante: para muestras del mismo grosor, preparadas con el mismo material obtenido a distintos tamaños de partícula, teóricamente se predice que las intensidades Raman crecen con el tamaño de partícula.

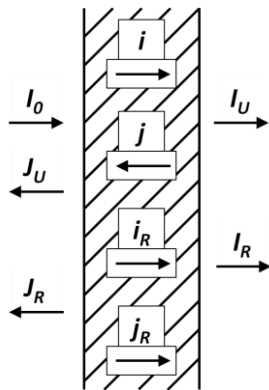


Figura 2.4. Definición de los parámetros de una muestra que absorbe y dispersa radiación elástica e inelásticamente. Reproducido de Schrader, B. y Bergmann, G. *The intensity of the Raman spectrum of polycrystalline substances*

Respecto a la reflectividad de las muestras (Figura 2.5b), se alcanzan valores estacionarios altos con grosores bajos, siendo los valores estacionarios más altos entre mayor sea el coeficiente de dispersión (r). Los valores estacionarios son: para $r=1000 \text{ cm}^{-1}$, 98.6 %;

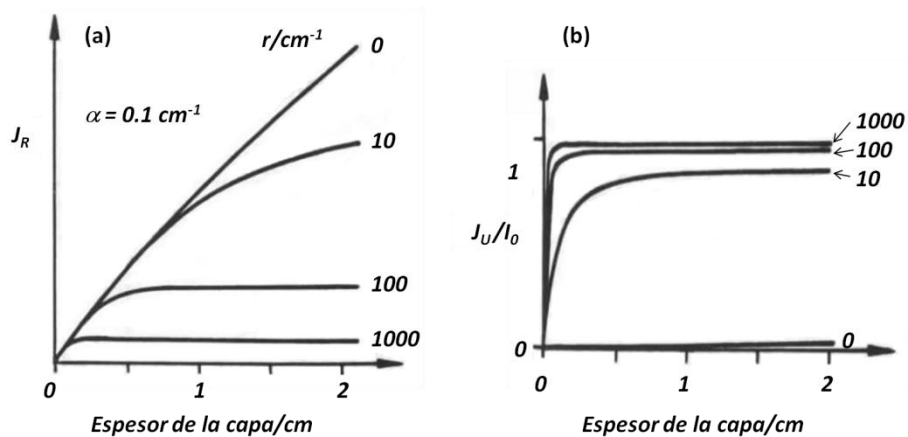


Figura 2.5. (a) Flujo relativo J_R de la radiación Raman en modo retrodispersión para una muestra de grosor 0-2 cm, calculado usando la ecuación (13) para polvos cristalinos de tamaño grueso, mediano y fino, y para una muestra líquida. Todas las muestras tienen el mismo s y $\alpha = 0.1 \text{ cm}^{-1}$. (b) Reflectancia de la radiación no desplazada. Reproducido de Schrader, B., Hoffmann, A., Keller, S. *Near-infrared Fourier transform Raman spectroscopy: facing absorption and background*

para $r=100 \text{ cm}^{-1}$, 95.6 %; y para $r=10 \text{ cm}^{-1}$, 86.8 %. En la práctica los fabricantes de espectrómetros Raman pueden sacar provecho de esta reflectividad tan alta para la mejora de la calidad de los espectros de muestras con múltiples reflexiones internas. Por ejemplo, la baja intensidad Raman de los polvos finos puede aumentarse considerablemente mediante el uso de las reflexiones múltiples de la radiación Raman y la radiación de excitación. En la práctica esto puede conseguirse con portamuestras que posean una superficie altamente reflectante.

2.5 El siguiente paso: Aplicación de la teoría del transporte radiativo para una incidencia normal

Anteriormente se dijo que la incidencia normal se acerca bastante a las condiciones experimentales de la excitación Raman usando un láser. Todo lo explicado anteriormente correspondía a las deducciones de Schrader y Bergmann publicadas en 1967. En adelante se presentan los hallazgos teóricos encontrados por Oelkrug et al.⁵, correspondientes a la publicación del año 2013, en la cual se presentan las estimaciones cuantitativas para los flujos de radiación Raman reflejada y transmitida, comparando una irradiación colimada y una difusa. Aparte de este trabajo, el cual está enfocado en la cuantificación de los flujos de las distintas radiaciones, hay otro trabajo previo (del año 2006) en el cual se estudió en detalle la migración de los fotones Raman bajo condiciones de resolución en el tiempo ¹¹.

2.5.1 Estimación de los flujos de radiación para un disco cilíndrico irradiado mediante un láser

La Figura 2.6 muestra nuevamente el esquema de la difusión aleatoria de los fotones para una muestra de dispersión múltiple, pero ahora incorpora los distintos coeficientes correspondientes a las propiedades ópticas con las cuales que se pueden describir los materiales a medir por espectroscopía Raman.

Todas las velocidades de reacción parcial que se describirán a continuación se asume que son de primer orden. También se va a asumir que la ley de Lambert Beer es válida para materiales particulados de dispersión múltiple, por lo que hay una atenuación

$$dI = -I(r + s) d = -I\epsilon d \quad (2.14)$$

donde z es una coordenada de longitud en cualquier dirección arbitraria (en cm), y α es el coeficiente de extinción (la suma de r , α_p y α_x).

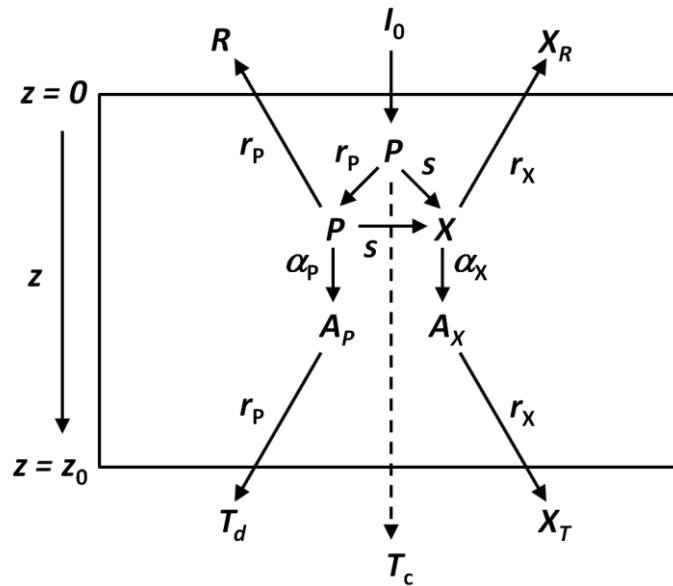


Figura 2.6. Esquema de reacción cinética. Se muestra el esquema de difusión de fotones a través de un disco cilíndrico, y se han incluido los parámetros de velocidad (coeficientes) involucrados en cada una de las posibles interacciones de las radiaciones con la materia. En el caso del coeficiente de dispersión elástica (r), en la figura se distingue uno para la dispersión elástica de la radiación Raman (r_x), y otro para el proceso elástico de la radiación en la cual no ha habido transferencia de energía durante el proceso (r_p). No obstante, en la práctica se asumirá que estos dos coeficientes son iguales (ambos tipos de radiación, una vez que han sido generadas, se dispersan elásticamente por igual). Reproducido de Oelkrug, D., Ostertag, E., Kessler, R.W. *Quantitative Raman spectroscopy in turbid matter: reflection or transmission mode?*

Los diferenciales de las probabilidades de que una parte de P se transforme en excitaciones Raman X , o que una parte de P sea absorbida, se pueden representar así:

$$dw_x = sd \tag{2.15}$$

$$dw_A = ad \tag{2.16}$$

La formación de la radiación Raman viene dada por la expresión:

$$dX = sPd \tag{2.17}$$

Los procesos físicos de dispersión que ocurren en el interior de un material, luego de la irradiación con una gran cantidad de fotones ($N_0 > 10^6$), pueden describirse desde dos enfoques:

- Se puede considerar que estos procesos son la suma de muchos rayos (fotones) reflejados y transmitidos, donde cada uno ha recorrido cierta longitud de trayectoria ($\lambda_{R,i}$ y $\lambda_{T,i}$ para la reflexión y transmisión, respectivamente). A esto se le conoce como enfoque del camino aleatorio, y en este caso se realiza el conteo del número de fotones reflejados (N_R) y transmitidos (N_T). Las señales Raman reflejadas (X_R) y transmitidas (X_T) se obtienen de esta forma:

$$X_R = \frac{S}{N_0} \sum_{i=1}^{N_R} \lambda_{R,i} e^{-\alpha \lambda_{R,i}} \quad (2.18)$$

$$X_T = \frac{S}{N_0} \sum_{i=1}^{N_T} \lambda_{T,i} e^{-\alpha \lambda_{T,i}} \quad (2.19)$$

Aquí α , el coeficiente de absorción, representa alguna absorción del fondo (*background*) que no contribuye con s , el coeficiente de dispersión Raman.

- Por otro lado, la irradiación con un láser es de tipo homogénea. La densidad de flujo P de la polarización primaria P , depende dentro de la muestra sólo de la coordenada de penetración z . La estimación de las señales reflejadas y transmitidas en función de la profundidad, se realiza bajo un enfoque analítico. Los valores de X_R y X_T para la capa de grosor z_0 , virtualmente dividida en dos partes de grosor z , y $z_0 - z$ son:

$$X_R = \frac{1}{2} S \int_0^{z_0} P(z) \frac{T_{(z)}(1 + R_{(z_0-z)})}{1 - R_{(z)}R_{(z_0-z)}} dz \quad (2.20)$$

$$X_T = \frac{1}{2} S \int_0^{z_0} P(z) \frac{T_{(z_0-z)}(1 + R_{(z)})}{1 - R_{(z)}R_{(z_0-z)}} dz \quad (2.21)$$

Las soluciones más sencillas para las ecuaciones 2.18-2.21 se obtienen para materiales “cuasi-blancos” con una absorción despreciable, $\alpha \rightarrow 0$. Por último, recordando que son de nuestro interés las estimaciones para irradiación mediante láser, aplicada a materiales en

los cuales aplica el régimen de dispersiones múltiples, en el trabajo de Oelkrug et al. (2013) se reportan las soluciones de las ecuaciones anteriores para capas muy gruesas ($J_U/I_0 \rightarrow 1$ según la nomenclatura de la Figura 2.5b) que no absorben, así como las estimaciones de otras propiedades de este tipo de muestras:

$$T_d = \frac{5}{4 + 3rz_0} \quad (2.22)$$

$$R = 1 - T_d \quad (2.23)$$

$$\langle \lambda_T \rangle = \frac{rz_0^2}{2} \quad (2.24)$$

$$\langle \lambda_R \rangle = \frac{5z_0}{3} \quad (2.25)$$

$$X_T = s \frac{5z_0}{6} \quad (2.26)$$

$$X_R = s \frac{5z_0}{3} \quad (2.27)$$

T_d se refiere a la excitación primaria P transmitida difusivamente, R es la excitación primaria reflejada difusivamente, y $\langle \lambda_R \rangle$ y $\langle \lambda_T \rangle$ se refieren a la longitud de trayectoria promedio de los fotones reflejados y transmitidos, respectivamente. Un material en el que hay múltiples dispersiones, se puede decir que tiene un alto grosor óptico, y $sz_0 \gg 1$. En este caso, la reflectancia de la radiación primaria (R en la ecuación 2.23) se aproxima a la unidad, y la transmitancia decrece hiperbólicamente con z_0 hasta cero (ecuación 2.24). Por otro lado, la reflectancia y transmitancia Raman aumentan continuamente con z_0 , aproximándose para capas gruesas a una relación $X_R/X_T = 2$ (ecuaciones 2.26 y 2.27). El que haya una elevada transmitancia Raman, es consecuencia de la elevada trayectoria promedio $\langle \lambda_T \rangle$ de la radiación transmitida, que se incrementa con z_0^2 y compensa significativamente la disminución z_0^{-1} de T_d , por lo que hay un incremento lineal de X_T con z_0 .

2.5.2 Impacto del coeficiente de absorción en la intensidad de la radiación Raman reflejada y transmitida

Los materiales completamente no absorbentes en la práctica no existen. El coeficiente de absorción puede ser tan bajo como $\alpha = 10^{-6} \text{ cm}^{-1}$, que es la magnitud para los cables de fibra óptica en el infrarrojo cercano. La Figura 2.7 muestra las intensidades Raman calculadas para materiales con absorción débil y reflectancias difusas $R_\infty > 0.9$. Para capas delgadas, las intensidades Raman reflejadas y transmitidas aumentan casi linealmente con z_0 , pero luego el incremento se hace menor. En el caso de las capas gruesas, la intensidad reflejada X_R se satura a niveles que dependen significativamente de α . Por otro lado, la intensidad transmitida X_T pasa por un máximo y luego decrece exponencialmente con z_0 hasta cero. Esta disminución tan grande de X_T con la absorción es consecuencia de la elevada trayectoria de la radiación transmitida. A pesar de lo anterior, Oelkrug et al. (2013) resaltan que desde el punto de vista práctico, la absorción puede ignorarse para espesores no mayores de 3 mm, que es lo normal para tabletas farmacéuticas, cuando la

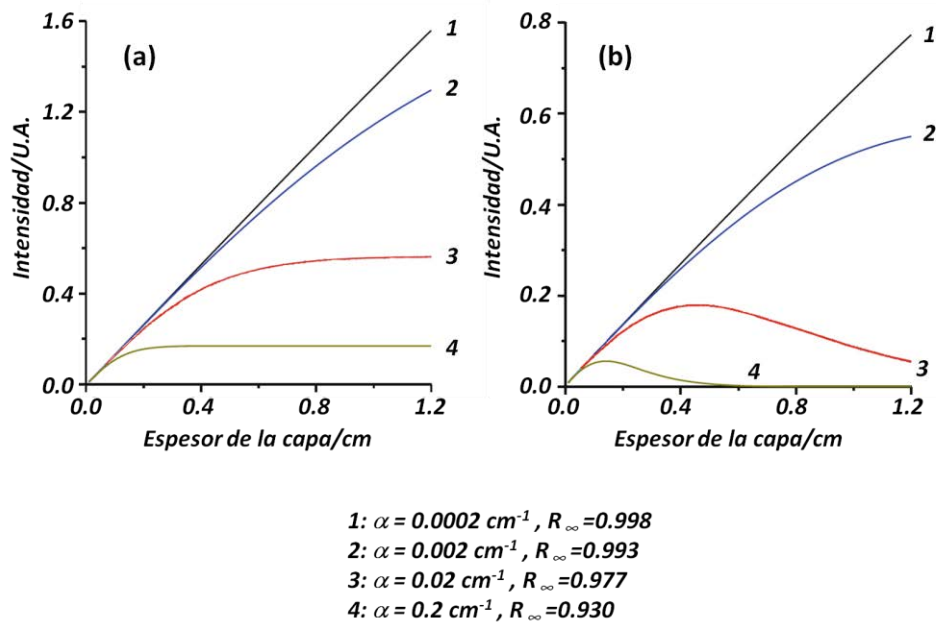


Figura 2.7. Intensidades Raman calculadas mediante las ecuaciones (2.20) y (2.21) en modo reflectancia (a) y transmitancia (b), para capas de dispersión múltiple bajo irradiación difusa. El coeficiente de dispersión elástica utilizado fue $s = 200 \text{ cm}^{-1}$, un valor común para polvos microcristalinos ¹². Se muestran las intensidades para distintos coeficientes de absorción (α , separados por un factor de 10), y su correspondiente reflectancia difusa (R_∞) para cuando $z_0 \rightarrow \infty$. Nótese las distintas escalas de las ordenadas en las dos gráficas. Reproducido de Oelkrug, D., Ostertag, E., Kessler, R.W. *Quantitative Raman spectroscopy in turbid matter: reflection or transmission mode?*

reflectancia difusa máxima excede $R_{\infty} > 0.97$. Esto se va a asumir también para los distintos materiales estudiados a lo largo de esta tesis: la absorción de los materiales medidos por espectroscopía Raman es sumamente baja y no se va a tomar en cuenta.

2.5.3 Generación axial de perfiles de profundidad de señales Raman, para materiales de dispersión múltiple que no absorben

Usando las ecuaciones 2.20 y 2.21 es posible estimar los perfiles de profundidad en los que se genera la radiación Raman emitida en modo reflectancia o transmitancia. La Figura 2.8 muestra los resultados para una irradiación con láser. Como se puede ver, el perfil de generación de X_R tiene un máximo cerca de la superficie irradiada, pero luego disminuye. Por otro lado, la señal Raman transmitida se genera principalmente en el interior profundo de la capa. El perfil de generación tiene la forma de una parábola simétrica, con el vértice en el centro de la capa. Como resultado X_T recoge principalmente la información de las regiones centrales de la capa, mientras que los extremos contribuyen muy poco a la señal. Los perfiles de generación de la radiación Raman fueron reportados en trabajos experimentales previos a la descripción teórica de Oelkrug et al. del año 2013, en los cuales se medía la resolución espacial de la espectroscopía Raman en modo transmisión y retrodispersión ^{13,14}.

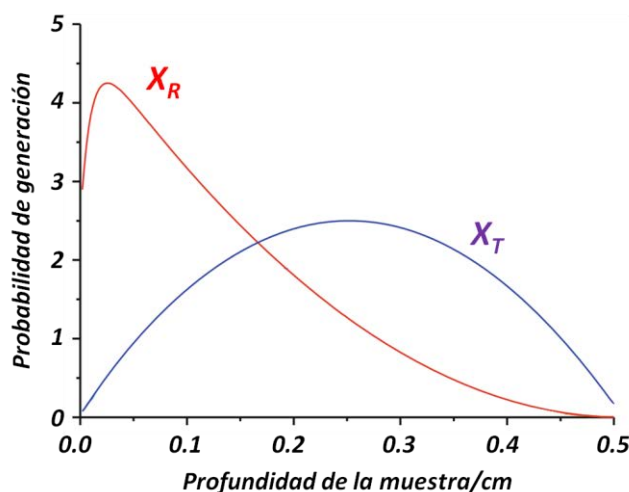


Figura 2.8. Estimación del origen de profundidad de la emisión Raman en modo reflectancia (X_R , línea roja), y modo transmitancia (X_T , línea azul), para una capa dispersora de grosor 0.5 cm, con $s=100 \text{ cm}^{-1}$ y $\mu = 0$, irradiada con radiación colimada. Nota: X_T está magnificado respecto a X_R por un factor de 2. Modificado de Oelkrug, D., Ostertag, E., Kessler, R.W. *Quantitative Raman spectroscopy in turbid matter: reflection or transmission mode?*. La figura original incluye también las estimaciones para una irradiación difusa.

2.5.4 Propagación radial de las intensidades Raman para materiales de dispersión múltiple que no absorben

La distancia entre el punto donde inciden los fotones, y el punto donde ocurre la posterior emisión de ellos, es un parámetro importante para el diseño de las unidades de detección de los instrumentos, así como para la resolución de las imágenes espectrales. Oelkrug et al. (2013) hicieron una estimación del número de fotones reflejados $N_R(\rho)$ y transmitidos $N_T(\rho)$ en función de la distancia ρ desde el eje de incidencia, así como de las longitudes de trayectoria asociadas $L_R(\rho)$ y $L_T(\rho)$. Con estas cantidades, y usando las ecuaciones (2.18) y (2.19), se pueden calcular las intensidades Raman radiales. En la Figura 2.9 se muestran las distribuciones de intensidad radial de las señales Raman reflejadas y transmitidas. El ancho radial de la señal transmitida X_T' es linealmente proporcional a z_0 , y casi independiente de r . La amplitud de X_T' es independiente de z_0 y r . La propagación radial promedio puede aproximarse a:

$$\langle \rho_{X_T} \rangle = r^{-1} + (2/3)^{1/2} z_0 \quad (2.28)$$

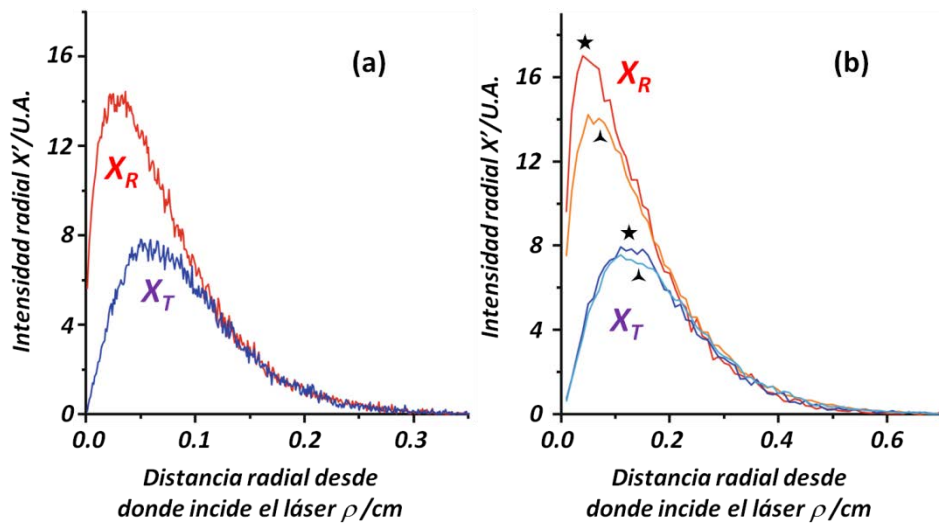


Figura 2.9. Intensidades Raman radiales calculadas en modo reflectancia y transmitancia en función de la distancia radial ρ desde el eje de incidencia. Se utilizaron las ecuaciones (2.18) y (2.19) con $N_0 = 1E7$. Se muestran los resultados para capas de distinto espesor, y usando distintos coeficientes de dispersión elástica: (a) $z_0 = 0.1$ cm, $s = 100$ cm⁻¹. (b) $z_0 = 0.2$ cm, s (★) = 50 cm⁻¹ y s (▲) = 100 cm⁻¹. Las curvas en (b) se registraron con una menor resolución radial. Nótese que ambas figuras tienen la misma escala en las ordenadas, pero distinta escala en las abscisas. Reproducido de Oelkrug, D., Ostertag, E., Kessler, R.W. *Quantitative Raman spectroscopy in turbid matter: reflection or transmission mode?*

Algo que destaca en las Figuras 2.9a y 2.9b es que la cola que se observa en todas las líneas, se extiende mucho más allá del valor promedio. Por tanto, el radio de muestra debe ser $\rho_0 \geq 3z_0$ con el fin de obtener intensidades de transmisión cuantitativamente correctas (para asegurar la captación de todas las excitaciones, incluyendo la propagación lateral). La ecuación (2.29) permite estimar la propagación radial de X_T para un rango amplio de grosores de capa y coeficientes de dispersión:

$$X'_T = \left[\frac{\sqrt{3\pi} \rho}{(z_0)^2} \exp\left(-\frac{2}{3} \frac{\left(\frac{z_0}{2} + \rho\right)^2}{(z_0)^2}\right) \right] X_T \quad (2.29)$$

La Figura 2.10 muestra la propagación radial de la transmitancia Raman X'_T para capas de dispersión múltiple que varían en su espesor (de 0.1 a 0.5 cm). En esta figura se muestra claramente que para obtener conclusiones cuantitativas de intensidad en modo transmisión, debe tomarse en cuenta el radio del área que es posible detectar ρ_D , y el grosor de la capa. Para los distintos espesores que se representan en la Figura 2.10, y con un ρ_D de 0.3 cm, esto se cumple sólo para el espesor de capa de 0.1 cm.

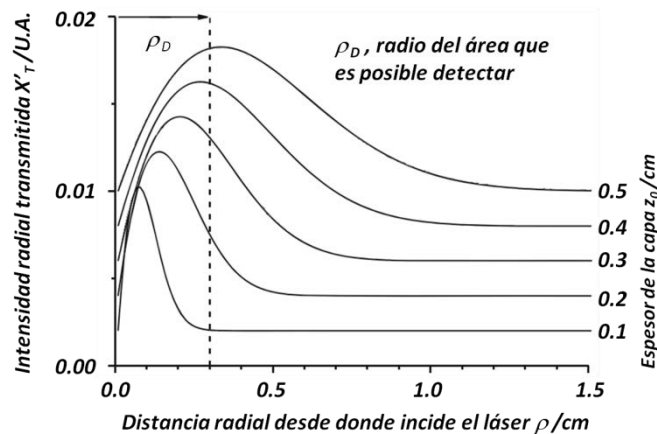


Figura 2.10. Propagación radial de la transmitancia Raman X'_T , para capas de dispersión múltiple con distinto espesor, calculadas a partir de la ecuación (29). La línea discontinua muestra el nivel que es capaz de cubrir un radio de 0.3 cm, para capas de distinto espesor. Las cinco curvas están desplazadas verticalmente. Reproducido de Oelkrug, D., Ostertag, E., Kessler, R.W. *Quantitative Raman spectroscopy in turbid matter: reflection or transmission mode?*

Por último, para describir la distribución radial en el caso de la reflectancia Raman, es necesaria una expresión de mayor complejidad que la mostrada en la ecuación (2.29) para el caso de transmitancia. Al respecto, Oelkrug et al. (2013) reportan que X'_R :

- Para distancias cortas al eje de incidencia ($r < r^{-1}$), depende principalmente de r .
- Para distancias medianas ($r^{-1} < r < z_0$), depende tanto de r y z_0 .
- Y para distancias grandes ($r > z_0$) se hace igual que X'_T (Figura 9, ver solapamiento de las líneas justo después de 0.1 cm para la Figura 2.9a, y después de 0.2 cm para la Figura 2.9b). En este caso la densidad de flujo ρ de la polarización primaria, está distribuida simétricamente al plano de la capa central ($z=z_0/2$), lo que resulta en iguales probabilidades para la reflectancia y transmitancia. A pesar de la naturaleza compleja de este caso, reportan que una buena aproximación del valor promedio de la propagación radial es:

$$\langle \rho_{X_R} \rangle \approx 0.5 z_0 \quad (2.30)$$

No obstante, la ecuación (2.30) no toma en cuenta la propagación amplia de la cola a distancias largas, que requiere radios de muestreo y aperturas del detector tan grandes como en el caso del modo de transmisión, con el fin de adquirir intensidades de reflectancia correctas.

2.6 Cierre de Capítulo

Con esto se concluye la explicación de las predicciones teóricas para los flujos de radiación Raman reflejadas y transmitidas. En esta discusión se evitó mencionar cualquier dependencia de los parámetros con la longitud de onda de excitación, la cual dependerá del tipo de láser que incorpore cada espectrómetro. Así mismo, la óptica para la recolección de la radiación Raman varía de instrumento a instrumento, y en términos prácticos se trata de una decisión que ha sido tomada previamente por el fabricante. En el siguiente capítulo se hace una descripción de las variantes de configuración de los espectrómetros Raman disponibles actualmente en el mercado.

2.7 Referencias

- (1) Smith, E.; Dent, G. *Modern Raman Spectroscopy: A Practical Approach*, First.; John Wiley & Sons, Ltd., 2005.
- (2) Esmonde-White, K. A.; Cuellar, M.; Uerpmann, C.; Lenain, B.; Lewis, I. R. *Anal. Bioanal. Chem.* **2016**, 1–13.
- (3) Ferraro, J. R.; Nakamoto, K.; Brown, C. W. *Introductory Raman Spectroscopy*, 2nd ed.; Elsevier Science (EUA), 2003.
- (4) Oelkrug, D.; Brun, M.; Rebner, K.; Boldrini, B.; Kessler, R. *Appl. Spectrosc.* **2012**, 66 (8), 934–943.
- (5) Oelkrug, D.; Ostertag, E.; Kessler, R. W. *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, 405 (10), 3367–3379.
- (6) Schrader, B.; Bergmann, G. *Fresenius' Zeitschrift für Anal. Chemie* **1967**, 225 (2), 230–247.
- (7) Kubelka, P.; Munk, F. *Zeitschrift für Tech. Phys.* **1931**, 12, 593–601.
- (8) Schrader, B.; Hoffmann, A.; Keller, S. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Spectrosc.* **1991**, 47 (9–10), 1135–1148.
- (9) McCreery, R. L. *Raman spectroscopy for chemical analysis*; John Wiley & Sons, Inc., 2000.
- (10) *Pharmaceutical Applications of Raman Spectroscopy*; Šašić, S., Ed.; John Wiley & Sons, Inc., 2008.
- (11) Parker, A. W.; Towrie, M.; Everall, N.; Matousek, P.; Hahn, T. *Appl. Spectrosc. Vol. 58, Issue 5, pp. 591-597* **2004**, 58 (5), 591–597.
- (12) Oelkrug, D.; Boldrini, B.; Rebner, K. *Anal. Bioanal. Chem.* **2017**, 409 (3), 673–681.
- (13) Everall, N.; Matousek, P.; MacLeod, N.; Ronayne, K. L.; Clark, I. P. *Appl. Spectrosc.* **2010**, 64 (1), 52–60.
- (14) Everall, N.; Priestnall, I.; Dallin, P.; Andrews, J.; Lewis, I.; Davis, K.; Owen, H.; George, M. W. *Appl. Spectrosc.* **2010**, 64 (5), 476–484.

CAPÍTULO 3

INSTRUMENTACIÓN RAMAN

3.1 Introducción

Del capítulo anterior, específicamente de la sección 2.3 sobre las propiedades ópticas que influyen en las intensidades Raman (las cuales ahora se van a identificar por el coeficiente respectivo), en resumen se puede decir que hay una propiedad que participa a favor de que se genere radiación Raman, hay una que impacta de forma negativa a la intensidad observada, y hay una que puede jugar a favor o en contra:

- a favor, el coeficiente de dispersión Raman (s), en el cual es fundamental el factor relacionado con la polarizabilidad de la molécula.
- en contra, el coeficiente de absorción (a). Si las moléculas que constituyen la muestra absorben cualquier tipo de radiación, las intensidades se van a ver reducidas.
- a favor o en contra, el coeficiente de dispersión elástica (r). Este es inversamente proporcional al diámetro de las partículas para polvos cristalinos. Entonces, entre más fino sea el polvo que se esté midiendo, las intensidades que se registran van a ser más bajas.

No obstante lo anterior, en toda la discusión que se presentó se ha omitido algo fundamental: la radiación Raman que se genera, ya sea de alta o baja intensidad, no se genera sola, sino que se requiere de una fuente láser para realizar la excitación de las moléculas y que posteriormente ocurra la dispersión Raman. La ecuación (3.1) es una versión reducida de la ecuación (2.1). La intensidad de la dispersión Raman puede definirse como ¹:

$$I = K \gamma \theta^2 \omega^4 \quad (3.1)$$

De acuerdo a la expresión anterior, la intensidad de la dispersión Raman está relacionada con la potencia del láser (γ), el cuadrado de la polarizabilidad de la molécula analizada (θ), y la cuarta potencia de la frecuencia escogida para el láser de excitación (ω). Respecto a K ,

este es un término que incluye constantes como la velocidad de la luz. Por tanto hay una propiedad molecular, la polarizabilidad, de la cual se va a derivar la información molecular; y hay dos parámetros instrumentales que pueden ser escogidos por la persona que se plantea utilizar la técnica. De estos dos parámetros, en la práctica la potencia del láser es mucho más manipulable que la frecuencia de la radiación incidente, dado que la segunda depende del láser que incorpore el espectrómetro. Se trata por tanto de una decisión que se toma en el momento de la escogencia de un instrumento específico sobre otro(s) de prestaciones similares, aunque hay instrumentos que admiten tener más de un láser instalado ².

Respecto a la selección del láser que incorpore el instrumento, no es una decisión que se pueda tomar usando como parámetro de decisión un único factor. Sólo para citar un ejemplo: dado que la dispersión depende de la cuarta potencia de la frecuencia, una manera bastante obvia para incrementar la sensibilidad Raman consistiría en el uso de la frecuencia más alta posible, que en términos prácticos se logra trabajando en la región ultravioleta (UV). Resulta que además, trabajando en esta región, el problema de la fluorescencia afecta menos que cuando se usa excitación visible. Hasta aquí todo bien. Sin embargo, sucede que muchos compuestos absorben radiación UV. Esto, y la alta energía de los fotones en esta región, se traducen en que hay un riesgo considerablemente alto de degradar la muestra por quemado. El espectro adquirido también puede ser bastante distinto a un Raman normal, debido a la resonancia con cualquier transición electrónica que pueda llevar a una absorción, pudiéndose observar cambios en las intensidades relativas de las bandas (un incremento por resonancia ocurre cuando la energía de los fotones de excitación es cercana a la de la transición electrónica entre dos estados). Y aún más, los láseres en estas longitudes de onda pueden ser muy caros. Hay también un problema en particular respecto a la seguridad, dado que el láser es invisible, y la calidad de las ópticas requeridas en UV es muy alta. A pesar de todo lo anterior, debido a los avances en dispositivos ópticos tales como los diodos láser, es probable que la espectroscopía Raman UV sea más utilizada en el futuro ^{1,3}.

Anteriormente se mencionó que también existe la excitación visible. Pero además es posible realizar la irradiación con un láser en el infrarrojo cercano (NIR por sus siglas en inglés). Y sólo para mencionar un dato adicional por ahora: con un láser NIR, el problema de la fluorescencia nuevamente puede reducirse de manera significativa, en comparación a la excitación visible. De hecho, la mayoría de instrumentos que se venden actualmente incorporan un láser NIR.

Esta discusión se vuelve a quedar corta otra vez, porque no se ha hecho mención de algo tan básico como es el sistema de detección de la radiación Raman generada. La explicación de las distintas partes que conforman los instrumentos Raman es lo que se detallará en este capítulo. Se pretende que mucho de lo que se menciona en el texto, sirva para entender las decisiones que han sido tomadas por los fabricantes durante el diseño de los instrumentos, poniendo énfasis especial en lo que aplica a las configuraciones de los instrumentos usados a lo largo de esta tesis.

3.2 Geometría del instrumento Raman

Antes de entrar en el detalle de las distintas partes que conforman un instrumento Raman, es necesario traer a la práctica unos conceptos que se mencionaron en el capítulo anterior, cuando se hicieron las estimaciones cuantitativas para varios flujos de radiación a través de una capa donde hay dispersiones múltiples. Tanto para el enfoque del camino aleatorio, como para el enfoque analítico, se mostraron fórmulas para calcular la radiación Raman reflejada y transmitida. Actualmente existen a nivel comercial espectrómetros Raman de retrodispersión y de Raman por transmisión, y como parte de esta tesis se hicieron mediciones en instrumentos que operan en ambas geometrías.

Muy adelantados a su tiempo, Bernhard Schrader y Gerhard Bergmann en 1967 publicaron las estimaciones para la radiación Raman reflejada y transmitida, cuando se irradia difusamente una capa de extensión infinita ⁴. Hay que irse hasta el año 2006 para encontrar el primer trabajo experimental, publicado por Pavel Matousek y Anthony William Parker, en el cual se prueba y se compara la espectroscopía Raman por transmisión, con la geometría de retrodispersión (el cual era el modo de operación de todos los instrumentos Raman que existían hasta entonces). El campo de aplicación en el cual se hizo este primer estudio fue el análisis de tabletas farmacéuticas ⁵.

Este primer trabajo se hizo modificando un instrumento que originalmente fue diseñado para otra variante de la espectroscopía Raman por retrodispersión: la espectroscopía Raman espacialmente desplazada (*Spatially Offset Raman Spectroscopy -SORS*, por sus siglas en inglés). Un año después, un equipo de científicos de AstraZeneca publicaba el primer estudio cuantitativo con espectroscopía Raman de transmisión, en el cual se determinó el contenido de ingrediente activo de tabletas y cápsulas farmacéuticas ⁶. En este trabajo se hizo un arreglo que fusionaba dos instrumentos Raman disponibles en el

mercado en el año 2007, uno servía para irradiar la muestra, y el otro para recoger la radiación Raman transmitida.

A continuación se hace una explicación breve sobre los fundamentos de cada geometría bajo la cual puede obtenerse un espectro Raman. La Figura 3.1 muestra un esquema de cada variante de medición.

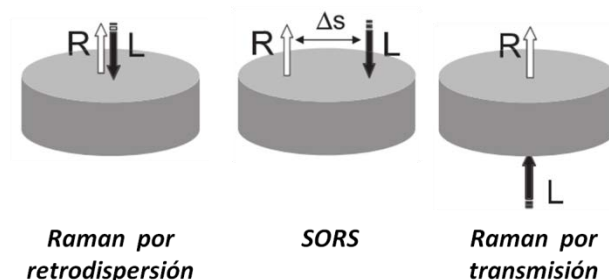


Figura 3.1. Principales geometrías de irradiación y recolección de la radiación en espectroscopía Raman. **R:** radiación Raman, **L:** radiación de excitación del láser, Δs : desplazamiento espacial. Tomado de Matousek, P., Everall, N., Littlejohn, D., Nordon, A., Bloomfield, M. *Dependence of Signal on Depth in Transmission Raman Spectroscopy*.

3.2.1 Espectroscopía Raman por retrodispersión

Como se dijo anteriormente se trata de la geometría más antigua bajo la cual se han fabricado los espectrómetros Raman. Hasta los años 2006-2007 se habían publicado diversos trabajos en los que se demostraba la utilidad de la espectroscopía Raman en diferentes áreas del desarrollo de productos farmacéuticos, tales como el seguimiento de una síntesis ^{7,8}, la determinación de los polimorfos de un API ⁹, el monitorio de un proceso de mezcla ¹⁰, y la determinación del contenido de ingrediente activo en tabletas ¹¹. No obstante lo anterior, en algunos trabajos ya se mencionaba que una desventaja significativa de esta técnica, cuando se aplica al análisis de productos farmacéuticos, está relacionada con el posible error por submuestreo de muestras sólidas (por ejemplo, una tableta) ^{11,12}. Esto se debe a que, cuando se hace una irradiación con un láser NIR, la profundidad de penetración de la luz es muy baja, por lo que sólo una pequeña fracción de volumen está siendo analizada; y entonces dada la heterogeneidad de las mezclas en polvo y tabletas, la precisión del método comúnmente está limitada por el submuestreo ⁶. Con el fin de disminuir el impacto de tal limitación, se había propuesto el uso de portamuestras giratorios, así como el uso de sondas de fibras múltiples con el fin de extender el diámetro de irradiación hasta el tamaño de la tableta.

En varios libros específicos de espectroscopía Raman ^{1,13,14}, cuando se describe la manera en la que se irradia la muestra y posteriormente se recolecta la radiación dispersada inelásticamente, se habla de configuraciones de 90° y 180°. Los autores en estos casos ni siquiera ven la necesidad de aclarar que esta clasificación aplica cuando se habla de instrumentos retrodispersivos. De estos 3 libros, sólo uno ¹⁴ es posterior al primer trabajo experimental con Raman por transmisión ⁵, y en éste no se menciona nada sobre esta técnica, que en aquel entonces estaba siendo recién re-descubierta. El término retrodispersión puramente se refiere a la configuración de 180° (Figura 3.2a); en este caso el láser se suministra a través de un lente recolector, y posteriormente la radiación dispersada se recolecta de vuelta a través de él. La configuración de 90° (Figura 3.2b) implica que hay un ángulo entre el rayo de excitación, y la dirección en la que se recoge la radiación dispersada. Esta configuración se menciona en los libros pero actualmente ya no es de importancia en la práctica ¹⁴.

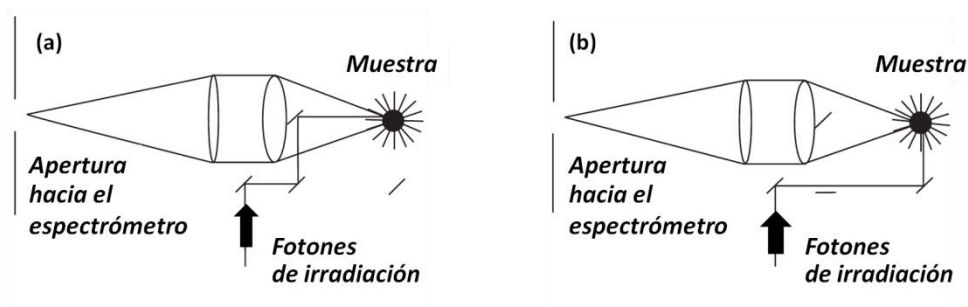


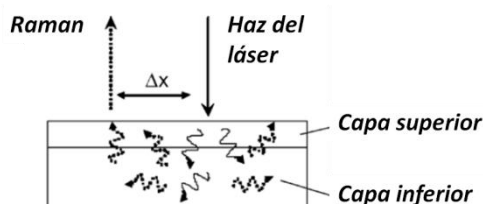
Figura 3.2. Configuraciones de (a) 180° y (b) 90° de los instrumentos Raman que recogen la radiación retrodispersada. El haz de fotones de irradiación llega verticalmente, incide sobre la muestra (el punto negro) luego de pasar por un conjunto de espejos, y posteriormente un cono de luz dispersada es recogido en el espectrómetro. Modificado de Smith, E., Dent, G. *Modern Raman Spectroscopy - A practical approach*.

3.2.2 Espectroscopía Raman espacialmente desplazada

En el capítulo anterior se mencionó que, luego de irradiar una muestra, los fotones migran en su interior con una dinámica de camino aleatorio, y su dirección es totalmente aleatoria. En el caso de la espectroscopía Raman por retrodispersión, la señal Raman se recoge justo en el mismo punto de la superficie de la muestra donde incide el láser. En este caso, el espectro contiene una contribución de señal considerablemente alta de la capa superior, debido a la mayor densidad de fotones de la sonda en este punto. Cuando se consideran profundidades de muestra mayores, esta intensidad empieza a disminuir

rápidamente, ya que la intensidad de la luz se va diluyendo progresivamente por el proceso de difusión de los fotones. La radiación Raman dispersada que se propaga de vuelta a la superficie está sujeta al mismo proceso de difusión, y esto lleva a una dilución aún mayor de la intensidad cuando se mide nuevamente en el punto de la superficie donde incide el láser. Dicho en otras palabras, los fotones Raman que se generan muy por debajo de la superficie, es muy poco probable que migren de regreso al mismo punto exacto sobre el que está el haz incidente, en comparación a aquellos que se han generado en la superficie cerca del punto de incidencia.

La variante SORS de la espectroscopía Raman fue presentada en el año 2005 por Pavel Matousek y colaboradores¹⁵, y se basa en el registro de los espectros Raman de regiones espacialmente desplazadas, en distinto nivel, del punto de incidencia del láser sobre la superficie de una muestra que dispersa radiación difusamente (Figura 3.3). Cuando se recoge la radiación Raman desde un punto desplazado lateralmente del lugar en el que incide el láser, la intensidad del haz incidente se va distribuyendo aleatoriamente hacia los lados del punto de incidencia, a lo largo de todo el espesor de muestra. Por tanto, la señal Raman emitida que se detecta en la superficie, para cierto desplazamiento desde el punto de incidencia, contiene una mayor proporción de la señal generada a profundidades mayores, que si se tratase de un espectro obtenido sin desplazamiento lateral. Dado que el punto de recolección de radiación está desplazado respecto a la posición del láser, la contribución al espectro de la capa superior disminuye mucho más rápido que para las capas más internas, debido a que los fotones Raman que se generan más profundamente dentro de la muestra, son más propensos a migrar lateralmente antes de ser emitidos de vuelta a la superficie de la muestra.



Espectroscopía Raman por retrodispersión: $\Delta x = 0$
Espectroscopía Raman espacialmente desplazada: Δx es variable

Figura 3.3 Principio de la espectroscopía espacialmente desplazada (SORS). Reproducido de Matousek, P. Clark, I.P., Draper, E.R.C., Morris, M.D., Goodship, A.E., Overall, N., Towrie, M., Finney, W.F., Parker, A.W. *Subsurface probing in diffusely scattering media using Spatially Offset Raman Spectroscopy*.

En la práctica, mediante la recolección de un conjunto de espectros a distintas distancias del punto de irradiación, y con un posterior procesamiento de ellos usando alguna técnica de análisis de datos multivariable, es posible extraer aproximaciones de los espectros Raman para distintas profundidades ¹⁵. Algunas de las primeras aplicaciones del método SORS incluyen la tomografía Raman de medios turbios ¹⁶, y el análisis no invasivo de huesos en muestras animales y cadáveres mediante espectroscopía Raman ¹⁶.

Durante el desarrollo de los experimentos de esta tesis no se hicieron mediciones aplicando esta técnica, sin embargo se consideró su inclusión dentro del marco teórico, por ser el precedente de la técnica que se explicará en la siguiente sección.

3.2.3 Espectroscopía Raman por transmisión

La espectroscopía Raman por transmisión puede considerarse como un caso especial de SORS en el cual el láser, y el punto de recolección de la radiación dispersada inelásticamente, se encuentran en los lados opuestos de la muestra. El primer trabajo experimental en Raman por transmisión fue publicado en el año 2006 ⁵, un año después de la presentación de la variante espacialmente desplazada de la espectroscopía Raman (SORS). El concepto de la geometría de transmisión no permite la posibilidad de separar las distintas capas que pueden constituir una muestra en sus componentes individuales (lo que sí es capaz de resolver el método SORS), pero en su lugar, lo que permite es extraer información sobre el contenido del volumen de una muestra. A continuación se hará una mención de los fundamentos que sostienen esta afirmación.

Tal como se hizo para la explicación del método SORS, para comprender el origen de la señal Raman transmitida es necesario hacer la comparación con la técnica mayormente usada hasta aquel momento: la espectroscopía Raman por retrodispersión. En un trabajo publicado en 2002, Wang et al.¹⁷ estudiaron experimentalmente la dependencia de la intensidad de la señal Raman con el espesor de muestra para tabletas farmacéuticas. Entre otros hallazgos ellos reportaron que para muestras que no absorben, el incremento progresivo en el grosor de la tableta producía un aumento en el total de la radiación Raman retrodispersada hasta que se llegó a los 15 mm de espesor (recogiendo la radiación en el mismo punto donde incidía el láser). En este trabajo únicamente se medía la intensidad de la radiación Raman en función del espesor, pero no se distinguía entre la fracción del incremento en la señal Raman debida al aporte que las capas que se iban añadiendo hacían (por la generación de fotones Raman a profundidades mayores cada vez

mayores), de un segundo componente que podría justificar el incremento en la señal con espesores tan altos (ninguna tableta tiene un espesor de 1.5 cm). Este otro componente tiene que ver con los fotones Raman generados a poca profundidad, que se evitó que fuesen perdidos en la interfaz muestra-aire mediante la adición de estas capas extra por la parte de atrás, y por tanto se les forzaba a permanecer dentro de la muestra.

Con el fin de introducir la espectroscopía Raman por transmisión, Matousek y Parker ⁵ hicieron unas estimaciones mediante simulaciones Monte Carlo para monitorear el origen de los fotones Raman dentro de una muestra, comparando las geometrías de retrodispersión y transmisión. En el experimento se tiene un espesor de muestra total de 4 mm, en la que hay además una capa de 0.5 mm que se va moviendo de extremo a extremo; esta capa da un espectro distinto al de la parte mayoritaria. Se supuso un diámetro de irradiación de 6 mm, y el mismo diámetro de apertura para la recolección de la radiación (tanto para la transmitida como para la retrodispersada). Se asumió que la absorción de los fotones es insignificante, y con el fin de tener una suficiente cantidad de fotones Raman generados en el modelo, se estableció una conversión de 1 fotón Raman por cada 100 fotones de la sonda, lo cual es muy alto pero solo afecta el número absoluto de fotones y no las dependencias espaciales (o sea, de donde provienen). Por último, los tamaños de partículas que se asumieron en el modelo están entre los 10 y 20 μm .

La Figura 3.4 es una reproducción de los resultados encontrados en esta simulación para ambas geometrías. Los datos muestran que aún para un diámetro de apertura de recolección tan amplio, la geometría de retrodispersión tiene una tendencia

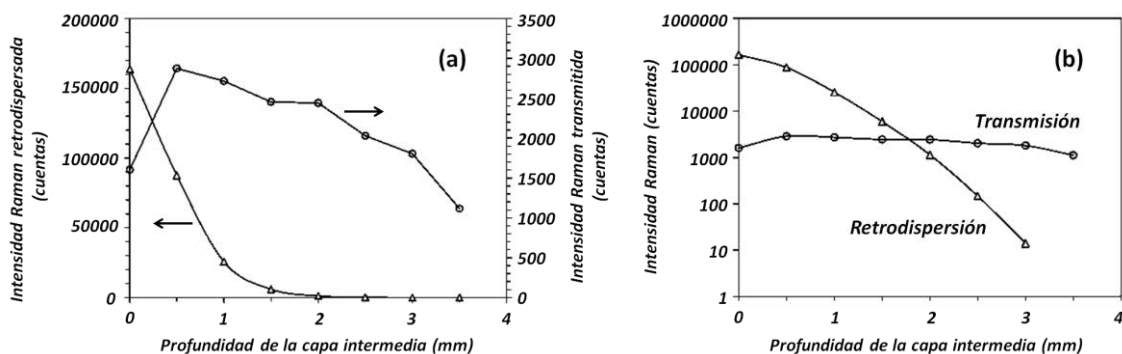


Figura 3.4 Intensidades Raman calculadas para las geometrías de transmisión y retrodispersión, versus la profundidad de una capa intermedia de cierta impureza en un medio similar al de una tableta farmacéutica. Los resultados se muestran en gráficas (a) lineales y (b) logarítmicas de base 10. Reproducido de Matousek, P. y Parker, A.W. *Bulk Raman Analysis of Pharmaceutical tablets*.

exageradamente alta hacia las capas superficiales de la muestra. El desplazamiento de la capa de 0.5 mm, desde la superficie hasta una profundidad de 1.5 mm redujo su intensidad a tan solo 3 %; luego con la representación logarítmica se puede ver que a una profundidad de 3 mm, la señal Raman que se origina de la capa de 0.5 mm cae 4 órdenes de magnitud respecto a una profundidad cero. Por otro lado, la geometría de transmisión muestra una dependencia débil en términos comparativos, respecto a la posición de la capa de 0.5 mm dentro de la muestra. Entre 0 y 3.5 mm, su señal varía sólo por un factor de 2. La disminución en la sensibilidad tanto en la cara frontal como en la parte trasera se atribuye a la pérdida de fotones del láser y Raman hacia la interfaz muestra-aire. Este es el motivo por el cual la geometría de transmisión representa una manera sustancialmente más uniforme de examinar el interior de una muestra, en comparación con la geometría de retrodispersión ⁵.

Sólo por criticar algo de la geometría de transmisión: es posible decir que en este caso hay una tendencia débil hacia las capas internas en los espectros adquiridos. No obstante, esto sería irrelevante para la mayoría de las formulaciones farmacéuticas a menos que se trate de una muestra altamente heterogénea, como podrían ser las tabletas multinúcleo, o tabletas conformadas por múltiples capas. Estos casos deben considerarse con más detenimiento, sin embargo se ha propuesto el uso de un diodo de fotones, el cual es un elemento óptico capaz de aumentar en general la transmisión de señales Raman, para reducir la magnitud de esta tendencia leve hacia las partes centrales de la muestra ¹⁸.

Respecto a la estimación del origen de la señal Raman para el modo retrodispersión, el modelo reveló que un incremento en el grosor de la tableta, al pasar de 1 a 4 mm, produce un aumento del 58 % en la señal detectada. Esto podría interpretarse erróneamente como si la señal Raman extra (que corresponde al 37 % de la señal Raman general observada para una tableta de 4 mm), ha sido originada en los 3 mm de grosor extra que se pusieron debajo de la capa de 1 mm. Sin embargo, el análisis de una capa de 4 mm muestra claramente que en realidad, el 88 % de la señal Raman es generada en la capa superior de 1 mm, y sólo el 12 % se origina dentro de los 3 mm de espesor restantes. Esto se debe a que la capa de 3 mm no sólo contribuye con su propia señal Raman, sino que además previene la pérdida de los fotones generados en la capa de 1 mm, que podrían escaparse por la parte de atrás a la interfaz muestra-aire. Por tanto, el incremento en la señal por la adición de la capa de 3 mm se debe a los fotones Raman generados en la superficie que van de regreso a las capas superiores de la muestra, donde pueden salir dirigiéndose al elemento de recolección del instrumento. De la misma manera, los fotones de excitación

pueden reingresar a la muestra, incrementándose la probabilidad de que estos generen más fotones Raman dentro de la capa de 1 mm.

Matousek y Parker reportaron en su trabajo los resultados correspondientes a simulaciones Monte Carlo, pero también como se dijo al inicio del capítulo, los resultados de mediciones experimentales en Raman por transmisión luego de modificar un instrumento SORS. La muestra era una bicapa, donde una era de paracetamol (abreviado P, 3.9 mm de grosor), y la otra estaba constituida por trans-stilbeno (abreviado T, 2 mm de grosor, la cual representa una hipotética impureza en una tableta de paracetamol). En estos experimentos ellos encuentran que la geometría de retrodispersión es sensible sólo a la cara irradiada, mientras que la de transmisión es insensible respecto a la ubicación de una capa de una posible impureza. En cualquiera de las dos disposiciones de la bicapa (P/T, o T/P), la capa T es identificable en una proporción acorde a la composición de la tableta. En términos prácticos este resultado es muy relevante, ya que si una tableta de paracetamol tiene una capa gruesa de una impureza en su parte trasera, el alcance convencional por retrodispersión no sería capaz de detectar su presencia. Por otro lado, la geometría de transmisión es capaz de revelar la presencia de la capa indistintamente de la posición de esta ⁵. Una manera de trabajar en el lado seguro en el modo retrodispersión, consiste en irradiar las dos caras de las tabletas; aunque nuevamente, en función del espesor de la tableta, si la impureza se encuentra en su interior profundo tampoco será detectada con esta estrategia.

Finalmente, las intensidades registradas en un espectro Raman por transmisión, en comparación al modo retrodispersión para la medición de una misma muestra, son considerablemente menores en el primer caso. Esto no es necesariamente malo. Debido al tipo de detector que incluyen los espectrómetros Raman por transmisión disponibles actualmente en el mercado, el cual es un dispositivo de carga acoplado (CCD por sus siglas en inglés, que será explicado posteriormente en este capítulo), la reducción en la intensidad de la señal puede ser beneficiosa respecto al tiempo de adquisición necesario para la medida, ya que debe tenerse en cuenta el nivel de saturación del detector que resulte dependiendo del tipo específico de tabletas. La geometría de transmisión admite además el uso de áreas de iluminación amplias, por lo que se pueden usar potencias de láser considerablemente altas sin dañar la muestra. Esto representa otra estrategia para reducir aún más los tiempos de exposición durante la medición de las muestras ⁵.

3.3 Componentes principales de un instrumento Raman

La Figura 3.5 muestra un diagrama muy sencillo que esquematiza los componentes de un instrumento Raman. El procedimiento normal empieza por la iluminación de una muestra con el haz de un láser. La radiación dispersada que se genera se recoge con un lente y pasa al espectrómetro, donde se separan los fotones de distinta energía que vienen de la muestra. Aquí mismo también hay un paso de filtrado de otras radiaciones no deseadas, y entonces la radiación de interés finalmente se dispersa sobre el detector. Los avances en la funcionalidad de los distintos componentes han permitido que cada vez surjan más aplicaciones de la espectroscopía en diversos campos. A continuación se presenta una explicación sobre cada uno de ellos.

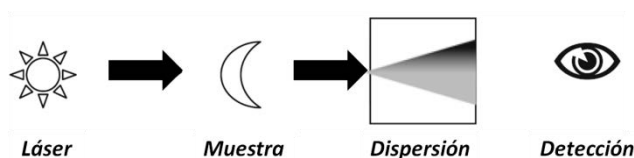


Figura 3.5 Componentes simplificados de un instrumento Raman. Reproducido de LaPlant, F. *Lasers, spectrographs and detectors*, en *Emerging Raman Applications and Techniques in Biomedical and Pharmaceutical Fields*.

3.3.1 Láseres

En la escogencia del láser es fundamental hacer una estimación de si las muestras que se pretenden analizar, pueden mostrar fluorescencia como resultado del paso de excitación. Considerando el rango del espectro electromagnético en el que se encuentran las longitudes de onda de los láseres que pueden estar incorporados en los sistemas Raman, es posible agruparlos en tres grupos. La Figura 3.6 muestra la correlación de la longitud de onda de excitación con la eficiencia relativa de la dispersión, la cual se generó variando el dato correspondiente a ω^4 de la ecuación (3.1) y manteniendo los otros parámetros constantes. En esencia, esta relación muestra que la sensibilidad del espectro Raman está directamente relacionada con la longitud de onda de excitación.

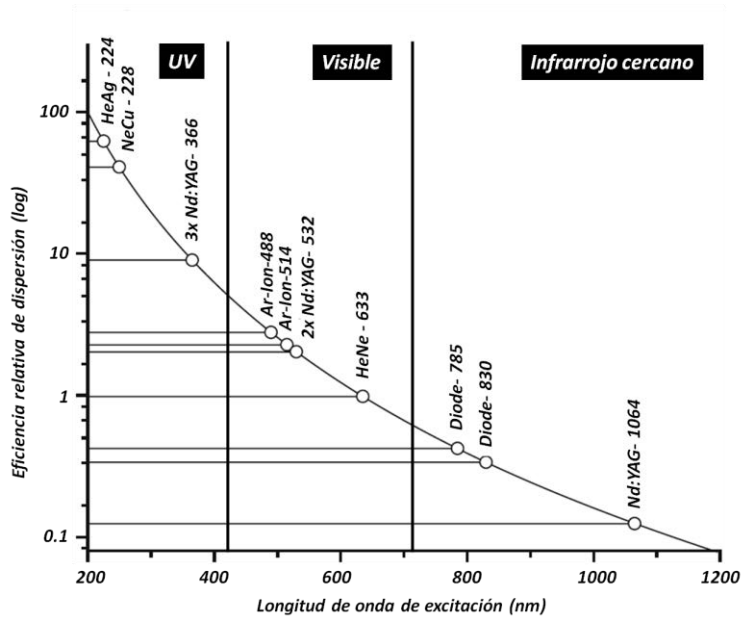


Figura 3.6 Correlación de la longitud de onda del láser y la intensidad de la dispersión. Modificado de LaPlant, F. *Lasers, spectrographs and detectors, en Emerging Raman Applications and Techniques in Biomedical and Pharmaceutical Fields.*

Antes de entrar en el detalle de cada uno de los tipos de irradiación bajo los cuales se puede generar la radiación inelásticamente dispersada en los instrumentos Raman, se va a explicar en términos prácticos cuál es la repercusión del fenómeno de la fluorescencia en la adquisición de un espectro Raman.

3.3.1.1 Fluorescencia

La fluorescencia es un fenómeno que ocurre e interfiere con la medición de un espectro Raman. Se trata de un proceso muy similar a la dispersión Raman, pero que está basado en un mecanismo distinto ¹⁹:

- El efecto Raman puede tener lugar para cualquier frecuencia de luz incidente, siempre y cuando haya un cambio en la energía de ésta, al haber una transferencia energética del fotón a la molécula (en el caso de la dispersión Stokes).
- Por su parte, la fluorescencia está íntimamente unida a una frecuencia o longitud de onda específica de excitación, lo que significa que ésta se va a desplazar al variar la longitud de onda del láser. Adicionalmente, el efecto de blanqueo de la fluorescencia, el cual se refiere a su disminución debido a la irradiación luego de un periodo de tiempo, hace que las señales de fluorescencia fluctúen en el rango de longitudes de onda.

La Figura 3.7 muestra la relación entre las regiones espectrales Raman que se pueden obtener con láseres que emiten a distintas longitudes de onda (que corresponden a las

flechas, y las zonas rectangulares marcadas a la derecha de cada una), y la variación de la fluorescencia nativa * que podría esperarse en un amplio intervalo de longitudes de onda, para una gran variedad de materiales naturales ²⁰. Los datos de esta figura fueron generados a partir de un estudio en el que se prueban distintos láseres para obtener el espectro Raman de muestras sumamente excepcionales: meteoritos de Marte ²¹; no obstante la superposición de ambos fenómenos de la radiación (Raman y fluorescencia), en función de la longitud de onda de irradiación es interesante. La curvatura de la representación de la fluorescencia es resultado del efecto de blanqueo de la fluorescencia. En el trabajo de los meteoritos, la longitud de onda mayor con la que se midieron las muestras fue de 830 nm. Sin embargo, aún para este valor, las muestras medidas presentaban una fluorescencia sumamente elevada, al punto de opacar completamente las emisiones Raman. Entonces se propone el uso de láseres de longitud de onda mucho menor. Por debajo de 270 nm estos materiales naturales no fluorescen; pero además, cuando la excitación se hace por debajo de 250 nm, existe una zona libre de fluorescencia por delante de la longitud de onda de excitación, en la cual se pueden observar los espectros Raman.

Algo importante a destacar en la Figura 3.7, es que hay una longitud de onda por encima

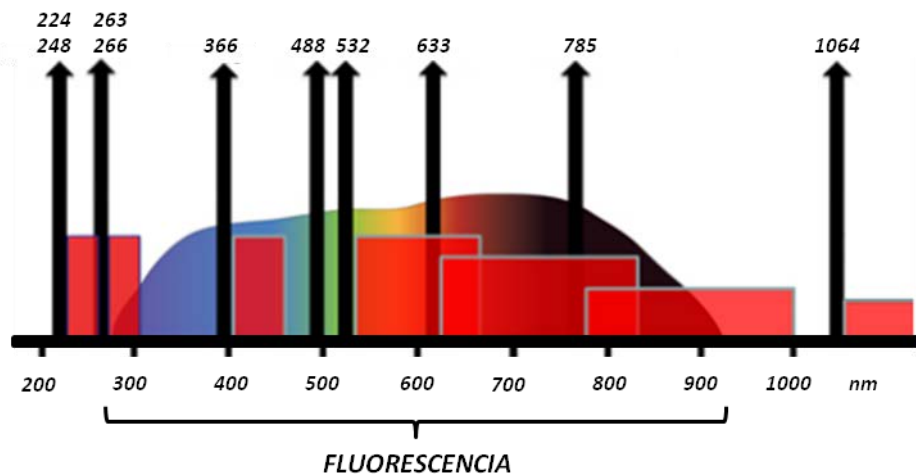


Figura 3.7 Representación de las regiones espectrales Raman (rectángulos rojos), y la región espectral de la fluorescencia nativa (silueta multicolor), en conjunto con la longitud de onda de emisión de láseres comunes. Tomado de Zhou, P. *Choosing the most suitable laser wavelength for your Raman application*.

* El término fluorescencia nativa se refiere a sustancias que no requieren de un paso de marcado para emitir fluorescencia, por lo que lo hacen naturalmente ²¹. En el contexto del trabajo²⁰, se aplica la fluorescencia nativa para el caso de una inducción del fenómeno mediante un láser, para que sea comparable a la inducción de la radiación Raman mediante un láser.

de los 1000 nm en la que tampoco hay un efecto de la fluorescencia, y donde también es posible obtener un espectro Raman. En la práctica se pueden hacer mediciones con un láser de 1064 nm, no obstante los instrumentos que operan a esta longitud de onda tan alta, requieren un detector completamente distinto al necesario cuando se trabaja con cualquiera de las otras longitudes de onda incluidas en esta figura. Los distintos detectores que pueden incorporar los instrumentos Raman serán explicados en secciones posteriores de este capítulo.

Finalmente, antes de introducir los distintos tipos de excitación posibles, es importante aclarar que el color de la muestra no es una guía para saber si una muestra va a presentar fluorescencia. En la literatura aparecen reportados casos de cristales blancos y claros que producen fluorescencia a todas las longitudes de onda de irradiación ¹. Lo que sí es un hecho es que la absorción de las muestras coloreadas puede reducirse al irradiar con un láser de longitud de onda mayor ²².

3.3.1.2 Excitación en el infrarrojo cercano.

En el caso de que la probabilidad de fluorescencia sea alta, los láseres NIR son la mejor opción. Existen varios tipos de láser que emiten a una longitud de onda lo suficientemente alta para que el efecto de la fluorescencia se ve reducido. Algunas de las líneas que se utilizan en los instrumentos disponibles a nivel comercial actualmente son:

- 785 nm: se trata de un diodo láser. Este tipo de láser está basado en la emisión óptica de uniones de semiconductores. Se caracterizan por un diseño compacto, bajo coste, y permiten obtener una respuesta Raman adecuada para un rango considerable de muestras. 785 nm es la longitud de onda encontrada más comúnmente en los trabajos en espectroscopía Raman, ya que en la práctica representa un buen compromiso entre la fluorescencia y la eficiencia Raman.

- 830 nm: también corresponde a la emisión de un diodo láser. Un láser a esta longitud de onda es útil para muestras que presentan una fluorescencia inaceptable a 785 nm. Al moverse de un láser de 785 nm a uno de 830 nm, lo que se está haciendo es hacer la excitación aún más roja. Esta reducción en la fluorescencia puede ser útil para la medición de tejidos biológicos ²³.

- 1064 nm: esta línea es emitida por un láser Nd:YAG (acrónimo del inglés *neodymium-doped yttrium aluminium garnet*). El dispositivo posee óxido de itrio y aluminio cristalino

cuya red hace de anfitrión, ya que está dopada con neodimio, el cual hace de huésped, formando la especie $\text{Nd:Y}_3\text{Al}_5\text{O}_{12}$ (una variedad de granate). Este tipo de láser es usado en los instrumentos Raman de transformada de Fourier ²⁴.

Es importante mencionar que el efecto de la fluorescencia sobre los espectros adquiridos usando un láser de 1064 nm, es sensiblemente menor en comparación a las otras dos longitudes de onda mencionadas anteriormente. Pocas moléculas tienen estados excitados lo suficientemente bajos en energía para dar fluorescencia luego de irradiar con un láser de 1064 nm. Se trata eso sí de la irradiación más afectada por la ley de la cuarta potencia según la ecuación (3.1); no obstante, dado que la radiación de excitación no es absorbida tan eficientemente en la mayoría de muestras (como ocurre con la radiación visible), es posible usar potencias de láser relativamente altas (hasta 2 W). Como se dijo en la sección 3.3.1.1, los instrumentos con un láser de 1064 nm requieren un sistema de detección distinto, el cual es un interferómetro basado en transformada de Fourier (igual a los usados en los espectrómetros infrarrojos).

3.3.1.3 *Excitación visible*

Para muestras que presentan una fluorescencia débil, los láseres con líneas en el rango de 470-650 nm son los preferidos. Se trata de láseres con excitación en el visible. Están basados en la especie Ar^+ , aunque hay otros tipos como el láser de He-Ne ó de Kr^+ . En general, los láseres con excitación en el visible normalmente permiten obtener una mejor relación señal/ruido en los espectros adquiridos, y están acoplados a detectores baratos debido al flujo intenso de fotones Raman que hacen más simple la detección (nuevamente, debido al término de la ecuación 3.1 relacionado con la cuarta potencia de la frecuencia del láser de excitación) ¹⁴. La gran desventaja cuando se considera la irradiación en el visible está en la excitación de la fluorescencia, que puede superponerse a la señal Raman. Debido a las potencias de láser necesarias para la excitación, es posible que el espectro registrado muestre señales de fluorescencia no sólo de la muestra bajo estudio, sino que ésta se deba a cualquier contaminación menor que sea fluorescente, las cuales aunque sean trazas pueden dar lugar a señales de fluorescencia bastante intensas ¹.

En términos de sensibilidad, los instrumentos con excitación visible son más sensibles que los instrumentos que usan un láser con excitación NIR. Estos últimos producen una cantidad relativamente pobre de señal en el detector, por lo que requieren un detector

más sofisticado y optimizado; no obstante el *background* también tiende a ser significativamente menor y como resultado la detección de la señal Raman es más limpia ¹⁴.

3.3.1.4 *Excitación ultravioleta*

Al inicio del capítulo se expuso un ejemplo en el cual se proponía como estrategia más obvia el uso de radiación UV para la excitación de la muestra, nuevamente de acuerdo a la relación mostrada en la ecuación (3.1). Otra gran ventaja de moverse a estas longitudes de onda más bajas, es que aquí la fluorescencia también se reduce de manera importante, al igual que cuando se consideran las longitudes de onda de irradiación en el infrarrojo cercano. La cantidad de fotones dispersados inelásticamente que llegan al detector se incrementa, pero eso sí, también aumenta la probabilidad de ocasionar una degradación térmica. En la práctica este tipo de irradiación tiene muchas ventajas para el estudio de sistemas biológicos, dado que en la región UV hay muchos cromóforos que ocurren naturalmente en diversas moléculas. Por tanto, es posible obtener el espectro debido a la dispersión Raman resonante en el UV para un amplio rango de muestras, sin necesidad de usar un marcado.

3.3.1.5 *Extensión de los instrumentos para una irradiación en el visible al infrarrojo cercano*

La obtención de un espectro Raman mediante irradiación en el infrarrojo cercano fue reportada por Bernhard Schrader y colaboradores en 1991, como una solución al problema de la fluorescencia en la medición de distintos tipos de muestras. En este trabajo se usaba un láser de 1064 nm, por lo que la radiación Raman se detectaba mediante un interferómetro de Michelson ²⁵. Durante algunos años los instrumentos con excitación visible y excitación NIR se diferenciaban por el tipo de detector que emplean. Sin embargo, el rango de longitudes de onda de los hasta entonces conocidos como "instrumentos visibles", se extendió con el uso de láseres NIR con líneas de excitación entre los 790 y 850 nm. El principal problema para los fabricantes de los instrumentos en el visible, es que los dispositivos de carga acoplada que incorporan carecen de sensibilidad a longitudes de onda por encima de los 1000 nm. Esto significa que los láseres que operan a 790 nm o 850 nm son efectivos, pero están muy cerca del final del rango del detector. Esto puede ocasionar una pérdida de sensibilidad para los picos de mayor frecuencia ¹.

3.3.2 Espectrómetro

La función principal del espectrómetro es permitir la separación de la luz dispersada en números de onda, con lo cual se obtiene la apariencia de un espectro Raman. Los dos tipos de espectrómetros más utilizados en los instrumentos Raman se detallan a continuación.

3.3.2.1 Espectrómetros dispersivos

Están basados en la difracción de la radiación dispersada haciendo uso de una rejilla (Figura 3.8). Este monocromador separa espacialmente los fotones de diferente energía que vienen de la muestra; el grado de separación está en función del espaciado de la ranura: entre más estrecho sea, mayor será la dispersión y más estrecha la ventana espectral observada. Acoplado a la dispersión está la resolución del instrumento, la cual explica qué tan finamente una característica espectral estrecha puede verse. Si bien esto también es función de la dispersión de la rejilla, las aperturas de entrada y salida son los factores limitantes ²³. Los monocromadores tradicionales usaban ranuras ajustables como aperturas, sin embargo en los instrumentos modernos la apertura de entrada viene dada por el diámetro de entrada de la fibra óptica, y el tamaño de pixel en la cámara CCD como apertura efectiva de salida. Esto fija la resolución límite del instrumento. Dado que la mayoría de muestras tienen anchos de línea natural relativamente amplios, los sistemas diseñados para análisis de rutina comúnmente tienen una resolución de unos pocos números de onda ²³. Es importante mencionar que en estos espectrómetros la luz es dispersada acorde a la longitud de onda y no al número de onda. El número de onda es inversamente proporcional a la longitud de onda; y la principal consecuencia de esta dispersión no lineal del desplazamiento Raman se refleja en la resolución espectral no

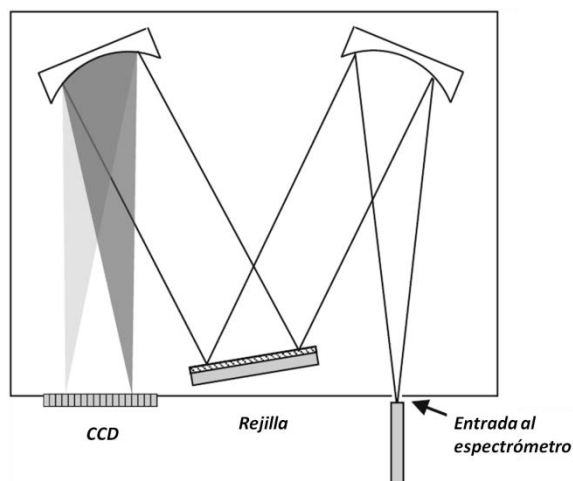


Figura 3.8 Esquema de operación de un espectrómetro dispersivo. Tomado de *Lasers, spectrographs and detectors, en Emerging Raman Applications and Techniques in Biomedical and Pharmaceutical Fields*.

constante de los espectros adquiridos con los instrumentos dispersivos ¹³.

Estos espectrómetros están incorporados en todos los instrumentos que realizan la excitación con longitudes de onda desde el UV hasta los 830 nm. Se caracterizan por su buena sensibilidad (alta relación señal/ruido), no hay necesidad de usar potencias de láser demasiado elevadas (por debajo de los 300 mW suele ser suficiente para el análisis de productos farmacéuticos), y en su funcionamiento no hay partes móviles ¹.

Existen variantes de este tipo de espectrómetro, no obstante el de rejilla única es el más sencillo y eficiente. Además de la rejilla la configuración incluye filtros de rechazo de radiación parásita. El problema de la luz parásita es un obstáculo importante para el funcionamiento adecuado de un espectrómetro, y se origina en la probabilidad de que la luz del láser reflejada entre al sistema óptico. Dado que la intensidad de esta fuente es mucho mayor que la del dispersor Raman, el detector se saturaría y la radiación Raman se volvería indetectable. Para evitar esto se desarrollaron los filtros de hendidura (*notch filter*) y de corte (*edge filters*), siendo los primeros muy utilizados en los instrumentos comerciales disponibles en la actualidad ^{1,14}.

Estos filtros están diseñados principalmente para absorber toda la luz de la frecuencia del haz incidente, la cual como se dijo anteriormente es de gran intensidad, y tiene un ancho de banda de varios cm^{-1} . La remoción de esta radiación es indispensable para la obtención de un espectro Raman, no obstante también hay una pérdida de la información espectral que está en la zona próxima a la zona de desplazamiento Raman cero (donde aparece la dispersión Rayleigh). Hasta hace 10 años se consideraba adecuado un filtro que recogiera la radiación hasta un desplazamiento de 200 cm^{-1} , sin embargo actualmente hay instrumentos, tanto de transformada de Fourier como dispersivos, que incorporan filtros que cumplen con su función, pero que lo hacen invadiendo un intervalo de desplazamiento Raman más corto (hasta los 50 cm^{-1}). El rango de frecuencias absorbidas depende de la calidad del filtro, y por tanto su escogencia es una decisión de costo/desempeño que toma el fabricante del instrumento. En muchos instrumentos este filtro puede cambiarse posteriormente, aunque puede que sea necesario hacer algunos realineamientos ópticos. En la mayoría de instrumentos, la luz dispersada se recolecta a través del filtro de hendidura y luego se enfoca en un monocromador que separa las diferentes energías de la dispersión Raman. La radiación luego se enfoca en un CCD ¹.

3.3.2.2 Espectrómetros no dispersivos

Estos espectrómetros están casi exclusivamente asociados a la modulación por transformada de Fourier (FT por sus siglas en inglés) de la señal y no incluyen la separación física de los números de onda. Son usados en los instrumentos FT-Raman con excitación de 1064 nm ¹⁴. Los datos crudos adquiridos mediante un espectrómetro no dispersivo no son un espectro sino un interferograma, el cual luego es manipulado mediante un ordenador antes de mostrarse como un espectro¹. Por tanto, los espectrómetros de transformada de Fourier miden el espectro entero simultáneamente en la forma de un interferograma, en lugar de dispersar el espectro en longitudes de onda separadas. Como se muestra en la Figura 3.9, el interferograma se genera mediante el cambio de la longitud de onda de la señal cuando varía la posición de un espejo móvil. Esta posición está monitoreada con mucha exactitud por medio de las franjas de interferencia de un láser de referencia de HeNe. La señal detectada es entonces transformada en una frecuencia y se genera un espectro que es esencialmente equivalente a la respuesta de un instrumento dispersivo ²³; en este último la frecuencia observada depende de la posición precisa de la rejilla y el detector ¹³.

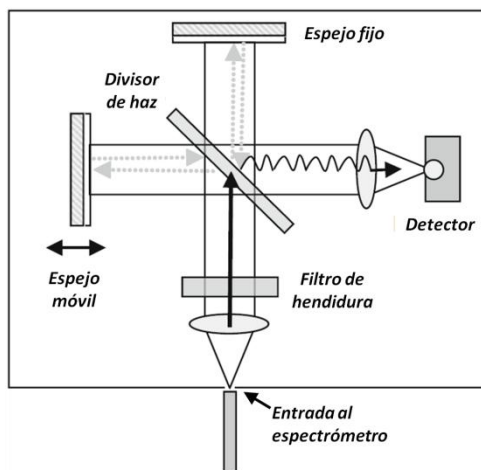


Figura 3.9 Esquema de operación de un espectrómetro no dispersivo (FT-Raman). Tomado de *Lasers, spectrographs and detectors, en Emerging Raman Applications and Techniques in Biomedical and Pharmaceutical Fields*.

La resolución límite de un instrumento FT corresponde a la distancia que se desplaza el espejo móvil; incluso un movimiento sumamente pequeño del espejo de unos pocos centímetros puede dar lugar a una resolución de décimas de número de onda. Dado que el espectro completo está contenido en el interferograma, una ventana espectral amplia puede obtenerse a una alta resolución, por lo que los instrumentos con estos espectrómetros son comúnmente usados para registrar desplazamientos pequeños. Los espectros obtenidos también tienen una exactitud de longitud de onda inherente, al estar

calibrados internamente por el láser de referencia. En la práctica esto es muy útil para la identificación de sustancias, pero por otro lado su mayor limitante es su menor sensibilidad en comparación con la configuración dispersiva ^{14,23}.

3.3.3 Detectores

3.3.3.1 Dispositivos de carga acoplada (detector CCD)

Los dispositivos de carga acoplada fueron usados por primera vez en aplicaciones de la espectroscopía Raman a finales de los años 1980, y casi simultáneamente se introdujeron los filtros de muesca holográficos. Estos dos desarrollos, en conjunto con la presentación de un instrumento FT-Raman en 1991, permitieron que el avance de la espectroscopía Raman también ocurriese fuera del ámbito académico ²³.

Las cámaras CCD están producidas de silicio (u otros semiconductores fotosensibles) que registran la señal Raman por medio de pares electrón-hueco producidos por fotones de suficiente energía, usualmente en el rango de 200 a 1100 nm. Consisten de un arreglo bidimensional de píxeles (por ejemplo, 256 x 1024), donde cada uno puede considerarse como un detector independiente. Los píxeles horizontales están calibrados de manera que correspondan al eje del número de onda, mientras que los píxeles verticales miden la fuerza de la señal Raman. En otras palabras, la imagen en la cámara CCD es una imagen electrónica de la señal Raman que es convertida en un espectro. Las cámaras CCD tienen una curva de eficiencia cuántica (Figura 3.10a), la cual muestra la probabilidad de generar

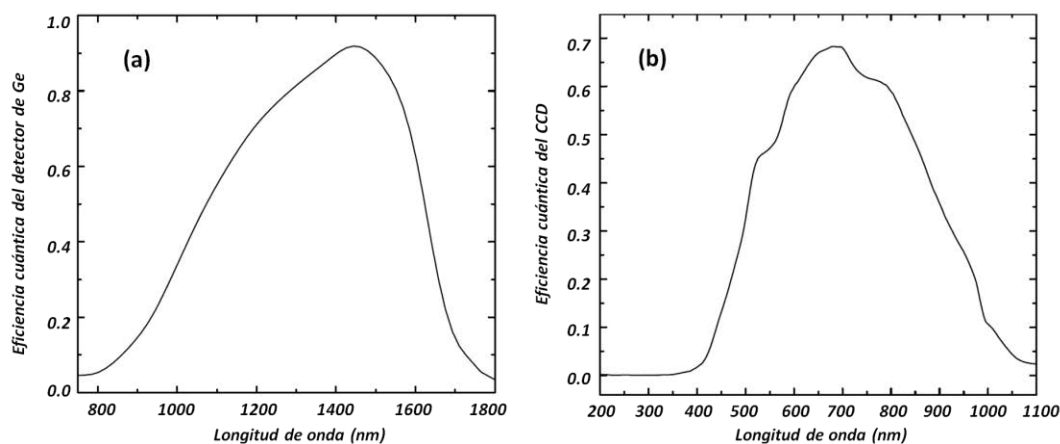


Figura 3.10 Eficiencia cuántica de un detector de Ge (a) y un detector CCD (b) en función de la longitud de onda. Tomado de Lei, H. *Effect of point defects and dislocations on electrical and optical properties of III-V semiconductors*.

un fotoelectrón en función de la energía de irradiación. Estas curvas usualmente tienen su máximo a 600 nm, y tienen un valor de cero luego de los 1000 nm (o por debajo de los 250 nm), por lo que el rango de longitudes de onda de los láseres que se pueden usar con este tipo de detector tiene límites ¹⁴.

Un detector CCD, en términos absolutos de sensibilidad por fotón dispersado, no es el detector más eficiente en la región visible. No obstante, el hecho de que toda la dispersión es acumulada continuamente durante el periodo completo de exposición de la muestra a la radiación de excitación más que compensa lo dicho anteriormente ¹.

3.3.3.2 Detectores para FT-Raman

Los detectores disponibles actualmente para el rango de longitudes de onda entre 1100 y 1700 nm, apropiados para FT-Raman, están constituidos por semiconductores de bajo band gap. Los más comunes son el germanio (Ge) y el indio galio arsénico (InGaAS). La Figura 3.10b muestra la curva de eficiencia cuántica para un detector de Ge. Cuando el band gap se hace lo suficientemente pequeño para detectar los fotones de baja energía involucrados, la señal oscura (dark signal en inglés) se incrementa debido a la facilidad de generación térmica de pares electrón/hueco. Estos detectores pueden enfriarse a las temperaturas del nitrógeno líquido para un aumento en la sensibilidad, pero aún así, la señal oscura excede significativamente la obtenida para los semiconductores de Si usados en las cámaras CCD ¹³. En realidad, los detectores CCD también operan a temperaturas bajas con el fin de disminuir el ruido asociado a los elementos del detector (comúnmente entre los -20 y -70 °C) ²³.

3.4 La relación Señal/Ruido en la espectroscopía Raman

La capacidad de extraer información analítica de cualquier técnica espectroscópica está comúnmente limitada por la relación Señal/Ruido (*SNR* por sus siglas en inglés), dado cierto conjunto de parámetros de medición. Por citar un ejemplo, es ampliamente conocido que el límite de detección en un análisis cuantitativo comúnmente es definido como la concentración de analito que da una *SNR* de 3 ¹³.

Dado que la dispersión Raman es muy débil en comparación a la fluorescencia o la absorción, las mediciones Raman históricamente han extendido los límites de la tecnología existente para reducir el ruido e incrementar *SNR*. McCreery menciona que el

renacimiento de la espectroscopía Raman a mediados los años 1980, se dio en gran parte debido a los incrementos en la señal por la incorporación de nuevos tipos de espectrómetros en los sistemas Raman; así como por la reducción en el ruido mediante el uso de longitudes de onda de excitación más altas (para reducir la interferencia del background, entiéndase fluorescencia) y detectores de menor ruido (como los CCD).

La relación señal/ruido para la intensidad de pico de una banda Raman corresponde a la altura de pico promedio \hat{S} , dividido por la desviación estándar de la altura de pico (y). Al igual que con cualquier determinación de desviación estándar, la exactitud de la *SNR* se mejora con el número de mediciones promediadas:

$$SNR = \frac{\hat{S}}{y} \quad (3.2)$$

El término \hat{S} de la ecuación (3.2) es obtenido de la respuesta que el instrumento ha generado luego de detectar cierta magnitud de dispersión Raman. En todos los instrumentos la radiación Raman es generada mediante un láser. No obstante para llegar del paso de excitación hasta la obtención del espectro en la pantalla de un ordenador, hay dos rutas posibles, dependiendo de la combinación 'espectrómetro + detector' que incluya el sistema. Dependiendo de la configuración del instrumento, podemos tener instrumentos Raman dispersivos o no dispersivos. En este apartado se van a mencionar los parámetros que determinan la fracción de toda la radiación Raman generada, que produce una señal para cada tipo de instrumento mencionado anteriormente. La información que se presenta a continuación fue tomada de la extensa obra de Richard L. McCreery en el tema de la relación señal/ruido para la espectroscopía Raman ¹³.

3.4.1 Obtención de una señal Raman

La señal debida al analito de interés S_R (en electrones) está directamente relacionada con una función de recolección C (con unidades $\text{cm}^2 \text{sr e}^- \text{fotón}^{-1}$) y la radiancia de la muestra L_R (término introducido en la ecuación (2.1), con unidades $\text{fotón sr}^{-1} \text{cm}^{-2} \text{s}^{-1}$) mediante la relación:

$$S_R(e^-) = L_R C t_M \quad (3.3)$$

donde t_M se refiere al tiempo de medición. La Figura 3.11 muestra un esquema del sistema de recolección para una geometría de retrodispersión. Es importante destacar que el término L_R depende de la muestra bajo consideración y la potencia de láser (y, hasta cierto punto, de la geometría de recolección, por el término del diferencial de la sección transversal de la radiación Raman), mientras que C depende de los componentes de recolección y detección del instrumento. El término L_R fue explicado en el capítulo anterior, por lo que ahora se detallarán las variables instrumentales que están involucradas en el proceso de recolección de la radiación.

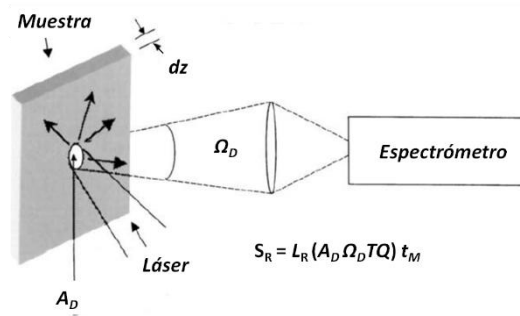


Figura 3.11 Esquema de las variables involucradas en la recolección de la radiación Raman, para un instrumento retrodispersivo en la configuración de 180° . Tomado de McCreery, R.L. *Raman spectroscopy for chemical analysis*.

El término C depende de cuatro variables:

$$C = A_D \Omega_D T Q \quad (3.4)$$

- A_D es el área de la muestra monitoreada por el espectrómetro y la óptica de recolección. Para un valor de radiancia fijo, evidentemente la señal aumentará entre más área sea monitorizada. Dado que por lo general algo de aumento ocurre entre la muestra y el espectrómetro, A_D se define como el área observada en la muestra. Se trata de un término que varía mucho entre los distintos espectrómetros, y así de variable puede ser su efecto sobre el tamaño de la señal.

- Ω_D es el ángulo sólido en estereorradianes (sr) recolectado por el espectrómetro. Este ángulo se mide en la muestra. Ω_D varía con el cuadrado del número f de la óptica† (representado como $f/\#$) en la posición de la muestra. La Figura 3.12 muestra que Ω varía a lo largo del sistema óptico, al igual que el área de la sección transversal y el valor local de $f/\#$. La ecuación (3.5) relaciona Ω_D con $(f/\#)_D$, el número focal medido en la muestra:

$$\Omega_D = \frac{\pi}{4 (f/\#)_D^2} \quad (3.5)$$

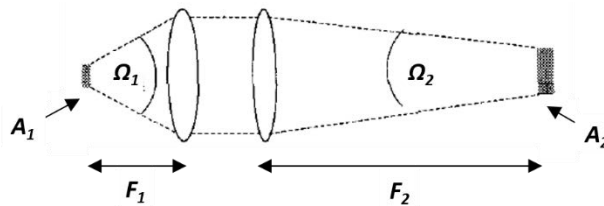


Figura 3.12 Ejemplo de que el producto $A\Omega$ se mantiene constante durante la magnificación. A_2 es mayor que A_1 por un factor $(F_2/F_1)^2$, pero Ω_2 es menor que Ω_1 por el mismo factor. Tomado de McCreery, R.L. *Raman spectroscopy for chemical analysis*.

- T es la transmisión. Corresponde a la fracción de luz contenida en el espacio definido por A_D y Ω_D analizada en el espectrómetro que llega al detector. Consiste de dos factores: la transmisión de la óptica de recolección y de enfoque (lo que incluye pérdidas por la reflexión de lentes o espejos), y la transmisión dentro del mismo espectrómetro (que depende de la eficiencia de la rejilla, la reflectividad de los espejos y pérdidas por divisores de haz). También incluye las pérdidas por los filtros ópticos que pueden ser usados entre la óptica de recolección y el espectrómetro.

- Q es la eficiencia cuántica del detector, es decir, la fracción de fotones que llegan al detector produciendo un electrón.

Volviendo a la expresión general para la señal Raman (ecuación 3.3), se ha explicado que C representa la fracción de la radiancia de la muestra que produce la señal detectada. Sustituyendo C de la ecuación (3.4) en la ecuación (3.3):

$$S_R = L_R (A_D \Omega_D T Q) t_M \quad (3.6)$$

† El número f expresa la apertura de un objetivo en términos relativos respecto a su distancia focal. La distancia focal es la distancia entre el centro óptico de la lente y el punto donde convergen los rayos de luz originados desde un punto en el objeto observado, es decir, el foco.

McCreery menciona en su libro que la ecuación (3.6) es muy útil para estimar los efectos del espectrómetro, o las variables geométricas, en la señal debida al analito de interés.

Respecto al término t_M , este debe reconsiderarse para cada tipo de detector. En el caso de un CCD se monitorean muchas longitudes de onda simultáneamente, usando muchos detectores que están operando en paralelo. Por su parte, en un instrumento FT-Raman no se separan las diferentes longitudes de onda dispersadas por la muestra, sino que son moduladas a frecuencias que dependen de su longitud de onda. El resultado es un único haz, detectado por un único detector, que contiene todas las longitudes de onda de interés. Dado que cada longitud de onda es modulada a una frecuencia distinta, la transformada de Fourier de la salida del detector permite obtener el espectro Raman. Las diferencias entre ambos instrumentos tienen efectos importantes en las características del espectro Raman, en términos de resolución, intervalo espectral cubierto, magnitud de la señal y la SNR .

3.4.2 Fuentes de ruido

Habiendo descrito la magnitud de la señal Raman, ahora debe estimarse el término σ_y de la ecuación (3.2) para evaluar SNR . Para las mediciones Raman σ_y tiene la contribución de un conjunto de fuentes:

$$\sigma_y = \left(\frac{\sigma_s^2}{S} + \frac{\sigma_B^2}{B} + \frac{\sigma_a^2}{a} + \frac{\sigma_F^2}{F} + \frac{\sigma_r^2}{r} \right)^{1/2} \quad (3.7)$$

donde:

σ_s es la desviación estándar de la señal, debida al analito o banda de interés

σ_B es la desviación estándar del *background*

σ_a es la desviación estándar de la señal oscura, comúnmente $(\phi_a t)^{1/2}$, donde ϕ_a es la corriente oscura (en electrones/segundo).

σ_F es el ruido de parpadeo

σ_r es el ruido de lectura

La ecuación (3.7) puede expresarse más convenientemente de esta forma:

$$\sigma_y = (S_R + B + \phi_a t + \sigma_F^2 + \sigma_r^2)^{1/2} \quad (3.8)$$

3.4.2.1 Ruido de disparo de la señal

Anteriormente se definió S_R como la señal, en electrones, que resulta de la dispersión Raman del analito de interés. En ausencia de otras fuentes de ruido, la desviación estándar de S_R está determinada por el límite del ruido de disparo:

$$s = S_R^{1/2} \quad (3.9)$$

El límite del ruido de disparo es fundamental para la espectroscopía, y ocurre cuando se hace el conteo de cualquier cosa que siga la estadística de Poisson. Dicho en otras palabras, la desviación estándar cuando se hace el conteo de cualquier evento aleatorio, es igual a la raíz cuadrada del número de eventos contados. Entre más eventos se cuenten, s se incrementa pero la desviación estándar relativa (s/S_R) disminuye y la SNR (S_R/s) aumenta.

Si el ruido de disparo de la señal es la única fuente de ruido, SNR viene definida por:

$$SNR = S_R/s = S_R^{1/2}, \quad \text{si} \quad S_R = \dot{S}_R t, \quad SNR = (\dot{S}_R t)^{1/2} \quad (3.10)$$

En el límite del ruido de disparo, se observa el incremento de SNR con $t^{1/2}$. La relación señal/ruido nunca va a ser mejor que lo establecido por la ecuación (3.10), incluso para un instrumento perfecto. La Figura 3.13 es un ejemplo de un espectro Raman con una SNR determinada principalmente por el ruido de disparo de la muestra.

3.4.2.2 Ruido de disparo del background

El término *background* se refiere a cualquier fotón detectado que llega del láser y la muestra, en conjunto con los fotones Raman del analito. Dos son los principales factores que contribuyen al background: la fluorescencia de la muestra, y la dispersión Rayleigh que no ha sido eliminada por los filtros. Es importante separar el background, del ruido del detector o el de lectura: el primero depende de la intensidad del láser y la posible aparición de fluorescencia debida a los componentes de la muestra o del analito en sí, mientras que el ruido del detector y el de lectura no.

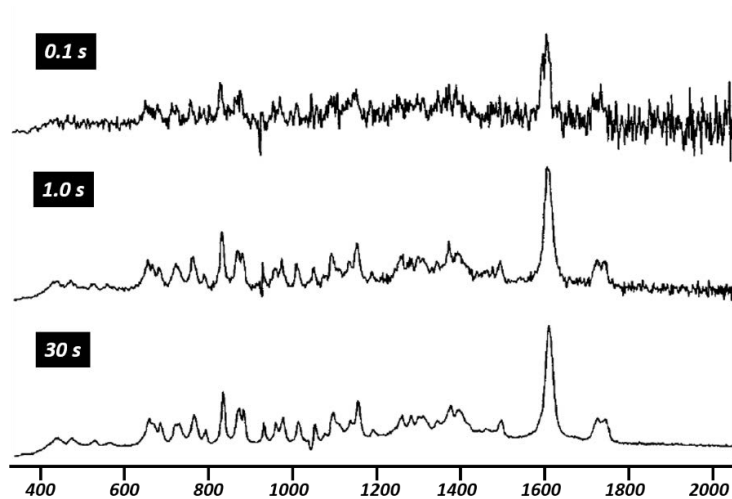


Figura 3.13 Efecto del tiempo de adquisición sobre la SNR. El ruido de disparo disminuye al aumentar el tiempo de adquisición, como se muestra en la ecuación (3.10). Tomado de McCreery, R.L. *Raman spectroscopy for chemical analysis*.

El *background* también está regido por el ruido de disparo, por lo que aplica la siguiente ecuación, con B expresado como electrones:

$$\sigma_B = B^{1/2} = (\dot{B}t)^{1/2} \quad (3.11)$$

El ruido del fondo es bastante común en la espectroscopía Raman, y su reducción fue uno de los principales motivos para usar láseres de longitud de onda mayor, con el fin de disminuir el efecto de la fluorescencia.

Por otro lado, en muestras que contienen materiales fluorescentes, se puede decir que la desviación estándar de S_R está determinada por el límite del ruido de disparo del background. En este caso un pico Raman relativamente pequeño se superpone en un gran background, pero el ruido se origina casi completamente del background.

3.4.2.3 Ruido oscuro del detector

En la ecuación (3.8), ϕ_d es la tasa de generación espontánea de los electrones en el detector, llamada también señal oscura. Todos los detectores tienen una señal oscura finita, ocasionada principalmente por la generación térmica de electrones. Por tanto, ϕ_d depende mucho de la temperatura y esto justifica el enfriamiento del detector. En la

práctica cubre un amplio rango de valores, pudiendo ser casi despreciable (< 0.001 e-/s) en el caso de un detector CCD enfriado con nitrógeno líquido, hasta ser superior a los 100 e-/s en el caso de los detectores usados en FT-Raman.

Dado que los "electrones oscuros" son contados al igual que la señal o el background, también están regidos por el ruido de disparo:

$$\sigma_d = (\Phi_d t)^{1/2} \quad (3.12)$$

Como se dijo anteriormente, la señal oscura no depende de la intensidad del láser o la muestra. De hecho, una prueba para estimar el ruido del detector es hacer la medición de un espectro con el láser totalmente apagado. En este caso el ruido observado se debe al detector y al ruido de lectura.

En el caso de que σ_d sea mucho más grande que los otros componentes de la ecuación (3.7), la desviación estándar de S_R está determinada por el límite del ruido del detector. Esto ocurre comúnmente en la espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier, y en la mayoría de los FT-Raman. Para este caso también se puede dar una expresión SNR similar a la ecuación (3.10):

$$SNR_D = S_R / \sigma_d ; \text{ si } S_R = \dot{S}_R t , \text{ y } \sigma_d = (\Phi_d t)^{1/2} ; \quad SNR_D = \frac{\dot{S}}{\Phi_d^{1/2}} t^{1/2} \quad (3.13)$$

SNR_D es siempre menor que el SNR de la ecuación (3.10), para el caso en que todo lo que no sea el ruido del detector sea igual. Dado que Φ_d disminuye con las mejoras en el detector, SNR_D se aproxima al caso limitado por el ruido de disparo de la señal.

3.4.2.4 Ruido de parpadeo

Se debe a la variación en la intensidad del láser tanto a frecuencias bajas y altas, por lo que se puede producir una variación proporcional en la dispersión Raman y en la señal Raman medida. En el caso de un detector CCD, este es bastante inmune al ruido de parpadeo dado que todas las longitudes de onda son monitoreadas en paralelo. Por otro lado, los interferómetros usados en FT-Raman son sensibles a este ruido cuando la frecuencia de muestreo es comparable a la frecuencia de parpadeo.

3.4.2.5 Ruido de lectura

El término lectura se refiere al proceso de convertir los electrones del detector en una forma útil, comúnmente un valor digital guardado en el ordenador. En este caso σ_r es la desviación estándar de un gran número de lecturas para una señal constante del detector. Por ejemplo, si un pixel del CCD contiene exactamente 1000 e-, y estos son digitalizados a un valor numérico en el ordenador, σ_r es la desviación estándar del valor numérico para muchas repeticiones. Este término no depende de la magnitud de la señal, ni del tiempo de medición. σ_r varía mucho dependiendo del tipo de detector pero por lo general tiene un valor de pocos electrones para un CCD.

3.4.3 Cálculo de la relación Señal/Ruido para instrumentos dispersivos y no dispersivos

Definidas anteriormente la señal S_R (aquella que proviene de la banda Raman de interés), según la ecuación (3.6), y el ruido σ_y (ecuación 3.7), la relación señal/ruido puede expresarse como:

$$SNR = \frac{S_R}{(\frac{2}{S} + \frac{2}{B} + \frac{2}{d} + \frac{2}{r})^{1/2}} \quad (3.14)$$

En la ecuación (3.14) se ha ignorado el ruido de parpadeo. Al respecto McCreery menciona que éste podría contribuir, pero es difícil de abordar teóricamente, y que en un instrumento bien diseñado este ruido puede reducirse hasta un valor despreciable.

La ecuación (3.14) tiene un impacto significativo en el diseño experimental para muchas aplicaciones. Hablando en general, el analista debe elegir un instrumento para el cual σ_r y σ_d sean despreciables, de manera que la SNR esté determinada por la muestra y no por el espectrómetro. Posteriormente, σ_B debe reducirse hasta donde sea posible mediante la selección de la longitud de onda del láser, o haciendo algún pretratamiento a la muestra. Ante todo se debe buscar hacer lo más pequeño posible el denominador de la ecuación (3.14) y tratar de maximizar la señal.

3.4.3.1 Relación Señal/Ruido para el límite del ruido de disparo del analito

En este caso la señal observada se debe únicamente a la dispersión Raman del analito de interés. Sustituyendo la ecuación (3.6) en la ecuación (3.10) resulta:

$$SNR_A = (L_A C t_M)^{1/2} \quad (3.15)$$

donde L_A se refiere a la radiancia del analito.

3.4.3.2 Relación Señal/Ruido para el límite del ruido de disparo de la muestra.

Se puede definir un SNR_S para el caso donde σ_d , σ_F y σ_r son despreciables, y el ruido se debe solamente al ruido de disparo del analito y del background. Esto sería un caso común para un espectrómetro Raman dispersivo/CCD. Recordando que S_R es la señal del analito por encima del background, SNR_S se calcula como:

$$SNR_S = \frac{S_R}{\left(\frac{2}{S} + \frac{2}{B}\right)^{1/2}} = \frac{S_R}{(S_R + B)^{1/2}} = \frac{\beta_A D_A}{(\beta_A D_A + \beta_B D_B)^{1/2}} (P_D K C t_M)^{1/2} \quad (3.16)$$

donde $\beta_A D_A$ y $\beta_B D_B$ es el producto de la sección transversal[‡]-densidad numérica para el analito y los componentes que generan el background, respectivamente. Al igual que en el caso del límite del ruido de disparo del analito, SNR_S aumenta con $t^{1/2}$, pero SNR_S siempre es menos que SNR_A debido a la contribución del ruido de disparo del background.

3.4.3.3 Relación Señal/Ruido para el límite del ruido oscuro.

Si σ_d es la fuente de ruido que domina en la ecuación (3.14), la combinación de las ecuaciones (3.6) y (3.12) resulta en la expresión:

$$SNR_d = \frac{L_A C}{\Phi_d^{1/2}} t_M^{1/2} \quad (3.17)$$

SNR_d también aumenta con $t^{1/2}$ pero siempre es menos que SNR_A .

[‡] En inglés *Raman scattering cross section*, de esto se habló en la sección 2.3.3.1

3.4.3.4 Observaciones finales para los instrumentos no dispersivos respecto a la SNR

Los instrumentos no dispersivos como los FT-Raman, operan en un modo fundamentalmente distinto a los instrumentos con detección CCD, con consecuencias importantes en la *SNR*. Un sistema FT-Raman usa un interferómetro de Michelson para modular todas las longitudes de onda antes de la detección por un único detector, y posteriormente todas las longitudes de onda se ordenan según la frecuencia de modulación mediante una transformada de Fourier.

Si se considera una adquisición de datos individual en un experimento FT, es decir, con el interferómetro en una posición fija, en ese momento el detector está recogiendo la luz de todos los valores de desplazamiento Raman, y no sabe si los fotones provienen de una banda del analito o de otra, o si provienen del background. Por tanto, el ruido de disparo en el conjunto de datos registrado tiene contribuciones de todas las longitudes de onda en el intervalo espectral observado. El ruido de disparo en una adquisición de datos puntual es la suma de todas las contribuciones:

$$\sigma_{FT} = \left[\sum_{N_R} (\dot{S}_i + \dot{B}_i) + \Phi_d \right]^{1/2} t_M^{1/2} \quad (3.18)$$

donde N_R se refiere a todos los elementos de resolución. Lo más importante aquí es que la magnitud de la señal para un valor dado de desplazamiento Raman, graficado en el espectro luego de la transformada de Fourier, es proporcional a los fotones observados para ese desplazamiento Raman, mientras que el ruido tiene la contribución de todos los valores de desplazamiento Raman. Se puede definir ϕ_S como la tasa de generación de electrones, generados por los fotones que llegan al detector, promediado para todos los N_R :

$$\phi_S = \frac{\sum_{N_R} (\dot{S}_i + \dot{B}_i)}{N_R} \quad (3.19)$$

Por tanto,

$$\sigma_{FT} = (\phi_S N_R + \Phi_d)^{1/2} t_M^{1/2} \quad (3.20)$$

Dado que ϕ_s es un promedio, y no depende del número de onda, el ruido en un espectro FT-Raman es igual a lo largo del intervalo completo de longitudes de onda monitoreado. Algo a mencionar respecto a la aplicación de la ecuación (3.6) a FT-Raman (definiendo un término S_{FT}), es que esta expresión aplica para una longitud de onda en particular, pero el interferograma corresponde a la suma de todas las longitudes de onda monitoreadas, luego de que cada una es modulada a una frecuencia distinta por el interferómetro. Es entonces hasta después de la transformación de Fourier que la respuesta para un desplazamiento Raman determinado será proporcional a S_{FT} .

En el límite del ruido del detector que se observa en los experimentos FT:

$$SNR_{FT} = \frac{L_i(A_D\Omega T Q)_{FT} t_M^{1/2}}{\phi_d^{1/2}} \quad (3.21)$$

Tanto la SNR_{FT} como las expresiones de las ecuaciones (3.15) y (3.16) incrementan con $t_M^{1/2}$. No obstante SNR_{FT} en el límite del ruido del detector es siempre menor, que la relación señal/ruido observada para el límite del ruido de disparo, dado que por definición se asume que ϕ_d es mucho mayor que ϕ_s . Algo que no se ha dicho es que, dado que en la práctica la limitación del ruido en un instrumento FT-Raman viene dada por el detector, estos instrumentos tienen un producto $A_D\Omega$ significativamente mayor que los sistemas con detección CCD, y este factor sirve para parcialmente igualar el SNR de una medición dada cuando ésta se realiza con ambos tipos de instrumentos. Por otro lado, según la ecuación (3.20) el ruido en un espectro FT-Raman es proporcional a la raíz cuadrada de la intensidad promedio de la luz a lo largo del espectro. Esto quiere decir que si una cantidad significativa de intensidad del láser entra en el interferómetro, la SNR del espectro entero se va a ver degradada. El problema del *ruido distribuido* requiere que los espectrómetros FT-Raman tengan excelentes filtros de rechazo, ya sea entre la muestra y el interferómetro, o inmediatamente antes del detector. Estos filtros son variantes de los descritos anteriormente para los instrumentos dispersivos, y su diseño es por lo general de propiedad exclusiva del fabricante ¹³.

3.5 Comparativa final de los instrumentos dispersivos y no dispersivos

La Tabla 3.1 muestra un resumen de las principales características de los instrumentos Raman dispersivos y de transformada de Fourier. Se hace mención de atributos

relacionados con la construcción del instrumento, y también se describe de qué depende la relación *SNR* para cada tipo de instrumento.

Tabla 3.1. Comparación de un instrumento Raman dispersivo y uno de transformada de Fourier

Característica	Raman dispersivo	FT-Raman
<i>Longitudes de onda disponibles</i>	< 200 nm a 850 nm, el límite superior se debe a la respuesta del CCD	1064 nm (99 % de los sistemas)
<i>Detector</i>	CCD, limitado por el ruido de disparo	Ge o InGaAs, limitado por el ruido del detector
<i>SNR</i>	Generalmente dan una SNR mayor con potencias de láser no demasiado altas	Una SNR alta requiere una potencia de láser comparativamente mayor
<i>Mejor resolución espectral</i>	Comúnmente 1-4 cm^{-1}	$\sim 0.5 \text{ cm}^{-1}$. Precisión de frecuencias excelente
<i>Registro de la resolución espectral</i>	La resolución varía a lo largo del espectro	Todo el espectro se cubre con una resolución constante
<i>Supresión de la fluorescencia</i>	Moderada a 785 nm Pobre a 514 nm Buena a 244 nm	Excelente
<i>Ventaja⁴ relativa (respecto a 1064 nm)</i>	@ 785 nm: 3.38 @ 514 nm: 18.3 @ 244 nm: 362	1
<i>Comentarios adicionales de cada uno</i>	Por lo general no tienen partes móviles	Tienen un producto $A\Omega$ mayor Buenas bibliotecas espectrales

3.6 Cierre de Capítulo

Con esto se da cierre al marco teórico relacionado con la espectroscopía Raman, tanto de los fundamentos teóricos como de las características de los distintos instrumentos que se encuentran en el mercado actualmente para el análisis de productos farmacéuticos. Los espectros registrados de las muestras pueden considerarse como datos. El paso siguiente es extraer la información de interés de estos datos. Para esto son necesarias todas las herramientas de la Quimiometría. Este será el tema del Capítulo 4.

3.7 Referencias

- (1) Smith, E.; Dent, G. *Modern Raman Spectroscopy: A Practical Approach*, First.; John Wiley & Sons, Ltd., 2005.
- (2) Bruker: MultiRAM - Overview <https://www.bruker.com/es/products/infrared-near-infrared-and-raman-spectroscopy/raman/multiram/overview.html> (accessed Apr 6, 2017).
- (3) Liu, C.; Berg, R. W. Implementation of Deep Ultraviolet Raman Spectroscopy (Tesis), Technical University of Denmark, 2011.
- (4) Schrader, B.; Bergmann, G. *Fresenius' Zeitschrift für Anal. Chemie* **1967**, *225* (2), 230–247.
- (5) Matousek, P.; Parker, A. W. *Appl. Spectrosc.* **2006**, *60* (12), 1353–1357.
- (6) Johansson, J.; Sparén, A.; Svensson, O.; Folestad, S.; Claybourn, M. *Appl. Spectrosc.* **2007**, *61* (11), 1211–1218.
- (7) Svensson, O.; Josefson, M.; Langkilde, F. W. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2000**, *11* (2), 141–155.
- (8) Svensson, O.; Josefson, M.; Langkilde, F. W. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **1999**, *49* (1), 49–66.
- (9) Langkilde, F. W.; Sjöblom, J.; Tekenbergs-Hjelte, L.; Mrak, J. J. *Pharm. Biomed. Anal.* **1997**, *15* (6), 687–696.
- (10) Vergote, G. ; De Beer, T. R. ; Vervaet, C.; Remon, J. ; Baeyens, W. R. ; Diericx, N.; Verpoort, F. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2004**, *21* (4), 479–485.
- (11) Johansson, J.; Pettersson, S.; Folestad, S. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, *39* (3), 510–516.
- (12) Jedvert, I.; Josefson, M.; Langkilde, F. *J. Near Infrared Spectrosc.* **1998**, *6* (1), 279.
- (13) McCreery, R. L. *Raman Spectroscopy for Chemical Analysis*; John Wiley & Sons, Inc., 2000.
- (14) *Pharmaceutical Applications of Raman Spectroscopy*; Šašić, S., Ed.; John Wiley & Sons, Inc., 2008.
- (15) Parker, A. W.; Towrie, M.; Everall, N.; Matousek, P.; Hahn, T. *Appl. Spectrosc. Vol. 58, Issue 5, pp. 591-597* **2004**, *58* (5), 591–597.
- (16) Schulmerich, M. V.; Morris, M. D.; Fredricks, R. A.; Finney, W. F. *Appl. Spectrosc.* **2006**, *60* (2), 109–114.
- (17) Wang, H.; Mann, C. K.; Vickers, T. J. *Appl. Spectrosc.* **2002**, *56* (12), 1538–1544.
- (18) Matousek, P.; Everall, N.; Littlejohn, D.; Nordon, A.; Bloomfield, M. *Appl. Spectrosc.* **2011**, *65* (7), 724–733.

- (19) Zhou, P. *Choosing the Most Suitable Laser Wavelength For Your Raman Application*. B&W Tek, Inc.
- (20) Bhartia, R.; Hug, W. F.; Reid, R. D. *Proc. SPIE* **2012**, 83581A–83581A–9.
- (21) Misir, K.; Harrison, D. J. *Micro Total Analysis Systems 2004. Volume 2. Proceedings of microTAS 2004 8th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, Malmö, Sweden, September 26-30, 2004*; Thomas Laurell, Johan Nilsson, Klavs Jensen, D. Jed Harrison, J. P. K., Ed.; The Royal Society of Chemistry, 2004.
- (22) *Raman spectroscopy: Theory and Practice. Volume 2*; Szymanski, H. A., Ed.; Plenum Press, 1970.
- (23) Laplant, F. *Emerging Raman Applications and Techniques in Biomedical and Pharmaceutical Fields*, First.; Matousek, P., Morris, M. D., Eds.; Springer, 2010.
- (24) Yariv, A. *Quantum electronics*, 3rd ed.; Wiley, 1989.
- (25) Schrader, B.; Hoffmann, A.; Keller, S. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Spectrosc.* **1991**, 47 (9–10), 1135–1148.

CAPÍTULO 4

QUIMIOMETRÍA

4.1 *Introducción*

Muy brevemente al inicio del Capítulo 2, se mencionó que una de las aplicaciones tanto de la espectroscopía de absorción en el infrarrojo, y de la espectroscopía Raman, es la determinación cuantitativa de una sustancia en una muestra ¹. Ambas técnicas hacen uso de la posición de las bandas y sus intensidades para obtener información sobre la concentración, así como de la naturaleza física y química de la muestra que está siendo estudiada. Como cabría esperar, ambas técnicas también comparten muchas de las herramientas necesarias para extraer esta información de los espectros adquiridos. Tales herramientas son proporcionadas por una disciplina científica llamada quimiometría ².

El objetivo de este capítulo es explicar en qué consisten estas herramientas, las cuales son indispensables una vez que se han obtenido los espectros Raman de las muestras que se pretenden analizar cuantitativamente. Dado que el caso bajo estudio de esta tesis es el análisis no destructivo de comprimidos farmacéuticos usando espectroscopía Raman, previamente se tuvo que haber considerado alguna estrategia para reducir las posibilidades de cometer algún error por submuestreo, debido al diámetro del láser con el cual se va a generar la radiación Raman, en comparación a las dimensiones de las tabletas en estudio. Ya con los fotones Raman generados, si se han seguido las indicaciones del fabricante del instrumento para la adquisición de los espectros, el instrumento recogerá una cantidad de fotones Raman que estará acorde al volumen muestreado en el material. Así mismo, una serie de parámetros instrumentales también tuvieron que haber sido optimizados, con el fin de trabajar con un conjunto de condiciones que permitan obtener la mejor relación señal/ruido posible. Un ejemplo de esto sería la aplicación de una potencia de láser relativamente alta, con lo cual aumenta la SNR. Eso sí debe, haberse verificado que al final del tiempo de adquisición no ha habido ninguna alteración en la muestra.

4.2 Definición de Quimiometría

La quimiometría fue definida originalmente como "el arte de extraer información química relevante de los datos producidos en los experimentos de química" ². A finales de los años 1980 se decía que la quimiometría describe una forma nueva de analizar datos químicos, en la cual están combinados elementos del pensamiento estadístico y químico ³. Su desarrollo desde entonces no ha parado, hasta convertirse en una disciplina científica propia con una popularidad creciente en muchas ramas de la química ⁴.

Más recientemente, Charles E. Miller definió la quimiometría como la aplicación de métodos de modelado empírico multivariado a los datos químicos. El autor se refiere a un modelado empírico dado que éste se realiza principalmente en función de los datos disponibles y el problema en estudio, y en menor grado siguiendo pautas meramente teóricas ⁴. No obstante, cosas tan esenciales en la química como la ley de Lambert-Beer son tomadas en cuenta como conocimientos previos sobre la química de la muestra (y esta ley es muy importante porque relaciona la intensidad espectral con la concentración). Por otro lado, el elemento multivariado de la quimiometría indica que más de una variable respuesta del instrumento se usa para la construcción del modelo. El término modelo se define como la manera mediante la cual se extrae la información. Esto es comúnmente necesario, dado que individualmente ninguna variable respuesta tiene la selectividad suficiente para monitorear una propiedad específica, sin tener interferencias de otras propiedades ⁴.

Se trata de una disciplina con herramientas sumamente poderosas, sin embargo para aprovechar sus ventajas debe tenerse una serie de cuidados. Una técnica de modelado empírico requiere ser alimentada de grandes cantidades de datos buenos. En la misma referencia ⁴, pero en el capítulo correspondiente a Teoría de Muestreo, se hace una afirmación que es fundamental para el caso de análisis de comprimidos farmacéuticos como el realizado durante esta tesis: la quimiometría NO elimina errores de muestreo ⁵. Por tanto, si se pretende desarrollar un modelo cuantitativo para tabletas de baja dosificación, con espectros adquiridos luego de haber optimizado todos los parámetros configurables del espectrómetro Raman, pero tomando un único espectro por tableta (un único incremento de acuerdo a la nomenclatura del Capítulo 1, donde entonces pasaría a ser una muestra al azar); dependiendo del instrumento específico, y del nivel de homogeneidad en la distribución del API que haya logrado el fabricante de los comprimidos, puede que la etapa de modelado sea sumamente compleja por no decir imposible, dada la variabilidad tan alta en los espectros con los cuales se va a construir el

modelo de calibración. Una consecuencia aún peor ocurriría en el caso de que se construya una calibración no fiable, y que entonces ésta se ponga en servicio y libere productos defectuosos, donde dependiendo el campo, esto pueda representar hasta un riesgo para la salud ⁶.

El modelo eso sí debe incluir toda la variabilidad que podría encontrarse en las muestras que se pretenden analizar ⁷. Esto va en la misma línea de disponer grandes cantidades de buenos datos. En la práctica esto se puede lograr mediante la inclusión de espectros medidos en tabletas preparadas en distintos momentos, donde tal vez se hayan usado materias primas de distintos proveedores durante su formulación. La inclusión de este tipo de variabilidad es de interés, y puede que se refleje en los espectros adquiridos. No obstante, si los espectros con los cuales se va a construir el modelo tienen una variabilidad muy alta debido a un mal muestreo (y entonces un espectro mostrará una banda del API mucho más intensa que otro, porque en el único punto irradiado había una mayor cantidad del compuesto que en el punto irradiado de la otra tableta), esta variabilidad no interesa ni debe ser incluida, porque no corresponde a diferencias entre muestras, sino a distintas magnitudes del error de muestreo. Y este no es el objetivo: el objetivo es determinar de manera no destructiva el contenido de API en tabletas completas.

Por último, dos aspectos más a tomar en cuenta: los modelos empíricos solo pueden aplicarse con seguridad a las condiciones que fueron incluidas en los datos usados para construir el modelo. Es decir, la extrapolación de estos modelos es muy peligrosa. Esto podría ocurrir en el caso de un medicamento que sea fabricado en dos sitios de producción con distintos instrumentos para la compactación de mezclas en polvo; entonces se desarrolla el modelo con las muestras preparadas en un sitio, y posteriormente se pretende implantarlo para el control de calidad de las muestras fabricadas en la otra planta de producción. Finalmente, un último factor menos intuitivo es que, dado que están disponibles múltiples variables de respuesta a la hora de construir el modelo, se puede estar tentado a producir un modelo sobreajustado, con el fin de obtener resultados artificialmente optimistas ⁴.

En toda la descripción anterior se ha asumido que el instrumento está totalmente caracterizado. En otras palabras, que se ha probado bajo un amplio rango de condiciones que podrían pasar. Esto incluye factores ambientales, sistemas de muestreo (distintos portamuestras por ejemplo), variaciones introducidas debido al cambio de operador del instrumento, niveles de ruido, deriva del instrumento, años que éste lleva midiéndolo, etc. Las herramientas quimiométricas son muy buenas para extraer información útil de

diferencias muy sutiles en los espectros. Pero también puede haber instrumentos que sean muy buenos para destruir estas pequeñas diferencias, por lo que se eliminan 'trazas' que pueden ser información necesaria. Por tanto hay que asegurarse que los instrumentos no hagan esto sobre los datos adquiridos.

4.2.1 Algo de historia

La demostración de la viabilidad en la práctica de las calibraciones en el infrarrojo cercano (NIR por sus siglas en inglés) con múltiples longitudes de onda para el análisis rápido no destructivo de alimentos y materiales agrícolas, llevado a cabo por Karl H. Norris y William R. Hruschka a lo largo de los años 1960 en el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, puede considerarse como el primer trabajo de quimiometría aplicada a la química analítica ⁴. Se trata por tanto de algo que se originó en el contexto de la industria, más que en la academia, y su desarrollo fue así hasta los años 1980: el ritmo de la investigación en quimiometría lo llevaban las necesidades que se trataban de resolver en la industria. Para ese entonces la investigación se enfocaba en la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC por sus siglas en inglés), y la espectroscopía NIR: en el caso del HPLC la investigación estaba orientada a problemas tales como la deconvolución de picos; mientras que la espectroscopía no-específica NIR cada vez se volvía más popular y de mucha utilidad para un amplio rango de aplicaciones industriales ⁸. Ya desde el trabajo de Norris se hizo rápidamente evidente que para aprovechar el gran potencial de la tecnología NIR, el paso de la quimiometría es indispensable con el fin de proveer la selectividad necesaria ⁴.

A inicios de los años 1990 las aplicaciones de la quimiometría se empezaron a expandir, con un énfasis especial en la industria farmacéutica, y más específicamente en lo relacionado a la cromatografía farmacéutica. Luego otras industrias como la petroquímica empezaron a aplicar los conocimientos de la quimiometría, y de aquí en adelante surgieron otros nichos tales como las ciencias forenses, el análisis multivariado de imágenes (especialmente de tabletas farmacéuticas) y la ingeniería química (monitoreo de procesos en la industria mediante espectroscopía NIR) ⁸.

4.3 La Quimiometría en las técnicas espectroscópicas

La introducción de instrumentos que dan respuestas multivariadas para cada muestra analizada, en conjunto con la disponibilidad de ordenadores, fueron las dos causas principales por las cuales pudo surgir la quimiometría a finales de los 1960s y durante los 1970s. En este momento se hizo conciencia de que la estadística tradicional univariable ya no era suficiente para describir y modelar los experimentos químicos, y entonces la quimiometría serviría para ir más allá de las limitaciones de la estrategia tradicional ⁹.

Paul Geladi en su revisión⁹ sobre la aplicación de la quimiometría a la espectroscopía, menciona tres líneas de evolución de la quimiometría:

- el diseño de experimentos.
- el uso de la quimiometría para establecer correlaciones que son útiles en campos como el diseño de medicamentos, y el establecimiento de relaciones cuantitativas estructura-actividad.
- el uso de la quimiometría en la química analítica instrumental. En este sentido, la quimiometría puede expandirse a cualquier subdisciplina, debido al uso de espectros o técnicas de separación.

El trabajo realizado en esta tesis pertenece a la tercera línea de evolución, y específicamente corresponde a la aplicación de la quimiometría para el análisis cuantitativo no destructivo de comprimidos farmacéuticos usando espectroscopía Raman.

Adelantando un poco el trabajo experimental que se realizó durante la tesis: en uno de los trabajos se midió un conjunto de tabletas farmacéuticas con distintos instrumentos Raman. En algunas ocasiones, para prevenir errores por submuestreo se registró más de un espectro por tableta (las mediciones por mapeo mencionadas en el Capítulo 1). El conjunto de espectros adquiridos son los datos para trabajar. ¿Cómo se obtiene la información químicamente relevante de los datos químicos (espectros) que se midieron?. La siguiente relación ⁶:

$$\text{Datos medidos} = \text{Información} + \text{Ruido} \quad (4.1)$$

describe lo que son los espectros: una mezcla de *Información* y *Ruido*. Lo ideal sería que la magnitud de la *Información* fuese mucho mayor que la magnitud del *Ruido*, y la

Información en los datos estuviese relacionada de una manera sencilla con las propiedades de las muestras de las cuales se tomaron los *Datos*. No obstante, comúnmente se trabaja con *Datos* que tienen tanto *Ruido* como *Información*; y/o también con *Datos* cuya *Información* está relacionada con las propiedades de interés de una forma compleja que no es fácilmente discernible en una inspección simple de los datos⁶.

Usando los conceptos anteriores al caso de la cuantificación de una pequeña cantidad de API en tabletas, se puede decir que en la espectroscopía Raman las intensidades (o áreas) de las bandas del API son proporcionales a la concentración del analito de interés (que es lo que se pretende determinar). Pero esto también se cumple para los otros componentes de la mezcla heterogénea que conforman la tableta. Y por otro lado, hay que recordar que no todos los componentes son igualmente activos en Raman. Irradiando la mezcla bajo ciertas condiciones respecto al láser (una longitud de onda determinada aplicando cierta potencia de láser), el nivel de actividad Raman dependerá de la sección transversal de la dispersión Raman de cada componente (propiedad directamente relacionada con la polarizabilidad, Capítulo 2). Como resultado, la manera en la que las propiedades de la muestra, que en este caso quedarían representadas en el espectro adquirido, se relacionan con la información de interés de una manera que no es sencilla. La información de interés en este caso es el contenido de ingrediente activo de las tabletas.

A pesar de lo anterior, en los espectros Raman de un comprimido farmacéutico se tiene un conjunto de señales considerablemente resueltas, y en muchos casos es posible distinguir una zona del espectro en la cual se observan bandas que probablemente sólo estén relacionadas con el API. Se trata de las bandas con un desplazamiento Raman alrededor de los 1600 cm^{-1} , las cuales se deben a las vibraciones de los anillos aromáticos. Este grupo funcional normalmente forma parte de la estructura química de los APIs, y casi nunca se encuentra en las estructuras de los excipientes, por lo que existe la posibilidad de probar una estrategia univariable para la cuantificación del API, mediante el uso de la intensidad o área de pico ¹⁰. Tal estrategia representa una forma sencilla de extraer la información respecto al contenido de API de los espectros adquiridos de las tabletas. Se trata de una herramienta menos poderosa que todo lo que permite hacer la quimiometría, pero se puede probar con el fin de obtener la información de interés de los espectros.

En general, las herramientas quimiométricas se utilizan para ⁶:

- remover tanto *Ruido* como sea posible el ruido de los datos.

- extraer tanta *Información* como sea posible de los datos.
- usar la *Información* para hacer predicciones exactas de muestras incógnitas. Esto último en realidad corresponde a una aplicación específica de lo que se puede hacer con la información química extraída.

¿Cómo son los *Datos* contenidos en un espectro Raman?. Lo primero que hay que mencionar es que un espectro Raman se genera de un fenómeno débil, dado que solo uno de cada 10^6 fotones que son dispersados, se dispersa inelásticamente ¹. Por otro lado, pueden presentar un *background* considerable debido a fenómenos como la fluorescencia, que pueden oscurecer la señal Raman y añadir *Ruido* al espectro ¹¹. Como ventajas se puede decir que los espectros presentan muchas señales resueltas, y que en el caso de disoluciones, si estas son de alta concentración, usualmente no representan un problema.

Finalmente antes de entrar en el detalle de las herramientas, es adecuado hacer una última expansión de la definición del término quimiometría. Jeremy M. Shaver en su capítulo de quimiometría aplicada a la espectroscopía Raman ², la define como el proceso de derivar información química de los datos. Al hablar de proceso, esto incluye una serie de pasos, donde uno que se explicará en detalle es el del preprocesamiento de los datos. Esto se hace con el fin de hacerlos más estables y/o exactos, y luego estos datos preprocesados son los que se emplean en las estrategias multivariantes con fines de clasificación y/o cuantificación. En esta tesis se han empleado distintas herramientas de la quimiometría con fines cuantitativos, y son las correspondientes a este fin las que serán explicadas en este capítulo. Sin embargo, en la misma referencia² se menciona que en realidad, los análisis cuantitativos comúnmente combinan un análisis cualitativo (encontrar ciertas especies X) con la pregunta genérica de ¿cuanto hay?.

4.3.1 Pretratamiento de los datos

Mucho del éxito o fracaso de cualquier método de análisis de datos recae en tener datos apropiados al inicio del proceso. La mayoría de la inexactitud e inestabilidad de un análisis puede eliminarse mediante algunas técnicas directas de preprocesamiento, las cuales se ocupan de los errores sistemáticos y aleatorios comunes que están presentes en los espectros Raman ². A continuación se mencionan las técnicas de procesamiento más frecuentemente usadas en el campo de la espectroscopía Raman.

4.3.1.1 Suavizado y eliminación del ruido

El ruido al que se refiere este apartado es aquel que aparece como variaciones aleatorias de punto a punto en un espectro, y que varía de espectro a espectro de una manera consistente. En el capítulo anterior se mencionó que el uso de detectores enfriados reduce significativamente el ruido de fuentes eléctricas o térmicas. Y se mencionó también el ruido de disparo, el cual para la medición de n elementos es igual a $n^{1/2}$. Este ruido surge de la probabilidad aleatoria asociada con la observación real de un fotón a una determinada longitud de onda ¹².

Los algoritmos de suavizado espectro a espectro son ampliamente usados. Estos hacen uso de las relaciones entre puntos espectrales adyacentes para aislar la señal del ruido. Usualmente el ruido aparece como fluctuaciones aleatorias de alta frecuencia, mientras que la señal se asume que es de una menor frecuencia (cambia más gradualmente a lo largo del eje X del espectro) ². La Figura 4.1 muestra la diferenciación respecto a la frecuencia del ruido, la señal Raman y el background. En la práctica es muy utilizado el suavizado polinomial de Savitsky-Golay ¹³. En este se realiza un promediado ponderado en cada punto del espectro con algunos números que se encuentran a sus lados. El número de elementos para cada punto se incrementa, y entonces la *SNR* se aumenta por lo mostrado

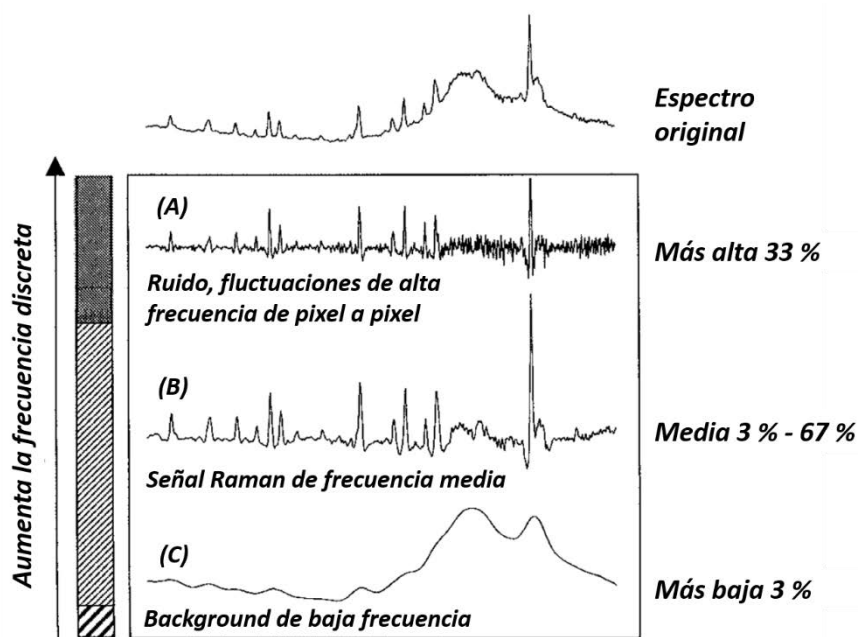


Figura 4.1 Análisis discreto de frecuencia de un espectro Raman (el espectro original se muestra de primero). Los datos fueron separados en tres grupos mediante un análisis de Fourier. Tomado de Shaver, J.M. *Chemometrics for Raman Spectroscopy*.

en la ecuación (3.10). Se asume que los puntos adyacentes son esencialmente iguales en la señal que representan. El término ponderado de la definición del suavizado de Savitzky-Golay se refiere a la manera en que este suavizado reduce los cambios en la forma de las bandas: se van ajustando funciones polinomiales a un grupo de puntos alrededor de cada punto del espectro. La función resultante puede usarse para aislar la información relacionada con la señal de frecuencia media ².

Existen además otras técnicas que tratan con el ruido de alta frecuencia. Se puede mencionar el filtrado de Fourier y el filtrado por wavelets, donde la segunda se desempeña mejor respecto a producir una menor deformación de las bandas ¹². Incluso es posible usar técnicas de análisis multivariable cuando se dispone grandes conjuntos de datos, con el fin de incrementar la *SNR* ². Se hace mención de estas otras estrategias, pero a lo largo de esta tesis sólo fue utilizado el suavizado de Savitzky-Golay.

4.3.1.2 Eliminación de los rayos cósmicos

Se trata de otra fuente no analítica de variación de espectro a espectro, que aplica exclusivamente a los instrumentos con detector CCD. Estos rayos impactan en el detector durante la medición de un espectro, y cada uno afecta a unos cuantos píxeles de la cámara, ocasionando la creación de una carga excepcionalmente alta. En el espectro se muestran como un pico (llamado *spike* en inglés) que es intenso y estrecho ².

La aparición de estas bandas puede ocasionar efectos catastróficos sobre el análisis. La técnica multivariable que se elija se forzaría a tomar en cuenta el *spike* sobre la señal Raman real. En la práctica una herramienta cuantitativa efectiva que se aplica para la eliminación de los rayos cósmicos es el análisis de replicados. Para esto se registran dos espectros idénticos y se restan. Es muy poco probable que de aparecer un *spike* en los dos espectros, éste aparezca en el mismo lugar de ambos; entonces al hacer la resta de espectros se observarán desviaciones grandes, en adición del ruido aleatorio. Para todos los puntos que estadísticamente son lo mismo en los dos replicados se usa el promedio, mientras que para los puntos en los que haya aparecido un rayo cósmico en alguno de los espectros, estos serán completados con el otro espectro, removiéndose así el efecto ².

4.3.1.3 Eliminación de la línea base y el background

El principal, pero no único *background* que afecta a los espectros Raman es la fluorescencia. En el capítulo anterior se mencionó la escogencia de la longitud de onda de excitación como un parámetro experimental a considerar para reducir su efecto. Como resultado los espectros pueden contener distintas cantidades de background, que en algunas ocasiones puede que sea lo suficientemente bajo y no interfiera con un análisis.

Posiblemente el efecto más significativo del background es la introducción de ruido en el espectro. Se ha dicho que al aumentar el número de elementos contados mejora la *SNR*. El gran problema es que esto asume que la única fuente de variación es el conteo de la señal Raman. En el caso de un espectro con background, el denominador de la *SNR* sumará los elementos debidos a la señal y también los debidos al background, mientras el numerador (la señal), corresponde únicamente a la banda Raman de interés. Debido a lo anterior, la técnica de corrección del background puede remover la estructura amplia, pero el espectro resultante aún incorporará el ruido de disparo aportado por el background. Por tanto el siguiente paso de preprocesamiento tendría que consistir en algún tipo de eliminación del ruido para que se recupere la *SNR* ².

Una primera opción consiste en tomar una línea base con pendiente y transformarla en una línea base horizontal. Se toman dos variables con las cuales se va a definir una nueva línea base, las cuales se definen como cero, y el resto de variables se ajustan con una interpolación/extrapolación lineal. Evidentemente es necesario asegurarse de no tomar variables que tengan bandas espectroscópicas ¹⁴. Otro cuidado a tener en cuenta con esta estrategia consiste en que todo el conjunto de espectros que se pretende corregir deben aproximarse a ser "casi idénticos". Esto básicamente con el fin de no introducir más variabilidad de la que ya es inherente en los espectros en el paso de eliminación del background. De ocurrir esto sería un problema para el posterior análisis multivariable. Por otro lado, existe también la opción de trabajar con cierto nivel de interferencia de background, nuevamente si se cumple esto de que los espectros sean "casi idénticos". En este caso los espectros no tendrán la mejor apariencia para trabajar, pero el sesgo (bias) debido al background es constante ².

Existe además otro procedimiento de rutina que aprovecha la naturaleza de baja frecuencia del background. Este consiste en remover el background mediante el uso de derivadas; y de las opciones disponibles la más comúnmente usada es la derivada de Savitsky-Golay ². Esta derivada hace uso de una función polinomial para ajustar algunos números de puntos locales alrededor de cada punto espectral, y luego determina la

derivada de cada punto a partir de la función usada para ese punto. Con el fin de eliminar el background completamente, es necesario aplicar una derivada de elevado orden. Sin embargo, entre mayor es el orden de la derivada, el ruido también se amplifica a menos que el procedimiento utilizado incorpore algún mecanismo de filtrado (el uso de polinomios en la derivada de Savitsky-Golay sirve para este propósito). Algo importante de mencionar es que cualquier estrategia de corrección de línea base puede aplicarse a intervalos espectrales más cortos que el registrado durante la adquisición. En muchas ocasiones se puede obtener una mejor corrección de esta manera ⁴.

4.3.1.4 Normalización para la corrección de cambios de intensidad uniformes

Otra de las fuentes más significativas de error sistemático en la medición de espectros Raman se ocasiona por las variaciones en su intensidad total. A lo largo de la medición de un conjunto de comprimidos farmacéuticos mediante espectroscopía Raman puede haber cambios en la intensidad del láser y el rendimiento instrumental. Pero además, puede que las tabletas no sean colocadas de la misma manera cuando se van midiendo una tras otra. Debido a lo anterior es necesario realizar un paso de normalización con el fin de fijar la intensidad a un valor conocido o constante ¹⁵. En otras palabras, la normalización se usa para "escalar las muestras" con el fin de tener todos los datos a aproximadamente la misma escala ². Lo ideal es hacer un paso de eliminación del background antes de aplicar la normalización, sin embargo si éste es constante, es posible aplicar la normalización con la presencia de cierto nivel de background ¹⁶.

Puede haber problemas con la normalización en el caso de tener un background que varía en su intensidad o forma, pero también en el caso de que la señal Raman total no sea constante. Esto puede ocurrir si el conjunto de muestras a medir incluye una expansión grande respecto a su concentración, y entonces puede que se aumente la concentración de una especie que dispersa más eficientemente. Como resultado se realiza una normalización con una métrica no constante, lo que significa que la intensidad normalizada no se puede ajustar a una función lineal. Dicho en otras palabras, no habría manera de establecer una calibración en la cual la intensidad sea una función lineal de la concentración, aunque precisamente esto es lo habitual en un análisis multivariable ².

Dos alternativas a la normalización son la corrección de dispersión multiplicativa (MSC por sus siglas en inglés), la cual usa un espectro de referencia (que por lo general es el

promedio de los espectros del set de calibración) para normalizar, y la transformación SNV (Standard Normal Variate), la cual centra y normaliza a una varianza esperada ⁴.

Finalmente como se dijo antes, es posible que luego de cualquier paso de normalización, o de aplicar MSC o SNV, no haya una relación lineal entre intensidad y la propiedad de interés (la concentración de API en una tableta por ejemplo). En este caso es necesario el uso de ecuaciones no lineales o de factores múltiples ²; lo último se refiere al uso de factores múltiples en modelos multivariados, los cuales se detallarán a continuación.

4.3.2 El análisis multivariable

El análisis multivariable utiliza la relación entre variables, tanto dentro del espectro (de número de onda en número de onda), y entre espectros separados (mismo número de onda, distinta muestra), para hacer una determinación con una exactitud y precisión superiores a lo que resulta en el caso de un análisis univariable. Cuando se analiza un grupo de espectros relacionados como un todo, es posible aislar patrones que aparecen en muchos espectros. Esto se puede hacer porque todas las bandas de una especie específica cambian en conjunto, independientemente de las bandas debidas a otras especies. Se dice que están correlacionadas. Una vez que se han determinado los patrones espectrales correlacionados estos pueden usarse para una determinación cualitativa o cuantitativa, de la misma manera que la concentración puede determinarse de la intensidad de una banda individual observada para una sola especie. En general, el uso de múltiples piezas de información mejora significativamente la exactitud y precisión de una determinación ².

4.3.2.1 El centrado a la media (mean centering)

El uso de una muestra de referencia fija comúnmente es considerado para ayudar a mejorar la precisión y exactitud de los modelos multivariable en los cuales se usan muchos espectros juntos para crear un set de calibración. En estos casos, el espectro de referencia es el promedio del set completo de espectros usados para la calibración, y es restado a cada uno de los espectros de calibración así como a cualquier espectro subsecuente que se vaya a predecir. Lo recomendable es hacer este pretratamiento con los espectros normalizados ².

4.3.2.2 Selección de un intervalo espectral

El primer paso en el desarrollo de un modelo robusto consiste en incluir en el análisis solo las bandas que brindan información útil ¹². En este sentido, para la cuantificación de un comprimido farmacéutico con un API que presenta en su estructura algún anillo aromático, debe aprovecharse la región de los 1600 cm⁻¹, la cual probablemente presente bandas resueltas que se deben sólo a las vibraciones del API. Esto es un ejemplo en el cual la quimiometría aprovecha el conocimiento químico del sistema.

4.3.2.3 Métodos multivariantes cualitativos

La espectroscopía Raman presenta muchas ventajas para el análisis de identificación cualitativo. Dependiendo de si la clasificación requiere el uso de conocimiento previo, las técnicas se pueden dividir en supervisadas o no supervisadas ²:

- Técnicas supervisadas: La identificación de los componentes de una muestra se realiza mediante una clasificación, y se realiza primero entrenando el modelo para que reconozca las diferencias entre muestras preclasificadas. Seguidamente se predicen muestras desconocidas usando el modelo entrenado. Se llaman técnicas supervisadas porque requieren el uso de conocimientos previos.

- Técnicas no supervisadas: Son aquellas que identifican grupos naturales o clusters dentro de los datos. Se les llama no supervisadas porque no se necesita presentar ninguna información previamente al modelo con el fin de hacer el análisis. Estas son muy útiles cuando no se dispone de muestras de calibración. También son útiles en estudios de investigación simples, con el fin de deducir patrones en muchos espectros.

En esta tesis se usó ampliamente el Análisis por Componentes Principales (PCA por sus siglas en inglés). Se trata de una técnica no supervisada, y será explicada en detalle a continuación.

4.3.2.4 Análisis por Componentes Principales (PCA)

El PCA aplicado a cualquier técnica espectroscópica clasifica muestras empezando con el conjunto completo como un único grupo, y va buscando progresivamente diferencias entre los espectros individuales mediante las cuales estos se pueden ir agrupando y sub-

agrupando. Teóricamente esto puede continuar hasta que cada espectro pueda distinguirse individualmente de los otros ¹⁷.

En términos generales, se trata de un método de compresión que reduce un conjunto de datos constituido por M variables con N muestras (organizados como una matriz $N \times M$), a una representación más simple que usa un número mucho menor de 'variables comprimidas', que son los componentes principales (PCs por sus siglas en inglés)⁴. El modelo matemático para el método PCA viene dado por la expresión:

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP}^t + \mathbf{E} \quad (4.2)$$

donde \mathbf{T} es una matriz $N \times A$ que contiene los *scores* de un número A de PCs, \mathbf{P} es una matriz $M \times A$ que contiene los *loadings* de los PCs, y \mathbf{E} es una matriz $N \times M$ de x residuales. Los *scores* pueden considerarse como las intensidades de cada una de las nuevas variables comprimidas A para todas las N muestras. Por su parte los *loadings* pueden considerarse como las definiciones de las variables comprimidas A en términos de las variables originales M ⁴. En el campo del análisis espectroscópico, los PCs vienen a ser representaciones matemáticas de los datos espectrales. Son determinados como vectores ortogonales a lo largo de ejes n -dimensionales que son calculados para describir la mayor cantidad de varianza en los datos. Conceptualmente, la ortogonalidad puede describirse como dos vectores que están completamente no correlacionados uno del otro ².

Cuando se hace un PCA con espectros, cada PC se grafica como un espectro para visualizar los ejes. Con el fin de interpretar el espectro del factor, es decir, el *loading*, se considera que cada factor describe un grupo de características espectrales que están presentes en el conjunto de espectros originales. Las características espectrales que están completamente correlacionadas (sólo ocurren una con la otra) deben aparecer juntas en el PC individual. Como parte del análisis, luego de calcular cada PC éste se remueve del conjunto de datos, y seguidamente la señal restante se examina con el fin de encontrar más similitudes hasta que no quede nada ².

La inspección visual de los *loadings* no es estrictamente necesaria, pero puede ayudar a identificar cuales características espectrales están cambiando. Esto también sirve para ayudar a entender el porqué de los clusters que se forman en el PCA. La base para la formación de clusters se origina del hecho de que los espectros que contienen características similares van a requerir cantidades similares de los mismos factores. La manera más sencilla de investigar la formación de clusters, consiste en un gráfico de PCs

en el cual los *scores* de todos los espectros en el set de datos para un PC determinado, son graficados con los *scores* para otro PC. Las similitudes entre distintas muestras son indicadas por medio de grupos de muestras que tienen scores similares en el espacio bidimensional constituido por los dos PCs (Figura 4.2). Por lo general el PCA se hace con los espectros centrados a la media, de manera que cada factor representa el cambio respecto al espectro promedio.

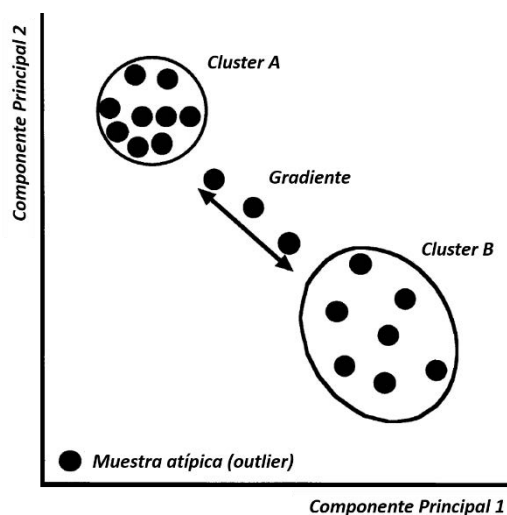


Figura 4.2 Ejemplo de un gráfico de scores para 2 PCs. Se muestran dos clusters, A y B, donde A es más denso, y por tanto hay una menor variación que en B. Unas clases puras A y B pueden existir, pero en muchas situaciones puede haber un gradiente entre ellos. Por otro lado, los outliers deben identificarse y alguna explicación de ellos debe darse. Tomado de Geladi, P. *Chemometrics in spectroscopy, Part 1. Classical chemometrics*.

Al inicio de este apartado se mencionó que el PCA es un método de compresión de datos, sin embargo esto no ocurre a menos que el usuario seleccione un número de PCs que sea mucho menor que el número de variables originales ($A \ll M$). Al respecto, los PC se ordenan por su contribución a los cambios observados en el conjunto de datos. Dado que los cambios en la señal Raman son mayoritariamente ortogonales al ruido del espectro (es decir, no están correlacionados), los cambios espectrales significativos y el ruido aleatorio van a ser mayoritariamente segregados en componentes distintos. En la práctica los últimos componentes útiles van a contener pequeños cambios en la señal Raman, los cuales van a estar mezclados con el ruido ². Subsecuentemente muchos factores van a ser descartados, o dicho con otras palabras, implica que una pequeña fracción de variación en los datos originales quedará almacenada en los residuales del modelo E ⁴.

Los fallos en un Análisis por Componentes Principales surgen mayoritariamente de errores sistemáticos, los cuales pueden hacer que cualquier espectro parezca distinto de otro, aun cuando no hay ninguna diferencia química. Estas diferencias artificiales van a aparecer en los resultados del PCA comúnmente como un componente adicional. Dado que cada componente adicional disminuye la capacidad de distinguir entre los componentes útiles con información Raman, de otros que solo contienen ruido, los clusters se pueden perder o es posible crear clusters artificiales. Algunas causas que pueden llevar a esto son una eliminación del background no consistente, o la presencia de rayos cósmicos que no han sido filtrados ².

4.3.2.5 Métodos multivariantes cuantitativos

En las calibraciones realizadas durante esta tesis, lo primero que se hizo fue preparar un conjunto de muestras de las cuales se registró su espectro Raman; y seguidamente se determinó el valor de interés (concentración de API) mediante otro método de referencia. Posteriormente los datos de referencia en conjunto con los espectros de estas muestras se usaron para construir un modelo de calibración, que luego se usó para predecir otro conjunto nuevo de muestras. Esta es la forma convencional de hacer un análisis cuantitativo. Sin embargo también existen estrategias multivariantes para obtener un resultado cuantitativo sin realizar un paso previo de calibración. Se hace mención de esto, sin embargo es de nuestro interés el análisis cuantitativo que se hace mediante la construcción de un modelo de calibración multivariable.

Algo fundamental es que para que cualquier calibración sea exitosa, es indispensable que se haya realizado un diseño del experimento cuidadoso. Los datos adecuados deben ser suministrados al algoritmo de calibración. Estos datos deben tomar en cuenta tantas interferencias como sea posible para entender de qué manera estas pueden afectar la calibración, pero además, para determinar si es posible mejorar la calibración mediante la remoción de estos efectos. En general es posible hablar de dos tipos de calibraciones multivariantes ²:

- Calibraciones cuantitativas clásicas: En comparación al segundo tipo de calibración que se describirá, este tiene dos limitaciones: únicamente sirven para predecir concentraciones, y requieren saber la concentración de todas las especies interferentes presentes en la muestra. Las técnicas clásicas son comúnmente llamadas como mínimos cuadrados ordinarios o clásicos (OLS, CLS según sus siglas en inglés).

- Calibraciones cuantitativas inversas: Existen otras técnicas que se denominan inversas, tales como la regresión lineal múltiple inversa (MLR inverso), la regresión por componentes principales (PCR) y los mínimos cuadrados parciales (PLS). En todas ellas se evita el problema de conocer todos los componentes del sistema al forzar que los pasos de calibración utilicen solo las características espectrales que están cambiando (PCR), o que están directamente correlacionadas con la propiedad de interés (PLS).

Una breve mención de los distintos tipos de calibración inversa: un modelo MLR inverso simplemente utiliza puntos individuales de intensidad del espectro. La dificultad de esta estrategia es de tipo matemático: teóricamente un gran número de muestras de calibración se necesitan si se va a usar un gran número de puntos de intensidad. El PCR, como su nombre lo indica, soluciona este problema mediante el uso de componentes derivados del PCA. De esta manera el número de componentes individuales reduce el número de intensidades en comparación al MLR inverso. El PLS soluciona el problema del MLR inverso de la misma manera mediante el uso de variables latentes, que son análogos de los componentes usados en el PCR con la excepción de que los primeros se derivan de un proceso claramente distinto, que toma en cuenta las características que están correlacionadas con la concentración (u otra información química que se quiera calibrar) ². En esta tesis se construyeron diversos modelos PLS, por lo que será el algoritmo explicado en más detalle.

4.3.2.6 Regresión por mínimos cuadrados parciales (PLSR)

La principal propiedad que le da al PLS un particular poder y utilidad, se debe al modo mediante el cual se hace la selección de la información espectral usada en la calibración. Al hacer un PLS los valores de referencia de la calibración son incluidos en el paso de descomposición, por lo que los cambios espectrales que están correlacionados con el valor de interés están altamente ponderados. Las relaciones no lineales entre las propiedades interés y las intensidades Raman pueden acomodarse en el modelo al incluir múltiples variables latentes (LVs por sus siglas en inglés) ². Las variables latentes también son variables comprimidas que poseen las propiedades matemáticas de la ortogonalidad; sólo que en el caso del PLS la compresión se hace de tal manera que la mayoría de la varianza de tanto 'x' como 'y' es explicada ⁴. Respecto al ruido de los espectros, este se aísla en otras LVs que no son incluidas en la calibración (al igual que en el PCA), con lo cual se mejora la precisión de la predicción ².

Existen varios algoritmos PLS diferentes, donde los más comunes son el algoritmo NIPALS (Non-Linear Iterative Partial Least Squares algorithm), el SIMPLS, y el algoritmo de bidiagonalización ⁴. Todos buscan el mismo objetivo: encontrar vectores bases en \mathbf{X} que expliquen secuencialmente la mayoría de la varianza tanto en \mathbf{X} como en \mathbf{y} . Los modelos PLS desarrollados en esta tesis se construyeron usando el algoritmo NIPALS, por lo que se presentará brevemente a continuación.

En el algoritmo NIPALS, varios parámetros del modelo PLS son estimados: los scores y loadings en x (\mathbf{T}_{PLS} y \mathbf{P}_{PLS} , respectivamente), los loadings en y (\mathbf{q}), y los pesos de los loadings (\mathbf{W}_{PLS}). Los pesos de los loadings tienen la misma dimensionalidad que los loadings en x \mathbf{P}_{PLS} . La distinción entre loadings y los pesos de loadings está en que los primeros se usan para calcular los espectros (\mathbf{X}) a partir de los scores ($\mathbf{X} = \mathbf{T}\mathbf{P}^t$), mientras que los pesos son usados para calcular los scores de los espectros ($\mathbf{T} = \mathbf{X}\mathbf{W}$).

Un modelo PLS puede condensarse en un conjunto de coeficientes de regresión (\mathbf{b}_{PLS}). En el caso del algoritmo NIPALS los coeficientes de regresión se calculan así:

$$\mathbf{b}_{PLS} = \mathbf{W}_{PLS} (\mathbf{P}_{PLS}^t \mathbf{W}_{PLS})^{-1} \mathbf{q} \quad (4.3)$$

El modelo luego puede usarse para obtener el valor y de una muestra incógnita usando su conjunto de valores x (\mathbf{x}_p):

$$y_{p,PLS} = \mathbf{b}_{PLS} \mathbf{x}_p \quad (4.4)$$

Respecto a las limitaciones del PLS se puede decir que, aunque con esta estrategia se pueden obtener predicciones muy precisas, mediante el aislamiento de unas cuantas características espectrales que proporcionan la información para la predicción, lo cierto es que también es sensible a pequeños cambios en los espectros, lo cual compromete la exactitud cuando las propiedades instrumentales o físicas cambian fuera del rango esperado. Es decir, los cambios en la calibración del eje x , la longitud de onda del láser, los anchos de banda observados (ya sea por efectos químicos o instrumentales) y algún efecto de absorción que dependa de la longitud de onda, son señales comunes que pueden llevar a que un modelo prediga con poca exactitud. Estos fenómenos pueden aparecer, por ejemplo, cuando se transfiere un modelo de un instrumento a otro, cuando se reemplaza alguna parte del instrumento o si este no es estable. Por último, algo muy importante es que el PLS se construya con datos normalizados. Esto estabilizará de manera importante el modelo PLS hacia cambios inevitables en la intensidad total de los espectros ².

4.3.2.7 Sobreajuste de un modelo

Anteriormente se dijo que dada la gran cantidad de variables respuesta disponibles a la hora de hacer un modelo, es tentador crear un modelo sobreajustado. Estos modelos exteriormente lucen atractivos por las estadísticas de ajuste que se obtienen, sin embargo incorporan una serie de problemas. Un modelo sobreajustado incorpora más ruido del instrumento y los datos de referencia, pero además, estos son sumamente específicos a los datos usados para su construcción. Lo segundo quiere decir que estos modelos son mucho más sensibles a cualquier condición que se desvíe de las condiciones usadas para recolectar las muestras de calibración⁴.

De igual manera también es posible producir un modelo sub-ajustado. Esto en la práctica es menos tentador pero es igualmente peligroso. En este caso, el modelo no es lo suficientemente complejo para tomar en cuenta los efectos que interfieren en los datos registrados, e incluso puede producir resultados inexactos aún en el caso de que se aplique a las mismas condiciones que se usaron para su elaboración. La Figura 4.3 es una representación gráfica del fenómeno de sobre y sub-ajuste. El error general de predicción de un modelo tiene la contribución de dos fuentes: el error de interferencia y el error de estimación. El error de interferencia disminuye continuamente conforme aumenta la complejidad del modelo de calibración, dado que los factores añadidos permiten que el modelo explique más interferencias de los datos. Sin embargo, el error de estimación aumenta a la vez cuando se va introduciendo más complejidad al modelo. No obstante, estas fuerzas que compiten producen un mínimo conceptual en la predicción del error general del modelo, y entonces los dos errores mencionados anteriormente se minimizan⁴.

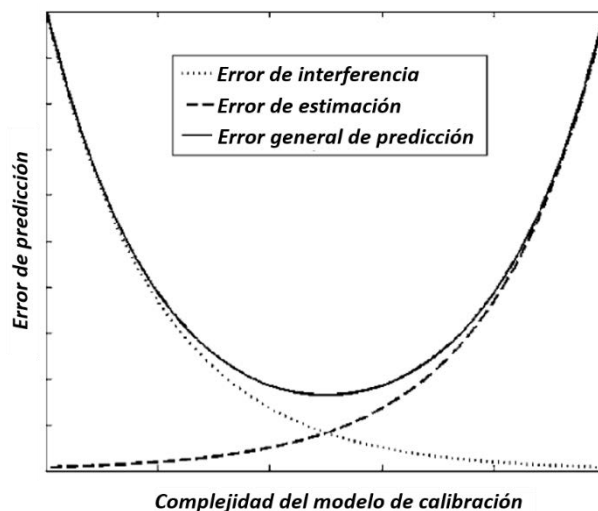


Figura 4.3 Gráfico conceptual del error de interferencia, error de estimación, y el error global de la predicción en función de la complejidad del modelo. Tomado de Miller, C.E. *Chemometrics in Process Analytical Technology (PAT)*.

4.3.2.8 Validación de un modelo

La puesta en marcha de un modelo pasa por una serie de etapas: construcción, optimización, evaluación y su implementación. Todo esto se hace partiendo de un conjunto limitado de datos de calibración. Existen dos técnicas que en la práctica son realizadas antes de poner en funcionamiento un modelo, que tienen que ver con algunas de las etapas mencionadas anteriormente: la validación del modelo, y la técnica de validación cruzada (*cross validation* en inglés). Mediante estas es posible cumplir con dos de las etapas de obtención de un modelo: por un lado, realizar su optimización, mediante la determinación de la complejidad óptima del modelo; y también, realizar una evaluación preliminar del desempeño del modelo antes de que sea implementado ⁴.

- Validación con un conjunto de muestras de prueba (*Test set validation*): la manera más sencilla de evaluar un modelo construido a partir de un conjunto de datos de calibración consiste en aplicarlo a un conjunto independiente de datos. Esto es lo mismo que poner en funcionamiento el modelo, con la diferencia de que las propiedades de estas muestras se conocen *a priori*, con lo cual se puede evaluar el desempeño del modelo. La principal figura de mérito en una validación con un conjunto de muestras de prueba es el error cuadrático medio de predicción (conocido comúnmente como RMSEP por sus siglas en inglés):

$$RMSEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (\hat{y}_i - y_i)^2}{N}} \quad (4.5)$$

donde \hat{y}_i es el valor de la propiedad estimado por el modelo para una muestra de prueba i , y_i es el valor de referencia de la propiedad de la muestra i , y N es el número de muestras de prueba.

Mediante esta técnica también es posible determinar la complejidad óptima de un modelo, esto mediante la representación del RMSEP en función del número de LVs. Un criterio para establecer el número óptimo de LVs puede ser encontrar el número con el cual se alcanza el mínimo de error, y que entonces con la adición de una LV más ocurra nuevamente un aumento en el error.

- Validación cruzada: A diferencia del caso anterior, los métodos de validación cruzada intentan validar un modelo usando sólo los datos de calibración, siendo innecesaria la preparación y análisis de otro conjunto adicional de muestras de prueba.

Con el fin de realizar una validación cruzada deben ejecutarse una serie de procedimientos de validación interna (llamadas subvalidaciones), donde cada subvalidación requiere 3 pasos:

- 1) El retiro de un subconjunto de las muestras de calibración.
- 2) El uso de las muestras de calibración restantes para construir una serie de modelos de calibración de distintas complejidades.
- 3) La aplicación posterior de los modelos a las muestras que se retiraron.

Luego de que todas las subvalidaciones son realizadas, las métricas RMSEP obtenidas para cada una de ellas se combinan para generar un valor RMSECV compuesto:

$$RMSECV = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (\hat{y}_{i,CV} - y_i)^2}{NCV}} \quad (4.6)$$

donde $\hat{y}_{i,CV}$ es el valor de la propiedad para la muestra de prueba i que es estimado en el proceso de subvalidación en el cual los datos del modelo no incluían la muestra i . NCV se refiere al número total de muestras retiradas a lo largo de todos los experimentos de subvalidación.

El gran problema de la validación cruzada está en que hay un único conjunto de datos involucrado en el proceso de validación del modelo. El procedimiento no tiene ningún vínculo con ningún conjunto nuevo de datos, el cual en la práctica estaría constituido por las mediciones nuevas generadas luego de que el modelo se haya establecido y haya pasado la validación cruzada. Kim H. Esbensen y Peter Paasch-Mortensen, en su capítulo de Teoría de Muestreo aplicada al proceso de muestreo, mencionan que en realidad la respuesta que se obtiene de una validación cruzada corresponde únicamente a una medida de la estabilidad interna del conjunto de calibración respecto a la exclusión secuencial de una muestra. Los autores mencionan además que la característica esencial de un conjunto adecuado de muestras de prueba, está en que este representa un nuevo proceso de extracción de la población. En términos de tabletas, son nuevas unidades que se van a extraer de un lote constituido por miles de tabletas, las cuales no se han usado en el modelado. Por tanto, cualquier validación sería que se haga con el fin de determinar el desempeño de un modelo para datos nuevos, debe incluir al menos, un conjunto aparte de muestras de prueba ⁵.

4.4 Cierre de Capítulo

Las herramientas de la quimiometría fueron utilizadas a lo largo de esta tesis para el análisis no destructivo de comprimidos farmacéuticos usando espectroscopía Raman. Habiendo descrito cómo se generan los espectros Raman de las tabletas analizadas, y cómo se extrae la información contenida en ellos, queda finalmente discutir la relevancia de este análisis dentro del control de calidad en la industria farmacéutica. Este será el tema del Capítulo 5.

4.5 Referencias

- (1) Smith, E.; Dent, G. *Modern Raman Spectroscopy: A Practical Approach*, First.; John Wiley & Sons, Ltd., 2005.
- (2) Shaver, J. M. In *Handbook of Raman Spectroscopy: From the Research Laboratory to the Process Line*; Lewis, I. R., Edwards, H., Eds.; CRC Press, 2001.
- (3) Martens, H.; Naes, T. *Multivariate calibration*; Wiley, 1989.
- (4) Miller, C. E. In *Process Analytical Technology*; Bakeev, K., Ed.; John Wiley & Sons, Ltd., 2010.
- (5) Esbensen, K. H.; Paasch-Mortensen, P. In *Process Analytical Technology*; Bakeev, K., Ed.; John Wiley & Sons, Ltd., 2010.
- (6) Kramer, R. *Chemometric techniques for quantitative analysis*; CRC Press, 1998.
- (7) Bro, R. *Anal. Chim. Acta* **2003**, *500*, 185–194.
- (8) Brereton, R. G. *Applied Chemometrics for Scientists*; John Wiley & Sons, Ltd., 2007.
- (9) Geladi, P. *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* **2003**, *58* (5), 767–782.
- (10) Strachan, C. J.; Rades, T.; Gordon, K. C.; Rantanen, J. J. *Pharm. Pharmacol.* **2007**, *59* (2), 179–192.
- (11) McCreery, R. L. *Raman Spectroscopy for Chemical Analysis*; John Wiley & Sons, Inc., 2000.
- (12) Pelletier, M. J. *Appl. Spectrosc.* **2003**, *57* (1), 20–42.
- (13) Savitzky, A.; Golay, M. J. E. *Anal. Chem.* **1964**, *36* (8), 1627–1639.
- (14) *The Unscrambler Methods*; CAMO Software AS, 2006.
- (15) Ferraro, J. R.; Nakamoto, K.; Brown, C. W. *Introductory Raman Spectroscopy*, 2nd ed.; Elsevier Science (EUA), 2003.

(16) Fraser, S. J.; Gordon, K. C. *Eur. Pharm. Rev.* **2014**, *19* (1), 27–32.

(17) Bro, R.; Smilde, A. K. *Anal. Methods* **2014**, *6* (9), 2812.

CAPÍTULO 5

CONTROL DE CALIDAD EN LA PRODUCCIÓN DE COMPRIMIDOS FARMACÉUTICOS DE BAJA DOSIFICACIÓN

APORTES DE LA ESPECTROSCOPÍA RAMAN

5.1 *Introducción*

Los comprimidos farmacéuticos están sujetos a una serie regulaciones respecto a su calidad. Ejemplos obvios son los requerimientos respecto al rendimiento del producto en términos de su efecto farmacológico, el cual está altamente ligado a la uniformidad de contenido del API en cada tableta, a las propiedades de desintegración de la tableta en partículas más pequeñas luego de su consumo, y a la velocidad de disolución de la sustancia activa de la tableta o partículas derivadas (es decir, la velocidad de liberación del compuesto activo). Para cada producto que se encuentra en el mercado hay un conjunto de criterios de calidad con sus límites correspondientes, los cuales son definidos por las autoridades del área de salud pertinentes, como pueden ser la Agencia de Administración de Medicamentos y Alimentos de Estados Unidos (FDA por sus siglas en inglés), y la Agencia Europea de los Medicamentos (EMA por sus siglas en inglés) en Europa ¹.

Durante el proceso de desarrollo de un nuevo comprimido farmacéutico, es posible distinguir 6 etapas ¹:

- 1) Diseño y síntesis de una sustancia farmacéuticamente activa (el API).
- 2) Caracterización y aseguramiento de la calidad de las materias primas a granel (tanto del API como de los excipientes).
- 3) Optimización de la composición de la formulación respecto al API y los excipientes.
- 4) Escalamiento de la fabricación (escala industrial).

5) Optimización y validación de las etapas de manufactura; y monitoreo de estas etapas durante la manufactura.

6) Aseguramiento de la calidad del producto terminado.

Durante varias décadas los científicos farmacéuticos han desarrollado sistemas alternativos para el suministro de fármacos. Todos estos esfuerzos llevaron a la administración sistémica pulmonar, la administración nasal, las formulaciones inyectables y la administración transdermal. No obstante, la administración oral sigue siendo la vía preferida cuando se considera la administración de un ingrediente activo nuevo ². El objetivo de este capítulo es explicar cuáles son las particularidades del proceso de producción y control de calidad de un comprimido de baja dosificación; y seguidamente, mencionar el papel que puede desempeñar la espectroscopía Raman en el análisis farmacéutico de este tipo de medicamento.

5.2 Retos en el desarrollo de medicamentos de baja dosificación

El desarrollo de un nuevo producto farmacéutico, ya sea de dosis normal o de baja dosis, sigue las mismas etapas mencionadas anteriormente. No obstante, el aumento en la potencia y la disminución de la dosis en los productos de baja dosificación presenta algunos retos adicionales ². En todos los casos el control de calidad de los productos terminados puede considerarse como una tarea desafiante, debido a la complejidad de las formas de dosificación y la presencia de múltiples excipientes en el producto terminado ³. Respecto a esto último, los medicamentos de baja dosificación tienen una relación excipientes/cantidad de API muy elevada. Esta característica presenta una serie de obstáculos para el proceso de obtención de la formulación, entre los que se puede mencionar ²:

- Dificultad para alcanzar la uniformidad de contenido debido a la baja concentración. Al respecto, las propiedades físicas del API (tamaño de partícula, forma y densidad), y un proceso de mezclado deficiente de la pequeña cantidad del API con los excipientes, pueden llevar a una inadecuada uniformidad de contenido.

- Posibilidad de fabricar productos de una menor potencia debido a pérdidas durante la manufactura. Esto va a depender del proceso específico por el cual se fabrica el medicamento.

- Inestabilidad debido a la proporción tan elevada de los excipientes respecto al API, lo que incrementa las probabilidades de incompatibilidad. La inestabilidad puede estar asociada a impurezas de los excipientes.
- Inestabilidad química debido al proceso de micronización del API, por lo que éste tiene una mayor superficie de exposición a los excipientes, la humedad, y al equipo de manufactura.
- Inestabilidad debido a la transformación a una forma sólida menos estable, ya sea durante la manufactura o en el almacenamiento a largo plazo. Un contenedor con un sistema de cierre no óptimo también puede ser una causa de inestabilidad.

A lo largo de los últimos 20 años, la industria farmacéutica ha venido descubriendo y desarrollando cada vez más medicamentos de baja dosificación. La dosis de un producto de baja dosificación puede ser tan baja como 0.25 µg. Las formas de dosificación incluyen tabletas, cápsulas duras de gelatina y cápsulas elásticas suaves; y pueden ser productos que incluyan un único API o una combinación de varios. Estos productos abarcan un amplio rango de áreas terapéuticas ².

5.3 Marco regulatorio vigente, y su impacto en el desarrollo de nuevos medicamentos

El descubrimiento, desarrollo, y aprobación de un nuevo medicamento, requiere de un proceso que en la práctica está bastante definido. En su mayoría, las distintas fases se pueden clasificar en alguno de estos tres tipos de actividades ²:

- Estudios científicos diseñados para generar datos sobre la seguridad, efectividad, o toxicidad del producto.
- Preparación y presentación de estos datos en una solicitud de registro.
- Revisión y aprobación de la solicitud por la autoridad regulatoria.

En general, la información sobre el proceso de desarrollo de un medicamento que se requiere incluir en una solicitud de registro es limitada. No obstante, la FDA en particular ha publicado una serie de documentos con iniciativas y guías donde expone su pensamiento actual sobre todo lo que es el desarrollo de un medicamento nuevo. Tales

iniciativas y guías han tenido un impacto significativo en el desarrollo y aprobación de nuevos medicamentos ². Algunas que se pueden citar son:

- *Pharmaceutical Current Good Manufacturing Practices (cGMPs) for the 21st Century* ⁴: se trata de una iniciativa publicada por la FDA en 2002, la cual pretende aumentar y modernizar la regulación de la manufactura farmacéutica y la calidad del producto ⁵. Propone la supervisión de la calidad de fabricación basada en sistemas modernos de calidad y todo lo que tiene que ver con análisis de riesgo. Establece además que la calidad del producto debe mantenerse a lo largo de todo su ciclo de vida. Respecto a la gestión del riesgo de la calidad farmacéutica, ésta en última instancia debe enlazar la protección del paciente con la calidad del medicamento producido ².

- *Process Analytical Technology (PAT)- a framework for innovative pharmaceutical development, manufacturing, and quality assurance* ⁶: Iniciativa publicada por la FDA en 2004. Su principal objetivo es incentivar a los fabricantes a usar los últimos avances científicos en la manufactura y tecnología farmacéutica. PAT es un sistema para diseñar, analizar y controlar la manufactura de las materias primas, sus transformaciones y los procesos que van ocurriendo, estableciendo atributos críticos de calidad y desempeño con el fin de asegurar la calidad del producto terminado ² (Figura 5.1). El concepto de garantía de calidad continua en tiempo real es fundamental en el entorno PAT ⁵.

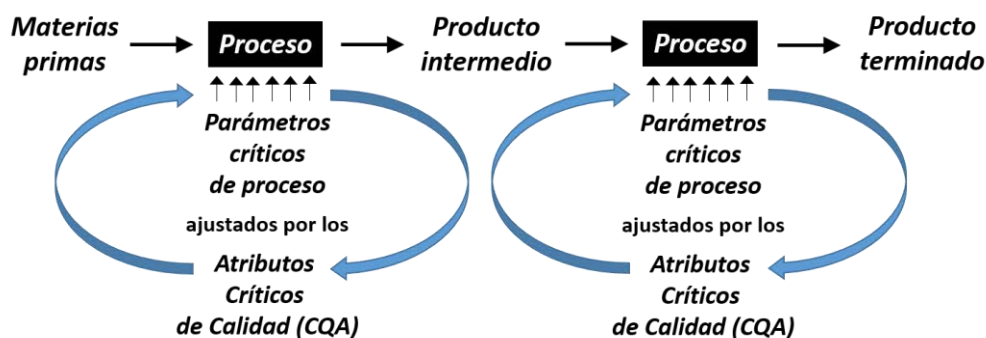


Figura 5.1 Esquema de un control paso a paso de la producción. Tomado de Tho, I., Bauer-Brandl, A. *Chemometrics (PCA) in Pharmaceuticals: Tablet development, manufacturing and quality assurance*.

- *Quality by design (QbD)*: Un producto comercializado debe alcanzar consistentemente una calidad predefinida al final del proceso de manufactura. Un medicamento nuevo desarrollado en un sistema QbD usa la información y conocimientos obtenidos en los estudios de desarrollo farmacéutico y la experiencia de fabricación. Toda esta información

y conocimiento proporciona el entendimiento científico, y sirve para establecer el espacio de diseño, especificaciones, y control de la manufactura ².

La EMA por su parte estableció un equipo de PAT en 2003, el cual ha publicado documentos de guía sobre el proceso PAT y QbD. Por otro lado, las guías de calidad Q8, Q9 y Q10 de la Conferencia Internacional sobre Armonización de Requisitos Técnicos para el Registro de Productos Farmacéuticos para Uso Humano (ICH por sus siglas en inglés) reforzaron las guías de la FDA y EMA, y fueron implementadas en Estados Unidos, la Unión Europea y Japón en 2009. Todos estos documentos pretenden ser una guía estratégica para desarrollar un enfoque que permita comprender y gestionar los riesgos que pueden afectar los atributos críticos de calidad ⁵. Se trata de un cambio filosófico en la calidad de la producción farmacéutica, ampliamente incentivado por las agencias regulatorias, donde la industria por su parte ha tenido que cambiar sus métodos de desarrollo y manufactura con el fin de cumplir una serie de requisitos más estrictos ².

La espectroscopía Raman es sin duda una herramienta PAT. Como técnica para el análisis del API se han descrito diversas aplicaciones, las cuales incluyen la identificación de polimorfos, el análisis cuantitativo, el monitoreo in situ de una cristalización, ensayos de liberación en tiempo real, operaciones unitarias farmacéuticas y transformaciones inducidas por procesos. Mención aparte merece la espectroscopía Raman en línea, la cual se puede usar para el control de parámetros críticos de proceso, permite realizar correcciones de proceso en tiempo real y puede servir para asegurar la producción consistente de la forma correcta del API ⁵.

5.4 Uniformidad de contenido de mezclas en polvo y productos terminados

5.4.1 Estado actual de los requisitos que deben cumplir los fabricantes

El objetivo del desarrollo de una formulación es diseñar un producto de calidad y su proceso de manufactura, con el fin de que el medicamento producido realice su función de forma consistente. En este sentido, la uniformidad de contenido es una de las características de la composición de la formulación que impactan sobre los atributos críticos de calidad del producto terminado ².

De acuerdo a la norma 21 CFR 211.110 de la FDA, los fabricantes farmacéuticos están legalmente obligados a demostrar la adecuación del mezclado, con el fin de asegurar la

uniformidad de las mezclas en polvo que se generan durante la fabricación, así como la uniformidad de las unidades de dosis finales. La uniformidad de las unidades de dosis es una especificación de producto para las formas de dosificación oral, y se prueba para asegurar que el producto cumple los criterios de aceptación establecidos ².

Para asegurar la consistencia de las unidades de dosis, antes de la compresión de la tableta o el rellenado de una cápsula se obtiene una mezcla homogénea en polvo. La mayoría de procesos para la producción de formas de dosificación oral sólidas incluyen una operación de mezcla, dentro de los que se puede mencionar la granulación húmeda, de lecho fluido, seca, o la compresión directa ⁷.

En 2003 la FDA publicó un proyecto de Guía que proponía el uso del muestreo estratificado de la mezcla, y de las unidades de dosificación, para demostrar la adecuación del mezclado de los polvos que constituyen una formulación ⁸. Un muestreo estratificado es el proceso de muestreo de unidades de dosificación en intervalos predefinidos, y en ubicaciones objetivo específicas en la operación de compresión/llenado que tienen un mayor potencial de dar resultados extremos para arriba o para abajo. Los datos de la uniformidad de las mezclas en polvo se comparan con los datos obtenidos para las unidades de dosificación, siguiendo también una estrategia de muestreo estratificado en el flujo por el cual van saliendo los comprimidos terminados ². Finalmente la uniformidad de contenido de las unidades finales se verifica aplicando la prueba de Uniformidad de las Unidades de Dosificación (abreviada prueba UDU), la cual está armonizada entre las Farmacopeas de Estados Unidos (prueba USP <905>)⁹ y la Europea (prueba 2.9.40)¹⁰. La prueba UDU se utilizó para la verificación de las tabletas analizadas durante esta tesis, y será explicada con más detalle en el trabajo experimental correspondiente.

Este proyecto de Guía fue retirado por la FDA en agosto de 2013, en conjunto con otros 23 proyectos, y la justificación en todos los casos está en que alguno de los apartados que incluyen, ya no reflejaban el pensamiento de la Agencia al momento de la retirada ¹¹. En el caso puntual de la propuesta de Guía mencionada anteriormente, los puntos divergentes eran dos: por un lado, que en el momento del muestreo en la mezcladora de polvos, el documento recomendaba tomar 3 replicados de muestra en 10 ubicaciones distintas, pero posteriormente sólo 1 de los replicados se usa para evaluar la homogeneidad de la mezcla de polvos. En el momento de la retirada, la FDA consideró que deben evaluarse todos los replicados, con el fin de realizar un análisis con validez estadística. El segundo punto tiene que ver con la aplicación de la prueba UDU, ya que esta no incorpora un plan de muestreo estadístico del conjunto de tabletas o cápsulas que son tomadas durante el proceso de

llenado de cápsulas o compresión de tabletas (la propuesta de Guía indica tomar un mínimo de 140 unidades, pero de estas sólo 10 se analizan cuantitativamente para la prueba UDU). Por tanto, los resultados no pueden extrapolarse al gran número de tabletas que se están produciendo; es decir, que no se puede afirmar con la suficiente seguridad, que si se toman más muestras éstas también van a pasar la prueba, y la FDA no apoya más el uso de la prueba UDU para la liberación de un lote ¹².

La retirada del documento, y la falta de confianza de la FDA en los resultados de la prueba UDU, generaron una incertidumbre en los fabricantes que se basaban en el enfoque tradicional de uniformidad de la mezcla y de las unidades de dosificación, para la validación del proceso y la liberación de lotes comerciales ^{12,13}. No obstante, estos cambios también representan una oportunidad para desarrollar un enfoque más moderno, con el fin de hacer cumplir los requisitos de las Buenas Prácticas de Manufactura en esta área.

5.4.2 Alternativas propuestas a la aplicación de la prueba de Uniformidad de las Unidades de Dosificación incluida actualmente en las Farmacopeas

5.4.2.1 Propuesta de modificación a la guía publicada en el año 2003 por la FDA

En el año 2015 se publicó una propuesta ¹⁴ surgida de un grupo de trabajo formado por expertos de FDA, la academia y la industria, patrocinado por la Sociedad Internacional para la Ingeniería Farmacéutica (ISPE por sus siglas en inglés), ante la necesidad de resolver el vacío que se generó luego de la retirada del documento del año 2003. Es importante recordar que se trataba de una propuesta de Guía, por lo que en realidad nunca fue aprobada, pero que era utilizada por muchas empresas que ahora se encontraban en la necesidad de disponer de otro procedimiento para justificar sus prácticas de muestreo. Así mismo, esta situación también podía impactar sobre los procesos de validación y aprobación de medicamentos nuevos requeridos por los pacientes ¹⁵.

La propuesta de este grupo incluye una serie de modificaciones a la propuesta de Guía del año 2003 (la cual estaba enfocada en la verificación del proceso de homogeneización de las mezclas de polvo y de las unidades de dosificación que se van generando), pero también tiene un apartado en el cual se propone una modificación del procedimiento con el cual se aplica la prueba UDU para la liberación de los lotes comerciales. Con estos cambios se pretende dar respuesta a las inquietudes de la FDA que motivaron el retiro del documento en el año 2013. Las propuestas son las siguientes ¹⁴:

- En lo que se refiere a los 3 replicados de las 10 ubicaciones en la mezcladora de polvo, al inicio se sigue procesando solo un replicado por ubicación (lo mismo que estaba indicado en la propuesta de Guía del 2003), sin embargo ahora se incluye una estimación de la desviación estándar de los valores cuantificados en estas muestras: este número de muestras es suficiente para demostrar la uniformidad de mezcla si la desviación estándar es menor o igual al 3 % del valor objetivo. En caso de que sea mayor, se deben procesar los otros replicados de cada ubicación, y nuevamente se aplica el límite del 3 % para dar por adecuada la uniformidad de mezcla.

- Respecto a la verificación de las unidades de dosificación que se van produciendo, se propone la toma de al menos 3 unidades en 40 momentos equidistantemente separados de la producción. Se analizan todas las unidades de la mitad de las tomas (60 unidades), y se aplican dos criterios: uno es fijo (todos los valores deben estar entre el 75 y 125 % del contenido nominal), y otro queda a discreción del fabricante (de este se hará mención posteriormente). En caso de que estos no sean superados, deben procesarse las otras unidades y nuevamente se aplican los mismos criterios.

- En el caso de la verificación continua para la liberación de lotes comerciales, se propone que el fabricante implemente un plan de muestreo en el cual se vayan tomando unidades a lo largo de todo el proceso de obtención del lote (hasta juntar por ejemplo, 30 unidades). Luego se deben analizar cuantitativamente 10 unidades. La selección de estas 10 unidades no es aleatoria, sino que deben estar identificadas en el plan de muestreo, e incluir el inicio y el final del periodo de fabricación del lote. A continuación se realiza su análisis y se aplican los dos criterios mencionados en el apartado anterior. En el caso de que no se superen, se deben analizar las 20 unidades restantes.

Esta propuesta da flexibilidad al fabricante respecto al enfoque estadístico y los criterios de aceptación que use para evaluar la uniformidad de contenido de las unidades de dosificación, basado en una justificación. La selección debe hacer un balance de los riesgos para los consumidores y productores, y tomar en cuenta otros factores tales como el índice terapéutico del medicamento (en este sentido, los medicamentos de elevada potencia y/o índice terapéutico estrecho pueden requerir de un criterio de aceptación más estrecho para reducir el riesgo al consumidor de liberar un lote no adecuado). El criterio estadístico debe proporcionar la confiabilidad suficiente de que los productos tienen una uniformidad de contenido aceptable, y de que en el caso de que se tomen más muestras del lote, estas tienen una probabilidad alta de pasar la prueba UDU. Como propuestas de

criterios estadísticos, se sugiere el método ASTM E2709/E2810, y la estrategia del intervalo de tolerancia (TI por sus siglas en inglés).

5.4.2.2 Capítulo 2.9.47 de la Farmacopea Europea, respecto a la evaluación de la Uniformidad de las Unidades de Dosificación usando tamaños de muestra grandes

Antes de que la FDA externara su opinión respecto a la poca adecuación de la prueba UDU para la verificación de un lote de producción antes de ser liberado, la Farmacopea Europea propuso en 2011 la inclusión de un capítulo nuevo, en el cual se modifica la prueba para el caso de que se pueda analizar un número mucho mayor de unidades de dosificación. Esto actualmente es posible haciendo uso de las herramientas PAT, las cuales son rápidas y no destructivas ¹⁶.

El procedimiento estándar de la prueba UDU empieza por seleccionar no menos de 30 unidades (no se indica bajo cual estrategia deben obtenerse), y de estas sólo 10 unidades son analizadas cuantitativamente. Con este número de unidades siempre hay un riesgo de que un lote con una variabilidad alta pase la prueba y sea liberado; y de la misma forma, también puede ocurrir que un lote con una calidad adecuada falle en la prueba UDU y sea rechazado ¹⁶. Incrementando el tamaño de muestra es posible entonces obtener una estimación más precisa de la variabilidad del lote. En la prueba UDU se calcula un valor de aceptación, el cual toma en cuenta una constante de aceptabilidad k que viene indicado en la prueba estándar para $n=10$ o $n=30$. El capítulo 2.9.47 incluye constantes de aceptabilidad para hasta $n=10000$, pero además considera la distribución normal que puede tener un lote de miles de unidades, por lo que la prueba admite un número pequeño de unidades que se desvíen significativamente del valor medio. Esto aplica cuando n es mayor o igual a 500 ¹⁷.

5.4.2.3 Evaluación de la uniformidad de contenido en mezclas en polvo y productos terminados en base a los conceptos PAT

Los mismos autores de la propuesta de modificación ¹⁴ al documento retirado por la FDA en 2013, reconocen que la estrategia sugerida por ellos aplica especialmente para aquellos productos que usan técnicas analíticas tradicionales para evaluar la adecuación de una mezcla de polvos y la uniformidad de las unidades de dosis. Por otro lado, en el Capítulo

2.9.47 de la Farmacopea Europea se menciona que el procedimiento descrito está dirigido a aplicaciones PAT, pero que también es aplicable a los métodos analíticos tradicionales.

Muy recientemente Kim H. Esbensen y colaboradores (2016) publicaron un trabajo en el que se propone como base la aplicación de los conceptos de Teoría de Muestreo para la verificación de las mezclas farmacéuticas y las unidades de dosificación ¹⁵. En este marco, hacen una crítica al interés de la FDA por analizar los 3 replicados de las ubicaciones muestreadas en la mezcladora de polvos. Al respecto dicen que las muestras analizadas no son verdaderos replicados dado que estas se originaron, en el mejor de los casos, como muestras muy próximas de un material heterogéneo. Evidentemente se trata de un muestreo extractivo, y en la literatura están reportadas las limitaciones asociadas a este tipo de muestreo, debido al arrastre hacia abajo y las alteraciones in-situ de la microestructura del polvo mientras se va introduciendo el instrumento de muestreo ¹⁸.

La estrategia basada en la Teoría de Muestreo permite realizar una evaluación de la homogeneidad de mezcla del volumen 3D completo mediante el monitoreo de una corriente de salida unidimensional. Esto se puede aplicar tanto a un proceso de manufactura en continuo como a uno en el que el mezclado se realice usando contenedores, en ambos casos mediante la instalación de una sonda a la salida del instrumento de mezcla. Los autores hablan de un mapeo lineal del contenido completo del contenedor, y como estrategia permite verdaderamente asegurar un muestreo representativo, en comparación a la estrategia deficiente del muestreo extractivo. No obstante, a pesar de que el control se realiza a la salida del instrumento de mezcla, siempre hay algún transporte o manipulación hasta el punto donde se realiza la operación de compresión de la mezcla en tabletas (o el llenado de las cápsulas). El flujo monitoreado puede por tanto sufrir algún proceso de segregación. Este es el motivo por el cual las autoridades regulatorias solicitan una determinación de la homogeneidad de la mezcla de polvos, y además un análisis en los productos terminados ¹⁵.

Respecto al análisis de control de las tabletas y cápsulas acabadas, mencionan que un proceso de toma de muestras convencional (aplicando eso sí los conceptos de la Teoría de Muestreo) es válido, pero que se podría realizar de una forma más efectiva si se basa en el uso de alguna herramienta PAT (NIR, UV, Raman). Esto en principio permitiría el control de todas las unidades de dosificación, pero en la práctica podría realizarse mediante una tasa de muestreo estadístico más razonable del lote linealizado.

5.4.3 Particularidades de la determinación de uniformidad de contenido en el caso de productos de baja dosificación

Los problemas más comúnmente asociados al proceso de mezcla en una formulación de dosis baja son la alta variabilidad en la potencia (análisis con una desvío estándar relativo alto), y la aparición de valores atípicos. Anteriormente se discutieron distintas metodologías para la evaluación de la uniformidad de contenido, aplicables a cualquier tipo de medicamento. Sin embargo en el caso de productos con bajo contenido de API, es sumamente importante que el diseño de la formulación también ayude a alcanzar la uniformidad de contenido de los productos terminados ².

En este sentido el control del tamaño de partícula del API es crítico en los productos de baja dosificación. Si el API como materia prima contiene partículas grandes, o agregados de partículas finas, y estos son encontrados en una unidad de dosificación, la potencia observada fácilmente puede caer fuera de los límites correspondientes. En caso de que este problema no sea detectado un paciente podría eventualmente recibir una sobredosis. El mezclado no soluciona este problema, y entonces las partículas grandes deben ser reducidas en tamaño antes de intentar obtener una mezcla homogénea. Por tanto, cuando se considera el desarrollo de un medicamento de baja dosificación, debe establecerse desde el inicio una estrategia de control del tamaño de partícula del API. En el caso específico de la manufactura de un comprimido por compresión directa, el tamaño y distribución de tamaños de partícula de los excipientes tiene un impacto significativo en la homogeneidad del mezclado, la segregación del polvo y su fluidez. En caso de que no esté controlado puede resultar en uniformidades de contenido inaceptables y una variación alta en el peso de las tabletas, por lo que el control de los excipientes es más crítico ¹⁹.

5.5 División de tabletas

La práctica de prescribir un medicamento que para su uso debe ser dividido es prevalente en todo el mundo. Los motivos por los cuales se recurre a esta práctica incluyen la falta de medicamentos en el mercado con la fuerza específica que se requiere, el posible ahorro que puede haber al comprar un producto de mayor fuerza y luego hacer su división, y facilitar la deglución del medicamento ²⁰.

Las tabletas pueden ser divididas a mano o mediante el uso de varios tipos de divisores de tabletas. Al respecto en la literatura se encuentran gran cantidad de ejemplos en los que se usan estos dispositivos para la división de tabletas que poseen alguna ranura que sugiere

la realización de este paso, pero también para tabletas sin marcas ²¹. Los divisores de tabletas son fáciles de usar, y en distintos censos de pacientes se ha encontrado que se trata de una práctica a la cual las personas tratadas se adaptan fácilmente, debido a la facilidad del acto de división, y por los beneficios que puede traer a nivel económico ²².

A pesar de las ventajas de la división de tabletas, se han identificado una serie de situaciones no deseables que podrían ocurrir. Estas tienen que ver con la variación de masas en los fragmentos obtenidos, problemas por un contenido de API no homogéneo en la unidad de dosis, y la estabilidad del medicamento luego de la división. Estos atributos de calidad pueden potencialmente impactar en el rendimiento del producto, y son especialmente relevantes para los medicamentos de índice terapéutico estrecho (NTI por sus siglas en inglés) ²². Este tipo de medicamentos se caracteriza por una separación pequeña entre las concentraciones terapéuticas y las concentraciones tóxicas en sangre, por lo que las personas sujetas a un tratamiento con este tipo de fármaco requieren un monitoreo constante ²³. Se hace mención de este tipo de medicamentos porque el producto analizado durante esta tesis es un NTI: el Sintrom (API: acenocumarol).

En respuesta a las inquietudes sobre la división de tabletas, la FDA publicó una Guía para la industria sobre el ranurado de tabletas en marzo de 2013 ²⁴. La guía incluye criterios de prueba para tabletas ranuradas, de las cuales se puede destacar la aplicación de la prueba UDU a todas las porciones que se pueden obtener al dividir la tableta. Textualmente la guía menciona que cada porción dividida de una tableta es considerada una unidad de dosis, y debe cumplir el requisito de uniformidad de las unidades de dosificación ²⁴.

La división de tabletas también ha sido considerada en los estándares de las Farmacopeas. La Farmacopea Europea actualmente incluye una prueba como parte del desarrollo del producto respecto a la uniformidad de masa de las partes divididas. A diferencia de lo que propone la Guía de la FDA de 2013, respecto a la evaluación de todos los fragmentos, en la prueba de masas incluida en la Farmacopea Europea únicamente se toma uno de los fragmentos y el resto son descartados. Finalmente respecto a la Farmacopea de Estados Unidos, en 2009 publicó un artículo de estímulo proponiendo criterios para evaluar la pérdida de masa al dividir y la exactitud de la división de las tabletas fragmentadas ²⁵.

Existen dos productos de Sintrom en el mercado español, los cuales contienen 1 y 4 mg de API. La tableta de 4 mg tiene una ranura en forma de cruz en una de sus caras, y en la práctica la división de la tableta en mitades o cuartos es considerada con el fin de obtener subdosis. La evaluación de la homogeneidad de distribución de la pequeña cantidad de API que contienen estas tabletas usando espectroscopía Raman fue investigada durante esta

tesis. De igual manera, se hicieron pruebas para determinar la dispersión de las masas de las mitades o cuartos de tableta que se pueden obtener luego de la división.

5.6 Aportes de la espectroscopía Raman al control de calidad de los medicamentos de baja dosificación

Los medicamentos de bajo contenido de ingrediente activo presentan un reto considerable para los químicos analíticos, respecto a los métodos de análisis que se deben desarrollar para el control de calidad de los productos terminados. Esto incluye el desarrollo de métodos robustos que determinen cantidades traza del API y alguna impureza en la tableta, resolver interferencias debidas a las impurezas de los excipientes, y la determinación de residuos del API en los equipos de producción luego de su limpieza ². En adición a los atributos de calidad críticos que deben determinarse en el medicamento terminado, relacionados con el contenido de ingrediente activo y los perfiles de impurezas, un tercer atributo a tener en cuenta es la determinación de la forma en estado sólido de la sustancia activa presente ³.

Bajo este panorama, y dado que la técnica instrumental mayoritariamente usada en esta tesis fue la espectroscopía Raman, cabe preguntarse hasta donde han llegado los avances de la técnica en el campo del análisis de comprimidos de baja dosificación. Como se dijo en el Capítulo 4, la mayoría de APIs dan espectros Raman con gran cantidad de bandas, mientras que los excipientes dan señales Raman poco intensas. Esto hace que la espectroscopía Raman sea una herramienta muy útil para el análisis cuantitativo del producto terminado, aún para concentraciones de API muy bajas ³.

Respecto a la forma del API en el estado sólido, es sabido que puede tener un impacto significativo en su biodisponibilidad y estabilidad, de manera que la identificación y caracterización de las formas en el estado sólido es una parte muy importante en el desarrollo de la formulación. También es sabido que las sustancias activas pueden sufrir transiciones durante la manufactura y con las condiciones de almacenamiento. Por tanto, aunque las propiedades del ingrediente activo como materia prima estén muy bien caracterizadas, esto no necesariamente es cierto para el producto final. En el apartado analítico, existen muchos métodos para la determinación de la forma en el estado sólido del ingrediente activo como materia prima, sin embargo esta determinación para el producto terminado es más difícil, y la dificultad se incrementa si el API está presente en una concentración muy baja ²⁶. Una de las fortalezas de la espectroscopía Raman en el

estado sólido se debe a la capacidad de producir una huella de bandas vibracionales única que representa el arreglo 3D de una forma polimórfica particular de un sólido cristalino. Por tanto, las alteraciones sutiles de la estructura en el estado sólido, que incluyen los cambios en el estado conformacional debido a modificaciones polimórficas, pueden brindar señales Raman cuantitativas específicas, tanto para el análisis de una materia prima como en tabletas y cápsulas ²⁶. De la misma manera, un hidrato por lo general puede ser fácilmente cuantificado en presencia de un anhidrato en una mezcla usando los espectros Raman ³. Para este tipo de análisis, una correspondencia adecuada entre la distribución de tamaño de partícula de las mezclas de calibración, con aquella de la muestra en estudio, es necesaria para evitar la influencia del tamaño de partícula en la intensidad Raman, previniendo así errores cuantitativos de predicción ²⁷.

Por último, respecto al análisis de impurezas, ya la determinación de una muy pequeña cantidad de ingrediente activo por espectroscopía Raman, corresponde a poner la técnica "al límite" en términos cuantitativos. En este sentido el uso de la cromatografía líquida, haciendo uso de alguna estrategia para aumentar la sensibilidad (formación de algún derivado de la impureza, técnicas de preconcentración, uso de sistemas con detector de masas) representa la principal herramienta a disposición de los químicos analíticos para la cuantificación de impurezas en fármacos de baja dosis. Evidentemente se trata de un método destructivo. No obstante, recientemente se publicó un trabajo usando espectroscopía Raman aumentada por la superficie de imagen química (SERS-CI por sus siglas en inglés), en el cual se demostró la factibilidad de la cuantificación 4-aminofenol, la principal impureza del paracetamol, a niveles por debajo del límite de la especificación del producto (1000 ppm). Como cabría esperar, el análisis propuesto es no destructivo ²⁸.

5.7 Cierre de Capítulo

Con esto se da fin al marco teórico en el cual se basaron los experimentos realizados, y que servirá también para explicar los hallazgos encontrados a lo largo de esta tesis doctoral. A continuación se hace una presentación breve de los trabajos experimentales que conforman esta tesis.

5.8 Referencias

- (1) Tho, I.; Bauer-Brandl, A. In *Principal Component Analysis - Multidisciplinary Applications*; Sanguansatm, P., Ed.; InTech, 2012.

- (2) Zheng, J. In *Formulation and analytical development for low-dose oral drug products*; Zheng, J., Ed.; Wiley, 2009.
- (3) Paudel, A.; Rajjada, D.; Rantanen, J. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2015**, *89*, 3–20.
- (4) *Pharmaceutical Current Good Manufacturing Practices (CGMPs) for the 21st Century*. Department of Health and Human Services. U.S. Food and Drug Administration; 2002.
- (5) Esmonde-White, K. A.; Cuellar, M.; Uerpmann, C.; Lenain, B.; Lewis, I. R. *Anal. Bioanal. Chem.* **2017**, *409* (3), 637–649.
- (6) *Guidance for Industry PAT — A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing, and Quality Assurance*. U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration; 2004.
- (7) Meeus, L. *Pharm. Technol. Eur.* **2011**, *23* (3).
- (8) *Guidance for Industry. Powder Blend and Finished Dosage Units-Stratified In-Process Dosage Unit Sampling and Assessment. Draft Guidance*. U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research; 2003.
- (9) <905> *Uniformity of Dosage Units*. United States Pharmacopoeia 39; U.S. Pharmacopoeial Convention: Rockville, MD, 2016.
- (10) *2.9.40 Uniformity of Dosage Units*. European Pharmacopoeia 9.0; Council of Europe, Strasbourg, 2017.
- (11) New FDA Guidance on the Finalization of several FDA Draft Guidances - ECA Academy <http://www.gmp-compliance.org/gmp-news/new-fda-guidance-on-the-finalization-of-several-fda-draft-guidances> (accessed Apr 23, 2017).
- (12) Questions and Answers on Current Good Manufacturing Practices—Production and Process Controls. U.S. Food and Drug Administration <https://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm124782.htm> (accessed Apr 23, 2017).
- (13) Blend and Content Uniformity Initiative | ISPE <http://www.ispe.org/blend-content-uniformity-initiative> (accessed Apr 23, 2017).
- (14) Garcia, T.; Bergum, J.; Prescott, J.; Tejwani, R.; Parks, T.; Clark, J.; Brown, W.; Muzzio, F.; Patel, S.; Hoiberg, C. *J. Pharm. Innov.* **2014**, *10* (1), 76–83.
- (15) Esbensen, K. H.; Román-Ospino, A. D.; Sanchez, A.; Romañach, R. J. *Int. J. Pharm.* **2016**, *499* (1–2), 156–174.
- (16) Holte, O.; Horvat, M. *Pharmeuropa* **2011**, *23* (2), 285–293.
- (17) *2.9.47 Demonstration of uniformity of dosage units using large sample sizes*. European Pharmacopoeia 9.0; Council of Europe, Strasbourg, 2017.
- (18) Muzzio, F. J.; Robinson, P.; Wightman, C.; Dean Brone. *Int. J. Pharm.* **1997**, *155* (2), 153–178.
- (19) Johnson, K. C. In *Formulation and analytical development for low-dose oral drug products*; Zheng, J., Ed.; Wiley, 2009.
- (20) Chou, C. L.; Hsu, C. C.; Chou, C. Y.; Chen, T. J.; Chou, L. F.; Chou, Y. C. *Int. J. Clin. Pharm.*

2015, 37 (6), 1235–1241.

- (21) Ciavarella, A.; Khan, M.; Gupta, A.; Faustino, P. *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* **2016**.
- (22) Shah, R. B.; Collier, J. S.; Sayeed, V. A.; Bryant, A.; Habib, M. J.; Khan, M. A. *Am. Assoc. Pharm. Sci.* **2010**, 11 (3), 1359–1367.
- (23) Burns, M. J. *Thromb. Thrombolysis* **1999**, 7, 137–143.
- (24) *Guidance for Industry. Tablet Scoring: Nomenclature, Labeling, and Data for Evaluation.* U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration.; 2013.
- (25) Green, G.; Berg, C.; Polli, J. E.; Dirk, M. *Pharmaceutical Forum* **2009**, 35 (6), 1598–1612.
- (26) Taylor, L. S.; Langkilde, F. W. *J. Pharm. Sci.* **2000**, 89 (10), 1342–1353.
- (27) Hu, Y.; Wikström, H.; Byrn, S. R.; Taylor, L. S. *Appl. Spectrosc.* **2006**, 60 (9), 977–984.
- (28) De Bleye, C.; Sacré, P. Y.; Dumont, E.; Netchacovitch, L.; Chavez, P. F.; Piel, G.; Lebrun, P.; Hubert, P.; Ziemons, E. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2014**, 90, 111–118.

CAPÍTULO 6

EL MUESTREO DE UN MATERIAL HOMOGÉNEO USANDO ESPECTROSCOPIA RAMAN

INFLUENCIA DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA EN LA INTENSIDAD DE LOS ESPECTROS Y EN LA PRECISIÓN DEL ANÁLISIS

6.1 *Introducción*

La espectroscopía Raman es una técnica que en la actualidad es considerablemente usada para el desarrollo de métodos analíticos que son requeridos por diversas industrias. Entre ellas, y probablemente debido a la implantación de nuevos procedimientos en el entorno PAT ¹, un número elevado de nuevas aplicaciones están enfocadas en el análisis farmacéutico, donde la espectroscopía Raman es usada para el monitoreo de las diferentes etapas que constituyen el proceso de fabricación de un medicamento ²⁻⁵.

Cuando se analiza un material sólido mediante esta técnica, el espectro obtenido es una combinación de las propiedades químicas y físicas de la muestra que se está midiendo. Las propiedades químicas representan la principal contribución a la apariencia del espectro, lo cual permite por ejemplo, la construcción de bibliotecas espectrales ^{6,7}, y el desarrollo de métodos para la determinación del contenido de API en una preparación farmacéutica ^{8,9}. No obstante las propiedades físicas también son importantes, pero hasta cierto punto su contribución es menos intuitiva. La principal propiedad que contribuye al efecto físico en los espectros es el tamaño de partícula, y en este sentido, se ha reportado que la exactitud de un método Raman puede verse afectada cuando los tamaños de partícula de las muestras de calibración y predicción son distintos ^{10,11}.

La relación entre la señal Raman y las propiedades de los polvos fue descrita por Schrader y Bergmann ¹², como una extensión de la teoría de Kubelka-Munk sobre las propiedades ópticas de los polvos cristalinos ¹³. Los balances de radiación se describen mediante un conjunto de ecuaciones diferenciales, en las cuales uno de los términos corresponde al coeficiente de dispersión elástica de la muestra (representado como r en el Capítulo 2).

Este coeficiente es inversamente proporcional al diámetro de las partículas, y determina tanto el flujo de la radiación de excitación como la magnitud del flujo de la radiación dispersada inelásticamente (la radiación Raman).

El efecto del tamaño de partícula en los espectros Raman puede estudiarse a nano- y microescala. En el caso de las nanopartículas, conforme disminuye el tamaño de partícula se observan cambios sutiles en el espectro del material. Estos se deben al efecto de confinamiento de los fonones y en la práctica representa información útil para la caracterización del tamaño a nanoescala ¹⁴⁻¹⁶.

Considerando los materiales medibles a microescala, el cual es el orden de magnitud de tamaño de los compuestos usados en la preparación de las formas farmacéuticas sólidas, se han publicado una serie de trabajos en los cuales el parámetro del tamaño de partícula está bajo control. Los materiales usados incluyen sales inorgánicas y compuestos orgánicos, usando instrumentos retrodispersivos y de Raman por transmisión, pero cada uno con ciertas particularidades respecto a la disposición de los componentes de excitación y recolección de la radiación, y la ubicación de la muestra que se está midiendo. La Tabla 6.1 presenta una síntesis de estos trabajos, incluyendo las principales características de los instrumentos usados, las muestras que se midieron y las principales conclusiones que se reportaron.

Son de especial interés para el presente estudio los trabajos en los que se investigó la relación entre el tamaño de las partículas de la muestra y la intensidad de la señal Raman. Las tendencias que se han reportado fueron obtenidas al irradiar polvos ligeramente apretados, usando instrumentos con diferentes diámetros de láser, que van desde los 2 μm hasta más de 4000 μm . La conclusión que más se repite es que las señales aumentan conforme disminuye el tamaño de partícula ^{17,18,20}, no obstante la tendencia no se cumple totalmente en el rango de tamaños considerado en cada estudio, notándose en algunos casos que para los tamaños más pequeños las intensidades crecen con el tamaño de partícula. Esto último es lo que se deduce a partir de las predicciones de Schrader y Bergmann, por lo que es sumamente curioso el hecho de que en diversos trabajos experimentales se reporte justamente la tendencia contraria. El trabajo de Chio y colaboradores ¹⁹ es el único en el cual se muestra una evolución acorde a lo que se predice teóricamente, al menos cuando se va de una fracción de menos de 11 μm hasta llegar a una fracción de 20-30 μm ; luego las intensidades son constantes para las fracciones que comprenden tamaños entre los 55 y 250 μm . Este trabajo tiene la particularidad de que el diámetro de irradiación es muy pequeño, y por ser un instrumento confocal es posible delimitar la profundidad de muestreo, por lo que son muy pocas las partículas irradiadas

Tabla 6.1. Resumen de los estudios previos relacionados con el efecto del tamaño de partícula sobre los espectros Raman.

Referencia	Compuesto(s) analizado(s) (tamaños de partícula)	Instrumento Raman	Diámetro de irradiación	Principales hallazgos
17	Ba(NO ₃) ₂ , NH ₄ Cl, K ₂ CrO ₄ , Li ₂ CO ₃ (105-205 μm, polvos)	Raman por retrodispersión Instrumento FT-Raman de sobremesa (láser de 1064 nm)	300 μm	Las intensidades Raman decrecen conforme aumenta el tamaño de partícula
18	NaClO ₃ , NaBrO ₃ , K ₄ Fe(CN) ₆ · 3H ₂ O, CuSO ₄ · 5H ₂ O, K ₃ Fe(CN) ₆ , NaNO ₃ (76-605 μm, polvos, el NaNO ₃ también se midió como tableta)	Raman por retrodispersión Instrumento dispersivo (láser de 514.5 nm) La irradiación y recolección se hace mediante una sonda de fibra óptica, registrando espectros a distancias definidas arbitrariamente respecto a la posición de la muestra	1 mm de distancia = 500 μm	Las intensidades Raman decrecen conforme aumenta el tamaño de partícula
			10 mm de distancia = 4600 μm	La dependencia de las intensidades Raman con el tamaño de partícula disminuye Una muestra compactada produce señales menos intensas que la misma muestra antes de compactar
19	Cuarzo alfa (< 11 μm-250 μm, polvos)	Raman por retrodispersión (Microscopio confocal, objetivo 50X) Instrumento dispersivo (láser de 488 nm)	2 μm	Las intensidades Raman crecen con el tamaño de partícula hasta una fracción de 20-30 μm, luego son constantes para las fracciones de mayor tamaño
20	Ácido flufenámico, dos polimorfos (65-215 μm, polvos)	Raman por retrodispersión Instrumento dispersivo (láser de 785 nm) Dos tipos de sonda de fibra óptica se usaron	Sonda de inmersión: 60 μm	Cada polimorfo da un resultado distinto: en uno la variación de las intensidades con el tamaño de partícula es muy pequeña, y en el otro las intensidades aumentan al disminuir el tamaño de partícula, hasta que se alcanza un máximo
			Sonda PhAT *: 3000 μm	Las intensidades Raman no cambian al variar el tamaño de partícula

Referencia	Compuesto(s) analizado(s) (tamaños de partícula)	Instrumento Raman	Diámetro de irradiación	Principales hallazgos
21	Tabletas de maleato de clorfenamina (2 % p/p) – celulosa microcristalina (MCC). MCC de tres tamaños: $d_{50} = 16.3, 61.7$ y $178.0 \mu\text{m}$	Raman por retrodispersión y transmisión Instrumento dispersivo (láser de 785 nm) Medición usando una sonda PhAT*	$3000 \mu\text{m}$	La configuración por retrodispersión es relativamente insensible a las diferencias en el tamaño de partícula del MCC, en comparación con el modo transmisión
22	Mezclas binarias de K_2CrO_4 y $\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$ (9 niveles de concentración), cada compuesto en 8 tamaños de partícula ($75\text{-}425 \mu\text{m}$, polvos, las mezclas en polvo se midieron en dos niveles de compactación)	Raman por retrodispersión (Microscopio confocal, objetivo 10X) Instrumento dispersivo (láser de 632 nm) El haz del láser estaba enfocado en un punto en el interior de la muestra con el fin de que éste iluminara la superficie completa de la muestra, la cual estaba contenida en un recipiente cilíndrico de diámetro 6.9 mm y 10.7 mm de alto	$6900 \mu\text{m}$	Mezclas con la misma proporción en masa, pero distinto tamaño de partícula, pueden producir espectros cuyas intensidades de pico son más distintas que en el caso de medir dos mezclas con una distinta fracción de masa
23	CaCO_3 ($2\text{-}121 \mu\text{m}$, polvos)	Raman por retrodispersión Instrumento dispersivo portátil (láser de 785 nm)	$100 \mu\text{m}$	Las intensidades Raman crecen con el tamaño de partícula hasta una fracción de $24 \mu\text{m}$, luego decrecen para los tamaños más grandes
24	Tabletas de ibuprofeno y manitol, 5 niveles de concentración, 3 presiones de compactación (cada compuesto en dos tamaños: ibuprofeno, $D_{50} = 71, 154 \mu\text{m}$; manitol, $D_{50} = 91, 450 \mu\text{m}$)	Raman por transmisión Instrumento dispersivo de sobremesa (láser de 785 nm)	$4300 \mu\text{m}$	Un PCA incluyendo todos los tipos de tabletas muestra que el contenido y tamaño de partícula del API, el tamaño de partícula del relleno, y en una menor medida la presión de compactación, afectan a los espectros Raman

* PhAT: Pharmaceutical Area Testing

(en algunos casos como máximo una o dos). Por otro lado, en el trabajo Wang y colaboradores ¹⁸ se hicieron mediciones Raman de partículas sólidas dispersadas en diferentes líquidos orgánicos. Con estos experimentos demostraron que la reflectancia difusa es un mecanismo importante para entender el efecto del tamaño de partícula en las intensidades Raman, no obstante, sus conclusiones respecto a la evolución de las intensidades con el tamaño de partícula son contradictorias al comportamiento esperado teóricamente.

Recientemente Kristova y colaboradores ²³ reportaron el efecto del tamaño de partícula en las vibraciones fundamentales del CO_3^{2-} en la calcita, un mineral cuyos modos de vibración han sido estudiados extensamente ²⁵. Ellos también encontraron el cambio en la tendencia mencionado anteriormente, con las intensidades Raman aumentando con el tamaño de partícula hasta los 20 μm , pero que luego disminuyen para las fracciones más grandes. Algo muy interesante de este estudio es que encontraron que la tasa de aumento o disminución de las intensidades en función del tamaño no es constante a lo largo de todo el espectro, sino que depende del número de onda cuya intensidad se esté midiendo.

Es destacable entonces que en los trabajos experimentales publicados hay considerables diferencias en las conclusiones que se reportan. Como se puede apreciar en la Tabla 6.1, hay además un solapamiento importante en los tamaños de partícula medidos entre los distintos trabajos.

El tamaño de partícula no es una propiedad arbitraria de las formas farmacéuticas sólidas. Se trata de un atributo importante que puede determinar características del producto terminado tales como la velocidad de disolución, la tasa de liberación del ingrediente activo, y la uniformidad de contenido de las unidades de dosificación ^{26,27}. Las tabletas son la forma de dosificación oral más popular ²⁸, y por otro lado en diversos trabajos se ha demostrado que la espectroscopía Raman es una herramienta muy útil para la determinación cuantitativa del API ²⁹. Para un análisis de este tipo deben prepararse muestras de calibración, por lo que es necesario entender el efecto del tamaño de partícula no sólo en las intensidades Raman, sino también en la precisión del análisis.

Por otro lado, los espectros Raman sin pretratar muy raramente se usan. En la actualidad es ampliamente sabido que, con el fin de obtener una precisión adecuada en el análisis cuantitativo, los espectros deben pretratarse antes de aplicar cualquier modelo de regresión. En este sentido el protocolo estándar incluye una corrección de línea base y una normalización ³⁰. El desempeño de estos pretratamientos para la corrección del efecto del tamaño de partícula también debe evaluarse.

Con el fin de entender de una mejor manera el efecto del tamaño de partícula sobre las intensidades Raman y su reproducibilidad cuando las muestras bajo estudio son tabletas, varios comprimidos de ftalato ácido de potasio (KHP) fueron preparados, mediante la molturación y tamizado de KHP cristalino. La fracción de menor tamaño incluye partículas de menos de 20 μm , mientras que la de mayor tamaño incluye partículas superiores a los 100 μm . El KHP fue seleccionado por tratarse de un patrón primario, lo que asegura su estabilidad química en las condiciones del laboratorio ³¹. La estructura del compuesto también imita a un API normal debido al anillo aromático del ftalato, este grupo funcional produce señales Raman intensas en los espectros adquiridos, y comúnmente representa la señal analítica más selectiva en la determinación de muchos APIs. Se comparan los resultados obtenidos tanto en los espectros crudos como en los pretratados.

Las tabletas se registraron bajo dos modos de adquisición: varios espectros sucesivos medidos en el mismo punto de irradiación (mediciones de repetitividad), y haciendo mediciones por mapeo, irradiando diferentes ubicaciones de las tabletas siguiendo un patrón predefinido. La estimación del valor de repetitividad está relacionada con la mejor precisión que se puede lograr usando un instrumento específico. Por otro lado, el mapeo es una solución práctica en los métodos analíticos que usan técnicas espectroscópicas, para contrarrestar el problema del submuestreo derivado de la limitación que viene dada por el diámetro del láser ³².

Lo particular del presente estudio es que la técnica del mapeo se aplicó a un material de composición homogénea, por lo que el riesgo de cometer errores por submuestreo es prácticamente nulo ³³. Por tanto, el grado en que este procedimiento de registro impacta en la precisión al no haber teóricamente problemas de submuestreo*, es una manera de determinar el efecto de las diferencias en el tamaño de partícula y su distribución para un área de irradiación específica.

6.2 Presentación del instrumento no dispersivo usado en esta tesis

Los espectros de este trabajo fueron registrados usando dos instrumentos FT-Raman por retrodispersión (Figuras 6.1 a y b), en los cuales la muestra se coloca en una platina para mediciones por mapeo controlada en los ejes x-y-z mediante el ordenador (Figura 6.1 c), y

* Dentro del muestreo práctico el término homogéneo debe descartarse, incluso en el caso presentado en este estudio ya que las partículas difieren en su forma, y además, en cada fracción hay un rango de tamaños de partícula. En la mayoría de las situaciones de muestreo, los materiales a analizar están constituidos por partículas de diferente composición, tamaño, forma y densidad.

que luego es iluminada mediante un láser de 500 μm de diámetro incorporado en un espejo parabólico recubierto de oro (Figura 6.1d, el cual sirve para ingresar al instrumento la mayor cantidad posible de la radiación dispersada en todas las direcciones por la muestra), o con un objetivo 10 X que proporciona un diámetro de irradiación de 50 μm . Los dos instrumentos usan el mismo láser Nd:YAG como fuente de excitación ($\lambda = 1064$ nm). Para los efectos de este trabajo los instrumentos se distinguirán como macro-Raman y microscopio Raman, según el diámetro de irradiación sea 500 μm o 50 μm respectivamente. Ambos instrumentos incluyen una cámara de video cuyo chip CCD también es sensible a la luz del láser, de manera que el área circular iluminada por el láser sobre la muestra es visible en la imagen de video, y permite definir con precisión el punto sobre el cual se quiere registrar el espectro. La cámara de video también permite guardar imágenes de los puntos irradiados en la muestra, y de hecho en este trabajo el microscopio con el objetivo 10 X se usó para confirmar el tamaño de las fracciones obtenidas luego del tamizado.

6.3 *Materiales y métodos*

6.3.1 Preparación de las tabletas

El ftalato ácido de potasio (Fluka, Suiza) fue inicialmente secado a 105 °C, y luego molturado a mano. Seguidamente se obtuvieron 6 fracciones con distinto tamaño de partícula mediante tamizado en seco usando un tamizador mecánico de laboratorio modelo RP.15 (CISA, Barcelona, España). La apertura nominal de los tamices disponibles (CISA, Barcelona, España) era de 20 μm , 25 μm , 50 μm , 75 μm y 100 μm (las fracciones serán representadas en las figuras como: <20 μm = 10 μm , 20-25 μm = 22.5 μm , 25-50 μm = 37.5 μm , 50-75 μm = 62.5 μm , 75-100 μm = 87.5 μm , > 100 μm = 150 μm). Con el polvo de cada fracción se preparó un disco compactado usando una prensa hidráulica para tabletas Perkin Elmer 15.001 (Waltham, MA, EUA): se pesaron 300 mg de cada fracción para la preparación de cada tableta, y los discos obtenidos tenían un diámetro de 13.4 mm y un grosor de 1.5 mm para todas las fracciones excepto para la fracción de > 100 μm , cuyo grosor era de 1.6 mm. La presión de compactación fue de 140 MPa para todas las tabletas.

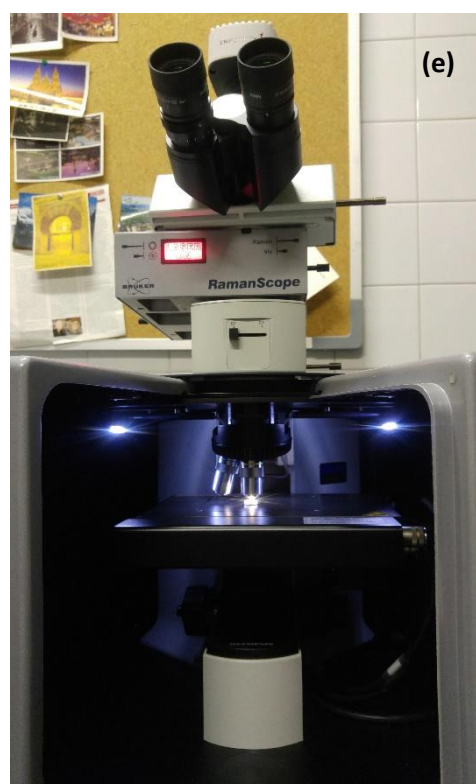
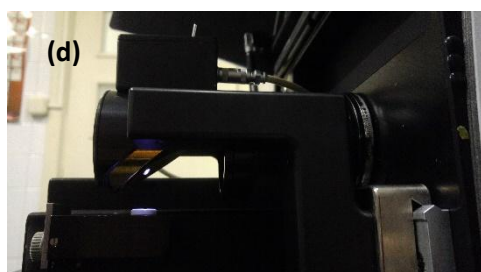
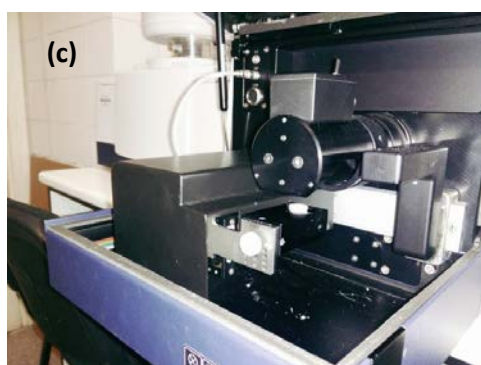
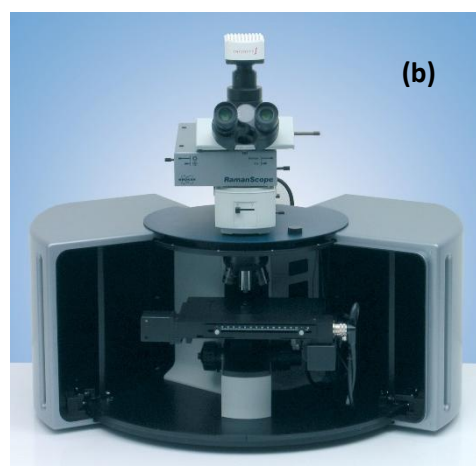
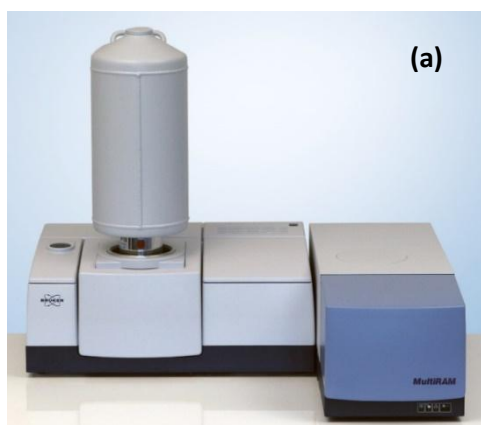


Figura 6.1 Instrumentos FT-Raman usados en la tesis. a) Equipo MultiRAM, el cual incorpora un láser de 500 μm de diámetro. El reservorio a la izquierda es el depósito de nitrógeno líquido que enfría un detector de Ge, el cual es compartido por ambos instrumentos. b) Microscopio RamanScope III. Usando el objetivo 10 X el diámetro de irradiación son 50 μm . c) Compartimento de muestras del equipo MultiRAM. La superficie donde se coloca la muestra puede desplazarse mediante indicación desde el ordenador. d) Detalle del módulo de irradiación del equipo MultiRAM, donde se aprecia el espejo parabólico, y en él una incrustación donde está la cámara de video y el láser de excitación. e) Compartimento de muestras del equipo RamanScope III. La platina donde se coloca la muestra también puede moverse mediante el ordenador. Ambos equipos son marca Bruker.

6.3.2 Adquisición de los espectros

Se tomaron 10 espectros para las mediciones de repetitividad y 10 espectros para las mediciones por mapeo en cada tableta. Una de las fracciones también se midió antes de la compactación. Cada espectro fue adquirido en el rango espectral de 3600 a 50 cm^{-1} , con una resolución de 1 cm^{-1} y luego de promediar 32 barridos. La potencia de láser fue de 400 mW (previamente se confirmó que esta potencia no tenía ningún efecto en la estabilidad del KHP). Este conjunto de parámetros se usó para las mediciones en ambos instrumentos. Para las mediciones por mapeo se configuró un arreglo fijo de 10 puntos en cada tableta; luego en el caso específico del equipo MultiRAM con el fin de evitar el desplazamiento de la tableta durante el mapeo, cada una se fijó a un disco de aluminio que estaba incrustado en la platina de muestras. La configuración de los parámetros de medición, la realización de las medidas y la extracción de los espectros se hizo usando el programa OPUS de Bruker (versión 7.2).

6.3.3 Pretratamientos espectrales

Se aplicaron dos correcciones de línea base (abreviadas BLC en este trabajo) con el fin de corregir el offset espectral y la pendiente de los espectros, y una normalización a vector unidad (abreviado UNorm) para estudiar el efecto de estos pretratamientos en las intensidades y la reproducibilidad de los picos, en comparación a los espectros sin pretratar. Los hallazgos experimentales relacionados con las intensidades Raman se discuten para tres números de onda (la asignación de las bandas se hizo según la referencia ³⁴): 1675 cm^{-1} (estiramiento C=O), 1601 cm^{-1} (estiramiento CC_t) y 1039 cm^{-1} (flexión en el plano CH).

6.4 Resultados y discusión

6.4.1 Efecto de la compactación de un material en polvo en las intensidades Raman

Dado que la mayoría de estudios previos se han realizado con polvos sin compactar, inicialmente se registró un conjunto de espectros en una de las fracciones antes de obtener la tableta: el polvo fue suavemente aplanado usando una espátula sobre la platina de muestras del instrumento, tomando la cantidad de polvo apropiada para obtener el mismo espesor que en las muestras compactadas, y se procedió al registro de 10 espectros por mapeo con el macro-Raman.

El espectro promedio de las 10 mediciones registradas con el polvo ligeramente compactado y la tableta firme (todos adquiridos por mapeo) para la fracción de 20-25 μm se superponen en la Figura 6.2, antes y después de aplicar el pretratamiento espectral. Como se puede ver en los espectros crudos, la medición de una muestra compactada produce un espectro significativamente más intenso (Figura 6.2a). En esta primera comparación la única variable experimental es el nivel de compactación, dado que en ambos casos los materiales dispersores tienen el mismo tamaño de partícula.

A pesar de que en la introducción de este capítulo se dijo que este tipo de material, el cual tiene una composición homogénea, está bastante exento de posibles problemas debidos al submuestreo, las mediciones con y sin compactar muestran que hay algo relacionado al

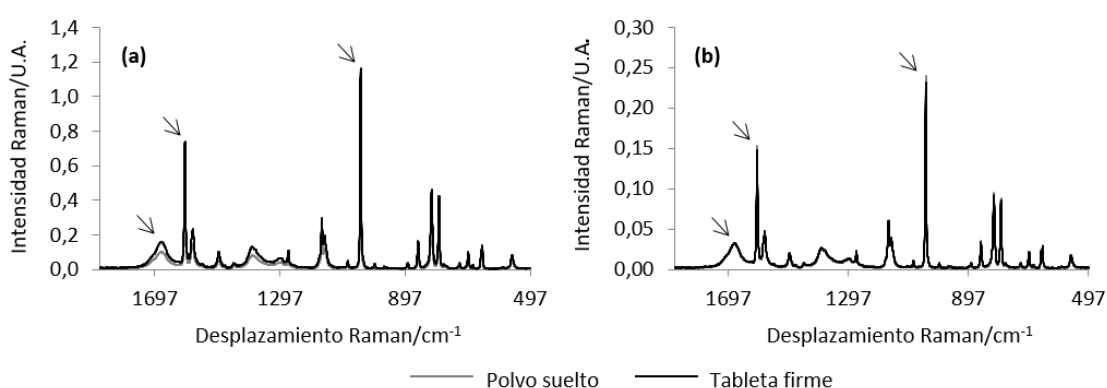


Figura 6.2 Espectros superpuestos obtenidos con la fracción de 20-25 μm antes y después de compactar: (a) espectros crudos (b) espectros luego de las correcciones de línea base y la normalización a vector unidad. Las flechas señalan los números de onda seleccionados para las mediciones de intensidad.

FSE (Capítulo 1) que no es exactamente igual en los dos materiales. Esto tiene que ver con una distinta magnitud en el desorden de los fragmentos que constituyen el material irradiado. En el caso de la tableta los fragmentos son obligados a desplazarse para completar espacios vacíos, hasta el punto de formar un material firme, mientras que en el polvo suavemente aplanado los fragmentos tienen una disposición más libre. Por tanto, en la tableta al disminuir el espacio entre las partículas aumenta la densidad aparente, y al momento de la irradiación hay más moléculas involucradas y la señal es mayor. Hay una cantidad distinta de partículas muestreadas en cada caso.

En esta comparación inicial que parece sencilla, y en las demás comparaciones que se presentan como parte de este estudio y el del capítulo siguiente, la aplicación de una combinación de pretratamientos espectrales a los datos (BLC + UNorm) representa completamente el acto de poner la quimiometría al servicio de las distintas

comparaciones. En el Capítulo 4 se dijo que la quimiometría no elimina errores de muestreo, pero como se aprecia en la Figura 6.2b luego de pretratar los datos ya no es posible diferenciar los espectros según el nivel de compactación del material del que provienen. No hay un error de muestreo en ninguno de los casos, lo que sí hay es una distinta cantidad de material muestreado debido a la densidad de cada material; pero sucede que por tratarse de materiales homogéneos, la normalización a vector unidad hace que las intensidades en los espectros pretratados sean las mismas, aunque en cada caso participe un número distinto de partículas.

Por otro lado, hay estudios sobre el efecto de la presión en los espectros infrarrojo de reflectancia difusa adquiridos en materiales en polvo, en los que se ha encontrado que el coeficiente de dispersión disminuye con la presión aplicada, y la magnitud del cambio depende de la naturaleza del material ³⁵. Por tanto, los espectros obtenidos del material sin compactar son menos intensos como resultado de dos fenómenos: una menor cantidad de material muestreado, y una distinta dispersión física respecto a la tableta firme.

La quimiometría no corrige errores de muestreo, pero sí es capaz de corregir las diferencias de dispersión (*scattering*) que se reflejan en los espectros adquiridos de materiales con una composición similar. Es una práctica común aplicar una normalización al conjunto de espectros correspondientes al set de calibración para un análisis cuantitativo, con el fin de eliminar las diferencias en los espectros debidas a la dispersión física particular de cada muestra ^{36,37}. Evidentemente esto también se puede aplicar a un conjunto de espectros provenientes de un material de composición homogénea. Por tanto, como se dijo anteriormente el polvo suavemente aplanado produce un espectro menos intenso debido a una mayor dispersión física de la radiación en comparación a la irradiación del polvo compactado. Luego el paso de normalización efectivamente corrige las diferencias de dispersión de cada muestra. En los trabajos de Wang y colaboradores ¹⁸, y Chen y colaboradores ²², se presenta también la comparación compactado/sin compactar. A los primeros les da que una muestra sin compactar produce un espectro más intenso que una tableta firme, y mencionan que este resultado es contraintuitivo pero consistente con los otros resultados encontrados usando su sistema óptico, el cual está constituido fibras ópticas paralelas. Chen y colaboradores por su parte encuentran el mismo resultado que en nuestras mediciones con KHP (en este caso se usa un microscopio confocal, que se enfoca en el interior de la muestra con el fin de iluminar una superficie amplia de esta). Lo que está claro es que las ópticas de los instrumentos determinan los hallazgos experimentales, y es algo que debe tomarse en cuenta cuando se interpretan los

resultados de estudios publicados. Esto es evidente al analizar la información contenida en la Tabla 6.1.

La Tabla 6.2 presenta los valores de intensidad para los números de onda seleccionados, y las correspondientes desviaciones estándar para las 10 posiciones muestreadas. Los valores de desviación estándar absolutos para las mediciones en la muestra compactada y sin compactar son los mismos (las varianzas son homogéneas según una prueba F). No obstante, y debido a las distintas intensidades de señal, el porcentaje de desviación estándar relativo (RSD % por sus siglas en inglés) de las mediciones realizadas en la tableta (2.5-3 %), es casi la mitad del RSD % obtenido para la muestra en polvo (5 %) cuando se comparan los espectros crudos. Luego del pretratamiento espectral, el RSD % es prácticamente el mismo para las muestras compactadas y en polvo, y se reduce por un factor de 4-5, resultando valores de RSD % en el rango de 0.3-1.6 %.

Tabla 6.2 Efecto de la compactación en las intensidades Raman para la fracción de 20-25 μm medida por mapeo ($n=10$) en el macro-Raman. Intensidad y desviación estándar, entre paréntesis (U.A.) y RSD %, antes y después del pretratamiento espectral

Número de onda / cm^{-1}	Datos crudos		BLC + UNorm	
	Polvo suelto	Tableta	Polvo suelto	Tableta
1675	0.102 (0.005) 4.9 %	0.163 (0.005) 3.1 %	0.0320 (0.0005) 1.6 %	0.0322 (0.0003) 0.9 %
1601	0.487 (0.022) 4.5 %	0.776 (0.020) 2.6 %	0.1532 (0.0005) 0.3 %	0.1529 (0.0008) 0.5 %
1039	0.764 (0.037) 4.8 %	1.220 (0.032) 2.6 %	0.2402 (0.0015) 0.6 %	0.2406 (0.0015) 0.6 %

6.4.2 Evolución de las intensidades Raman con el tamaño de partícula en muestras compactadas

Los espectros promedios para cada tamaño de partícula, registrados irradiando siempre el mismo punto (mediciones de repetitividad) antes y después de los pretratamientos espectrales se muestran en la Figura 6.3. Se observa claramente que las intensidades Raman en los espectros crudos aumentan con el tamaño de partícula, al menos para las

fracciones de menor tamaño. Luego el pretratamiento espectral aparentemente elimina el

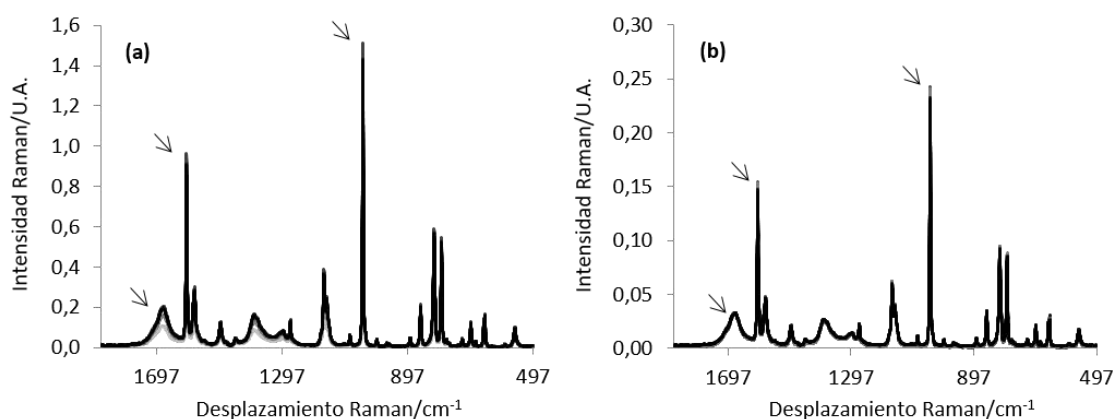


Figura 6.3 Espectros superpuestos de los comprimidos formados con 6 fracciones de KHP de distinto tamaño de partícula (espectros registrados en modo repetitividad en el macro-Raman). (a) Espectros crudos, los espectros menos intensos (tonos grises) corresponden a las fracciones de menor tamaño de partícula. (b) Espectros luego de los pretratamientos espectrales. Las flechas señalan los números de onda seleccionados para las mediciones de intensidad.

efecto, con los espectros prácticamente superpuestos.

En las siguientes secciones la evolución de las intensidades Raman será explicada para el macro-Raman y el microscopio Raman, tomando en cuenta la forma en que se registraron los espectros: los resultados de las mediciones en la misma posición serán explicados primero, y seguidamente los resultados para las adquisiciones por mapeo, donde se introduce otra fuente de variación al ser distinta la posición en que se midió cada espectro.

6.4.2.1 Resultados de las mediciones de repetitividad

La tendencia encontrada con ambos instrumentos es muy similar (Figura 6.4): se observa un claro incremento en la intensidad de la señal con el tamaño de partícula en los espectros crudos para las 3 fracciones de menor tamaño, hasta un valor de aproximadamente 40 μm , luego los valores de intensidad se estabilizan para las fracciones más grandes (Figuras 6.4a y 6.4c). La evolución de las intensidades Raman para las fracciones más pequeñas está acorde a lo que se esperaría para un sistema controlado por la reflectancia difusa: las intensidades Raman crecen al aumentar el tamaño de las partículas. La repetitividad de las mediciones es muy buena, con valores de RSD % (n=10) en el rango de 0.2-1 %, y 1-5 %, para el macro-Raman y el microscopio Raman respectivamente, lo que lleva a unas barras de error que son difícilmente observables en la

escala de la figura. Luego de los pretratamientos espectrales (Figuras 6.4b y 6.4d) el efecto del tamaño de partícula en las intensidades de pico se ve considerablemente reducido, sin embargo un análisis de varianza (ANOVA, $\alpha=0.05$) muestra que para las bandas de 1039 cm^{-1} y 1601 cm^{-1} aún hay diferencias significativas entre las fracciones. Estas diferencias se deben a los menores valores de intensidad que se obtienen con las fracciones de menor tamaño de partícula

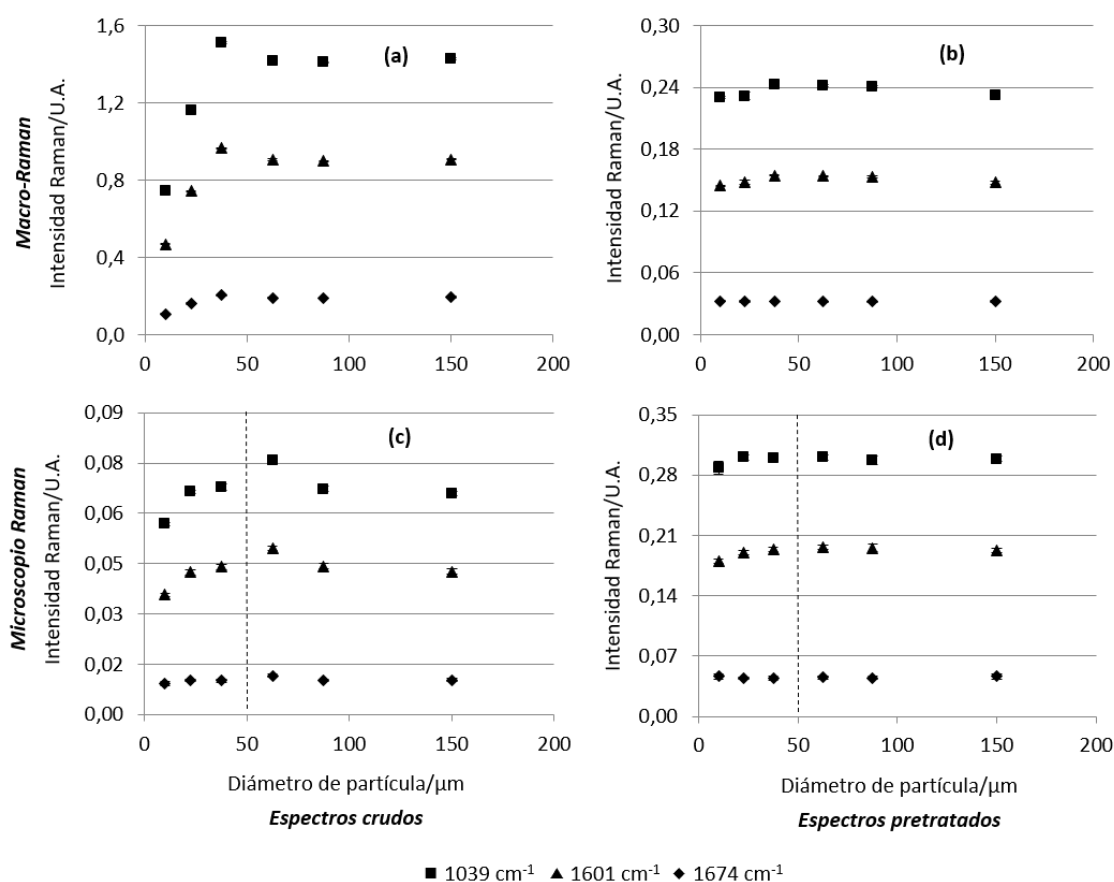


Figura 6.4 Promedio y desviación estándar de tres intensidades Raman para las mediciones de repetitividad (n=10 espectros), registradas en tabletas de KHP con distinto tamaño de partícula. (a) macro-Raman, espectros crudos. (b) macro-Raman, espectros pretratados. (c) Microscopio Raman, espectros crudos. (d) Microscopio Raman, espectros pretratados. En (c) y (d) la línea vertical discontinua representa el diámetro del láser.

6.4.2.2 Diferencias en la magnitud de las intensidades registradas en el microscopio Raman y en el macro-Raman

Al comparar las magnitudes de los ejes 'y' en las Figuras 6.4a y 6.4c, se observa que las intensidades registradas en el macro-Raman son mucho mayores. Una respuesta bastante rápida para justificar esto sería que al disponerse de un haz de irradiación más grande, hay más partículas involucradas en la generación de la radiación Raman y por tanto las intensidades son más altas. Sin embargo en el Capítulo 2, cuando se empezaba a discutir el origen de la señal Raman, se presentó una ecuación que explica la radiancia de una muestra que dispersa inelásticamente (ecuación 2.1). En esta hay un término $\Phi_0/\pi r^2$, que en términos prácticos se define como la densidad de potencia. La potencia de láser (Φ_0), fue la misma para todas las mediciones realizadas en los dos instrumentos, pero el área irradiada es 100 veces menor en el microscopio. Por tanto la densidad de potencia del láser sobre la tableta, al irradiar con el microscopio era mucho mayor, y esto teóricamente debería producir una mayor radiancia (más fotones dispersados luego del paso de irradiación).

Sin embargo las intensidades Raman registradas al irradiar con el microscopio son mucho menores. No debe olvidarse que ambos instrumentos comparten el mismo detector. Por tanto, la diferencia está en la óptica de recolección que incorpora cada instrumento. En el macro-Raman se dispone de un amplio espejo parabólico que es capaz de ingresar al espectrómetro los fotones que se han dispersado en muchas direcciones, mientras que en el microscopio la recolección se realiza dentro del mismo cañón del objetivo usado para la visualización e irradiación de la muestra. En este sentido el sistema de recolección del microscopio dista mucho del ser más eficiente para un FT-Raman, donde como se dijo en la introducción, son los instrumentos Raman más afectados por el término de la cuarta potencia de la frecuencia de excitación (ecuaciones 2.1 y 3.1).

6.4.2.3 Evolución de las intensidades Raman en función del espesor de la tableta de KHP

La fracción con partículas de 20 a 25 μm se usó además para preparar otro conjunto de tabletas usando distintas cantidades de polvo de partida, compactando masas distribuidas en el intervalo de 100 hasta 500 mg de KHP, y aplicando siempre una presión de compactación de 140 MPa. Se midió el grosor de las tabletas y se procedió al registro de los espectros en el equipo MultiRAM. Se irradiaron dos posiciones en cada tableta, en cada posición registrando 3 espectros sucesivos. Cronológicamente estas mediciones se hicieron posterior al estudio sobre la evolución de las intensidades Raman con el tamaño

de partícula, por lo que los parámetros de adquisición no son los mismos que se habían detallado en la sección 6.3.2: estos espectros se registraron a una resolución de 16 cm^{-1} y realizando 128 barridos. Adicionalmente en estas mediciones se quiso estudiar el efecto de la potencia del láser, y se registraron los espectros a 500 y 900 mW. El efecto de pasar de 1 a 16 cm^{-1} , y de 32 a 128 barridos se explicará en detalle en el estudio del Capítulo siguiente; por ahora se puede decir que son dos modificaciones que llevan a una mejor relación *SNR* en los espectros ³⁸. En lo que se refiere propiamente a la altura de pico medida, ésta no varía por el número de barridos, pero sí que cambia al variar la resolución seleccionada, y de hecho las intensidades que se registran son más bajas cuando se selecciona una menor resolución. El asunto de la resolución en los espectros adquiridos con un FT-Raman es complejo ³⁸, y es un tema exclusivo de estos instrumentos dado que en los Raman dispersivos la resolución de los espectros no se puede escoger. Por otro lado, el nivel de utilidad de los espectros adquiridos en un mismo conjunto de muestras, pero registrados a distinta resolución en un mismo conjunto de muestras, pero registrados a distinta resolución también es un asunto complejo, y las afirmaciones que se hagan al respecto en distintos estudios sólo se pueden aplicar a cada caso específico, dado que al final lo relevante es ser capaz de extraer la información de interés de los espectros adquiridos (contenido de API de unas tabletas por ejemplo), y no su apariencia a nivel superficial ²⁹.

La Figura 6.5 muestra la evolución de las intensidades Raman para la banda de 1600 cm^{-1} en función del grosor de la tableta de KHP (preparadas todas con partículas de 20 a 25 μm). En este conjunto de tabletas todas tienen la misma composición homogénea y las mismas propiedades de dispersión (que ahora se puede decir que es la suma del aporte del tamaño de partícula, más el nivel de compactación). Las intensidades crecen hasta llegar a un grosor de 1.3 mm, de aquí hasta el grosor máximo medido (2.8 mm) éstas se mantienen constantes, y se observa el mismo comportamiento para las dos potencias de láser. Lo que sí cambia al aumentar la potencia de irradiación son los valores de intensidad, como es de esperar según la ecuación 2.1. Estos 1.3 mm se aproximan al 1 mm que reportan Matousek y Parker ³⁹ en sus predicciones teóricas sobre el origen de la señal Raman en modo retrodispersión, valor que obtienen con un modelo en el que asumen tamaños de partícula entre los 10 y 20 μm . Wang y colaboradores ¹⁸ hicieron un experimento similar con NaNO_3 y encontraron que las intensidades seguían creciendo hasta un espesor de 15 mm.; respecto a este hallazgo Matousek y Parker ³⁹ dan como una posible explicación el que todo el material que se va añadiendo reduce la pérdida de radiación en la interfaz muestra-aire en el lado opuesto de la irradiación. En nuestro caso

encontramos un grosor donde las intensidades dejan de crecer, muy próximo a lo que se predice teóricamente para el origen de la señal Raman retrodispersada.

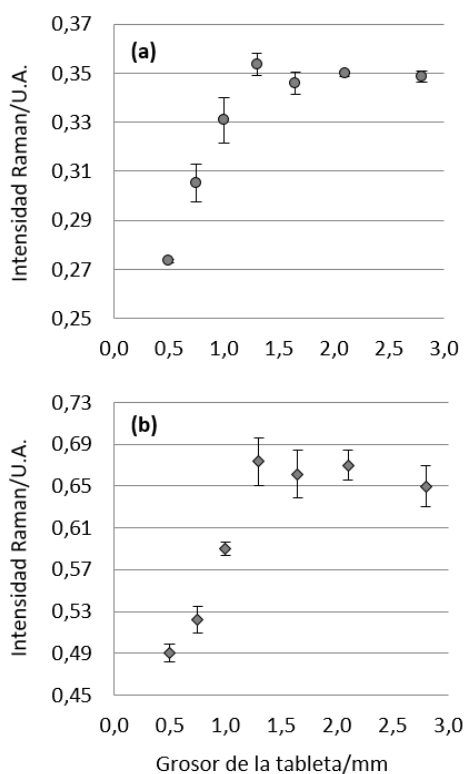


Figura 6.5 Promedio y desviación estándar (n=6) de la intensidad Raman a 1601 cm^{-1} , en función del espesor del comprimido de KHP con partículas entre 20 y $25\text{ }\mu\text{m}$. Espectros registrados en el macro-Raman

6.4.2.4 Resultados de las mediciones por mapeo

La Figura 6.6 muestra las alturas de pico promedio y sus desviaciones estándar versus el tamaño de partícula cuando los espectros se registran por mapeo mediante un patrón de 10 puntos. Se observa la misma tendencia discutida anteriormente: hay un incremento en las intensidades desde la fracción $<20\text{ }\mu\text{m}$ hasta aproximadamente $40\text{ }\mu\text{m}$.

En estas mediciones es interesante observar la dispersión de los valores de intensidad para los espectros sin pretratar: la magnitud de la desviación estándar aumenta para las fracciones más grandes. Dado que el objeto que se está midiendo es una muestra homogénea, esto no se puede atribuir al problema del submuestreo en la espectroscopía Raman, y debe interpretarse en términos de las diferencias en la dispersión física de las partículas que conforman cada fracción. En el caso del macro-Raman (Figura 6.6a), al

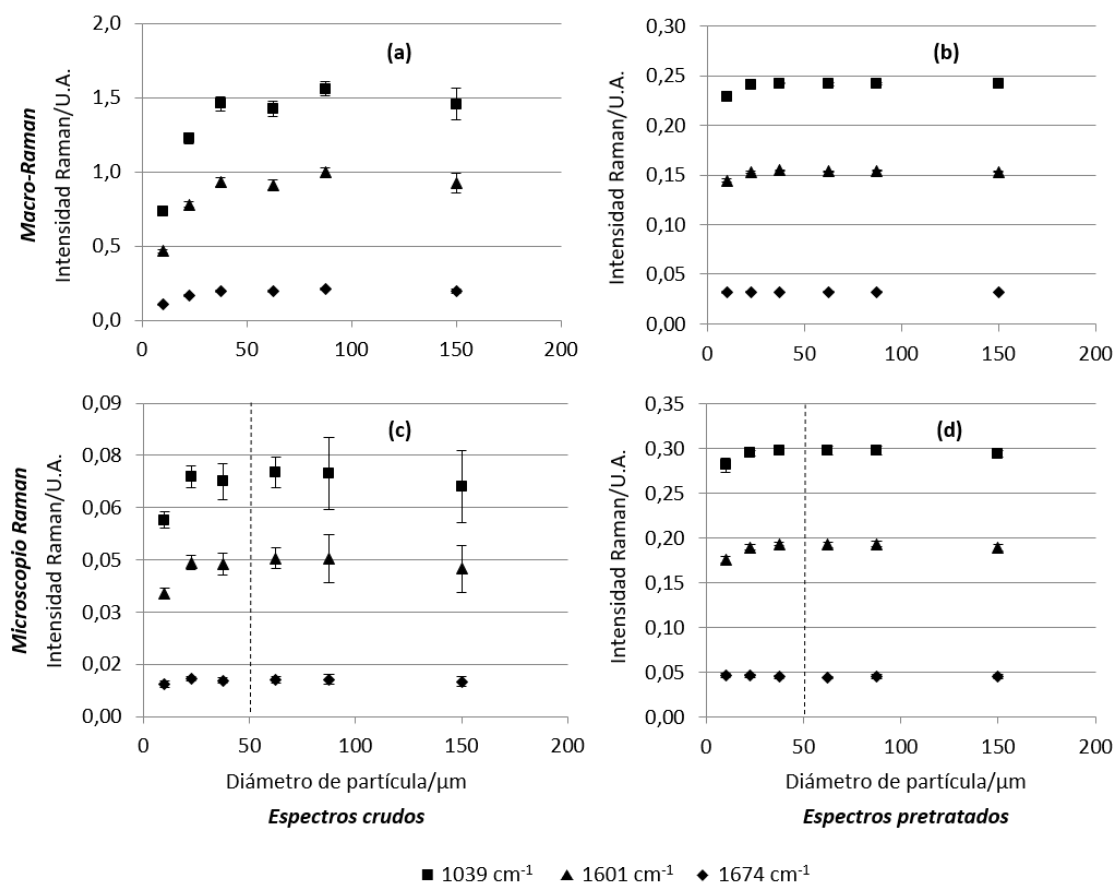


Figura 6.6 Promedio y desviación estándar de tres intensidades Raman para las mediciones de mapeo ($n=10$ espectros), registradas en tabletas de KHP con distinto tamaño de partícula. (a) macro-Raman, espectros crudos. (b) macro-Raman, espectros pretratados. (c) Microscopio Raman, espectros crudos. (d) Microscopio Raman, espectros pretratados. En (c) y (d) la línea vertical representa el diámetro del láser.

aumentar el tamaño de las partículas de cada fracción el impacto de la disposición individual de las partículas se hace más significativo en comparación a los tamaños más pequeños, donde las diferencias entre el diámetro del láser y el tamaño de las partículas es mayor. Wang y colaboradores¹⁸ reportaron la misma observación para su sistema Raman.

La mayor incidencia cuando se usa el microscopio (Figura 6.6c) puede atribuirse a la menor área irradiada. En este caso, el efecto de la dispersión física aumenta debido al menor número de partículas que están siendo muestreadas. Al hablar de número de partículas ya no solo se debe tomar en cuenta el área del láser, sino también la profundidad de muestreo. Para la misma muestra irradiada mediante distintos láseres, al disminuir el diámetro de irradiación la profundidad de muestreo es menor¹⁹, y entonces hay una disminución en el número de partículas que son irradiadas. Considerando la dispersión de los datos en los espectros crudos, se observa un incremento progresivo en la

amplitud de las barras de error a lo largo del intervalo completo de tamaños de partículas. En estas mediciones hay partículas cuyos diámetros están por debajo y por encima del haz de iluminación, y entonces parece que para un diámetro de irradiación de 50 μm , si el tamaño de las partículas excede este valor, el arreglo específico de las partículas individuales va a determinar significativamente la intensidad del espectro registrada en cada una de las posiciones de muestreo.

En las mediciones con el microscopio Raman, considerando las fracciones con tamaños de partícula más grandes, intuitivamente podría pensarse que en alguna medición sólo haya una única partícula bajo irradiación durante el registro del espectro. No se hicieron mediciones de evolución de intensidad Raman con el grosor de la tableta en el microscopio dada la dificultad de preparar un gradiente lo suficientemente diferenciado de grosores de tableta, sin embargo Chio y colaboradores ¹⁹ reportaron que una disminución en el diámetro del láser por un factor de 5, reduce 3.6 veces la profundidad de muestreo. En nuestro caso hay un factor de 10 en la disminución del diámetro de láser, por lo que al reducirse 7.2 veces la profundidad de muestreo, el punto de inflexión en la evolución de las intensidades en función del grosor de una tableta de KHP (fracción 20-25 μm) podría ocurrir cerca de los 0.2 mm de profundidad.

El trabajo de Chio y colaboradores incluye una serie de experimentos, los cuales no siempre se hicieron con el mismo arreglo instrumental, sino que dependiendo de lo que se quisiera determinar modificaban el microscopio Raman utilizado. Las mediciones para la evolución de las intensidades Raman en función del tamaño de partícula se hicieron en modo confocal, con un láser de 2 μm de diámetro, por lo que todas las fracciones que midieron estaban constituidas por partículas de diámetro superior al de irradiación, y al ser confocal, la profundidad de muestreo se configuró para que fuese sumamente baja (25 μm). Se hace nuevamente mención de este trabajo ya que como se observa en la Tabla 6.1, es el único estudio en el cual se ha reportado que las intensidades crecen en función del tamaño de partícula, pero además que luego de cierto tamaño estas dejan de crecer, lo cual es una tendencia muy similar a lo mostrado en las Figuras 6.4 y 6.6. En este trabajo incluyen un modelo en el cual representan la irradiación de partículas individuales del material seleccionado (cuarzo alfa), considerando que hay sólo 2 μm de diámetro de irradiación, 25 μm de profundidad de muestreo, y además, que la radiación del láser se distribuiría dentro de los materiales como un cono sólido invertido (suponen que este forma un ángulo de 36.87 ° respecto a la normal). Con este modelo observan que si las partículas tienen un diámetro de 40 μm o más, existe una probabilidad considerable de que, bajo estas condiciones, el espectro provenga de muy pocas partículas, incluso de una

sola partícula si ésta cae justo dentro del cono sólido. Y de hecho esta es la justificación que dan para la estabilización en las intensidades para las fracciones con partículas más grandes de 55 μm (en su trabajo los tamaños de las fracciones no son totalmente continuos como en el nuestro, sino que miden una fracción de 20-30 μm , y la siguiente en orden creciente de tamaño cubre un intervalo de 55-63 μm). Respecto a la evolución con las fracciones más pequeñas, dicen que este comportamiento corresponde a lo que se predice teóricamente, considerando la proporcionalidad inversa entre el coeficiente de dispersión elástica y el tamaño de partícula. Por tanto, las tendencias encontradas en el trabajo de Chio y colaboradores, y en el trabajo realizado en esta tesis son las mismas, no así el fenómeno que justifica lo observado.

Finalmente respecto al efecto del pretratamiento espectral sobre los espectros adquiridos, nuevamente se reducen las variaciones dependientes del tamaño de partícula en las intensidades Raman (no obstante, un ANOVA muestra nuevamente que aún hay diferencias significativas para las bandas de 1039 y 1601 cm^{-1}). Sin embargo, en el caso de las mediciones por mapeo también hay un efecto sobre la dispersión de los valores para cada tamaño de partícula: las diferencias previamente discutidas respecto a la magnitud de las barras de error ya no se observan entre las distintas fracciones, y en consecuencia los RSD % son prácticamente independientes del tamaño de partícula. Por ejemplo, para la señal de 1601 cm^{-1} en el macro-Raman, los valores de RSD % para los espectros crudos empiezan alrededor del 3 % y se incrementan hasta el 7 % para la fracción con partículas de mayor tamaño; luego de los pretratamientos espectrales los RSD % se reducen y están en el rango de 0.5-1 %. Debe resaltarse también que las precisiones alcanzadas en las mediciones de repetitividad y por mapeo, luego del pretratamiento espectral son muy similares (comparar las Figuras 6.4b, 6.4d, y las Figuras 6.6b y 6.6d).

6.4.3 Interpretación de las mediciones de repetitividad y por mapeo en términos de la Teoría de Muestreo

Todas las tabletas preparadas como parte de este estudio son materiales de composición homogénea. Para este tipo de materiales, de los cuales son ejemplos también los Materiales de Referencia Certificados (CRM por sus siglas en inglés), e incluso las disoluciones líquidas (donde la heterogeneidad composicional se encuentra únicamente a nivel molecular), ya la Teoría de Muestreo predice que los problemas de muestreo son prácticamente nulos³³. Esto se puede concluir para nuestras mediciones con solo observar que las gráficas de la evolución de las intensidades Raman en función del tamaño de

partícula, antes y después de normalizar, para los dos modos de adquisición son exactamente iguales: se observan las mismas tendencias ya sea que se irradian 10 posiciones de la tableta o sólo un punto, aún para estos instrumentos que tienen diámetros de irradiación considerablemente pequeños.

Si el caso bajo estudio se tratase de un muestreo tradicional extractivo de un material homogéneo, la Teoría de Muestreo dice que la precisión es proporcional a la inversa de la raíz cuadrada del número de muestras ³³. No obstante la situación de muestreo en la medición de un material homogéneo usando espectroscopía Raman es algo más compleja, porque cada muestra tomada del lote (la tableta) puede variar debido a la dispersión física específica en cada posición de muestreo, lo cual se refleja en los espectros crudos. Las Figuras 6.7a y 6.7c muestran la evolución de las desviaciones estándar (SD) para cada tamaño de partícula, antes y después de normalizar para la intensidad de 1601 cm^{-1} . Si nos quedáramos sólo con las intensidades de los espectros sin pretratar, la magnitud medida luego de muestrear distintos puntos de la tableta tendría una desviación estándar asociada mayor que si se tomaran unas pocas medidas irradiando siempre el mismo punto. Sin embargo luego de la corrección de línea base y la normalización las diferencias entre

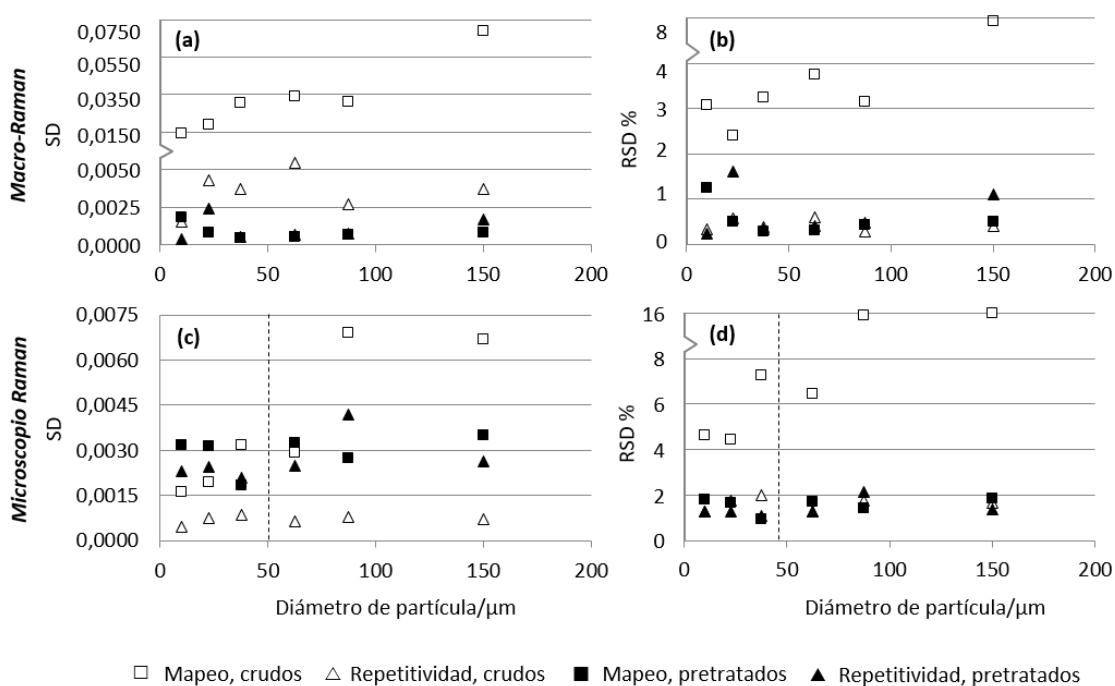


Figura 6.7 Evolución de la desviación estándar (SD) y el porcentaje de desviación estándar relativo (RSD %) de la intensidad Raman a 1601 cm^{-1} con el tamaño de partícula, para las mediciones por mapeo y de repetitividad. Macro-Raman: (a) SD absoluta, (b) RSD %. Microscopio Raman: (c) SD absoluta, (d) RSD %. En (c) y (d) la línea vertical indica el diámetro del láser.

ambos modos de adquisición desaparecen. Las pruebas F (una cola, $\alpha=0.05$) confirman que, para los espectros crudos, las varianzas de las mediciones por mapeo son significativamente mayores que las varianzas de las mediciones de repetitividad; luego de los pretratamientos espectrales las varianzas se vuelven homogéneas. En ninguna de las mediciones hay problemas de muestreo, en los espectros crudos las varianzas de mapeo son significativamente mayores que las de repetitividad pero esto se debe a las diferencias en la dispersión física de las partículas, las cuales se corrigen luego con la normalización.

Un aspecto adicional que se puede mencionar es que la amplitud de los rangos de tamaños en cada una de las 6 fracciones no es igual. Las dos fracciones con partículas más finas incluyen los rangos de tamaño más estrechos, mientras que en el otro extremo hay una tableta que incluye partículas con cualquier tamaño por encima de los 100 μm . Esto se refleja en la distancia entre los símbolos sin rellenar de las Figuras 6.7a y 6.7c, y de manera especial para las mediciones con el macro-Raman. Para la fracción de 20-25 μm el $F_{\text{experimental}}$ fue de 9.4, mientras que para las otras fracciones los valores $F_{\text{experimental}}$ van de 40 hasta 270 ($F_{\text{crítico}} = 3.18$). El impacto de la dispersión física sobre los espectros adquiridos en distintas posiciones de muestreo, se nota menos si la fracción comprende un rango de tamaños más estrecho.

Dado que la normalización representa un cambio en la escala de todas las intensidades en el espectro, el cociente de la dispersión de los datos y la magnitud de la señal medida (el RSD %) es un parámetro más práctico para visualizar el efecto del pretratamiento espectral sobre la precisión (Figuras 6.7b y 6.7d). En gran manera los datos pretratados de mapeo se superponen a las mediciones de repetitividad (tanto considerando los datos crudos y pretratados), lo que significa que la normalización no representa una disminución en la dispersión de las mediciones de repetitividad. Pero además, esto demuestra que el pretratamiento espectral disminuye la dispersión de un conjunto de medidas hechas por mapeo sobre un material homogéneo al menor valor que se puede obtener usando estos instrumentos, que viene dada por la precisión instrumental obtenida al registrar varios espectros en el mismo punto (en términos de RSD %, se obtienen valores en el rango de 0.5-1 % con el macro-Raman, y entre 1-2 % con el microscopio).

6.4.4 Efecto del tamaño de partícula sobre el ruido de la línea base

La estimación de la evolución del ruido de la línea base en función del tamaño de partícula, es una forma de evaluar el rendimiento del instrumento cuando el componente del ruido en los espectros relacionado con la magnitud de la señal (σ_s en la ecuación 3.7) no se toma

en cuenta. Como se mencionó en el Capítulo 3, los FT-Raman funcionan en el límite del ruido del detector, y este es el mismo en todas las mediciones. Ahora el ruido de la señal no está en consideración y lo que se va a estudiar es como varía el background en función del tamaño de partícula.

La Figura 6.8a presenta un espectro obtenido con la fracción de 20-25 μm , en el cual se muestra el intervalo espectral completo que se registró en cada medición (y que es el intervalo más amplio que se puede registrar con los instrumentos usados en este trabajo). En las Figuras 6.8c-e se muestra la evolución de los valores de ruido de la línea base para ambos instrumentos y en ambos modos de adquisición; estos valores se calcularon como la desviación estándar de las intensidades Raman entre 2490 y 1830 cm^{-1} , intervalo en el que no se observan bandas Raman. Antes de interpretar los resultados de estas mediciones, en el espectro que se muestra en (a) lo que se quiere destacar es que estos tienen una pendiente nula, donde lo único que se observa son diversos grupos de bandas resueltas hasta la línea base. La fluorescencia es prácticamente nula, por lo que el ruido del background (σ_B en la ecuación 3.7) es sumamente bajo.

La tendencia previamente discutida de las intensidades de las bandas Raman con el tamaño de partícula, se observa nuevamente para los valores de ruido de la línea base en el caso del macro-Raman (para las mediciones de repetitividad y las de mapeo, aunque para la última fracción, una dispersión considerablemente mayor se encontró para el caso de repetitividad). En el Capítulo 3 se dijo que el background también está regido por el ruido de disparo, y entonces el número de fotones Raman que llegan al detector, tanto debido a las vibraciones activas en Raman como los que provienen del pequeño background que resulta de la irradiación de estas muestras, dependen de la dispersión física de la muestra, la cual está determinada por el tamaño de partícula del material bajo medición. Pero por otro lado, a pesar de que las bandas medidas en el microscopio Raman muestran el aumento en la señal con el tamaño de partícula que se ha explicado en secciones anteriores, los valores del ruido de la línea base medidos con este instrumento no varían entre las distintas fracciones. Los FT-Raman leen simultáneamente todos los fotones que llegan al detector de todos los desplazamientos Raman del espectro (donde en algunos desplazamientos hay bandas y en otros no). Llegarán más o menos fotones

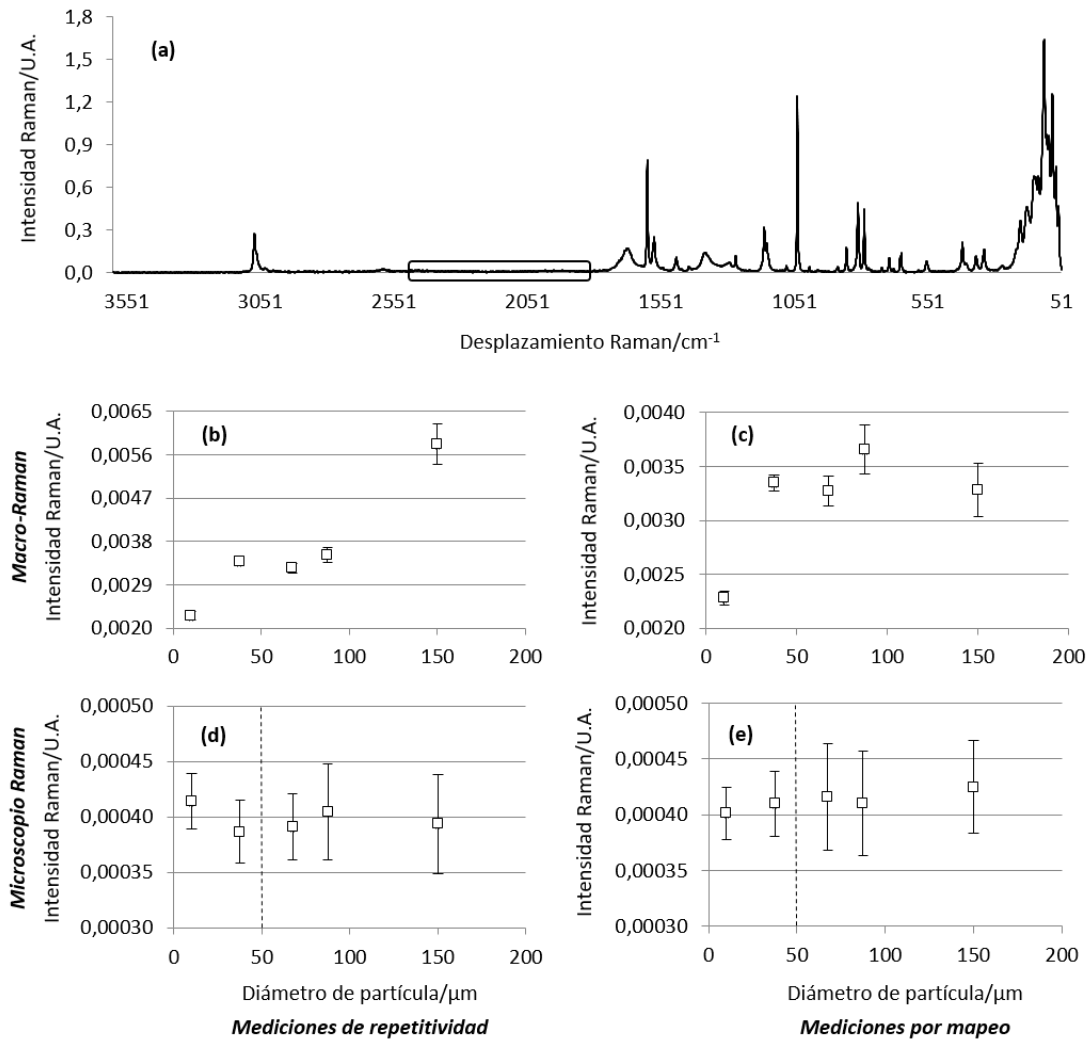


Figura 6.8 (a) Ejemplo de un espectro registrado con la fracción de 20-25 μm en el macro-Raman. Se representa el intervalo espectral completo con el que se adquirieron los espectros. El rango seleccionado para los cálculos del ruido de la línea base está encerrado en el rectángulo. (b)-(e). Promedio y desviación estándar de los valores de ruido de la línea base ($n=10$) medidos en tabletas de KHP con distinto tamaño de partícula (valores calculados con los espectros sin pretratar). (b) macro-Raman, mediciones de repetitividad. (c) macro-Raman, mediciones por mapeo. (d) Microscopio Raman, mediciones de repetitividad. (e) Microscopio Raman, mediciones por mapeo. En (d) y (e) la línea vertical representa el diámetro del láser.

dependiendo del coeficiente de dispersión elástica del material, y esto se refleja en los espectros al comparar las intensidades de las bandas que se obtienen con las distintas fracciones. Posteriormente luego de la transformada de Fourier, la magnitud de la señal para cada desplazamiento Raman es proporcional a los fotones observados para cada desplazamiento, y entonces en el intervalo seleccionado para la estimación del ruido de la línea base están siendo observados muy pocos fotones en el caso del microscopio,

indistintamente de la tableta que se esté midiendo. Es posible que las magnitudes tan bajas que se cuantifican sean producto de los electrones que se generan espontáneamente en el detector (el término ϕ_d en la ecuación 3.8), y entonces la señal que se produce (llamada señal oscura en el Capítulo 3) no depende del material que se esté midiendo.

6.4.5 Reproducibilidad de las bandas Raman de diferente nivel de intensidad

Las mediciones de repetitividad realizadas en este trabajo están sumamente relacionadas con el concepto clásico de la *SNR* que se menciona en trabajos como el de Richard L. McCreery³⁸. Se realizaron un total de 10 mediciones, y las relaciones de la desviación estándar de la intensidad de pico, respecto al valor promedio de la señal, fueron calculados para 3 bandas considerablemente intensas (los valores se han expresado en este trabajo como RSD %). Para una estimación propiamente de la *SNR*, el valor de señal va en el numerador y la desviación estándar en el denominador). Sin embargo, en el caso de la determinación cualitativa o cuantitativa de un componente en una mezcla (el API de una tableta por ejemplo) en la cual se considere la espectroscopía Raman para la medición analítica, el resultado de la irradiación de la muestra será un espectro que incluye cierto número de picos considerablemente resueltos en un rango amplio de intensidades. En secciones previas se ha puesto especial atención a la señal de 1601 cm^{-1} , una banda relativamente intensa relacionada con el anillo aromático de la molécula analizada, la cual es una característica espectral muy útil para el desarrollo de modelos orientados al control de calidad farmacéutico en la medición de algún parámetro relacionado con el API. No obstante, si la muestra es una tableta que contiene muy poco API, la intensidad del pico en esta frecuencia será significativamente menor, hasta el punto de que apenas pueda diferenciarse del ruido de la línea base. Con el fin de imitar el efecto del ruido sobre posibles señales de API en un rango amplio de intensidades, se estimó la repetitividad de los diferentes picos presentes en el espectro del KHP para una de las fracciones (75-100 μm). Un espectro de esta fracción adquirido con el macro-Raman se muestra en la Figura 6.9a, en el cual se señalan varias bandas que corresponden a distintas intensidades de pico.

La Figura 6.9b muestra los valores de SD para las bandas señaladas en la Figura 6.9a. Los valores tienden a ser constantes para todas las intensidades, aunque algunos valores están fuera de esta tendencia cuando se trata de picos de intensidad baja. El que los SD no varíen

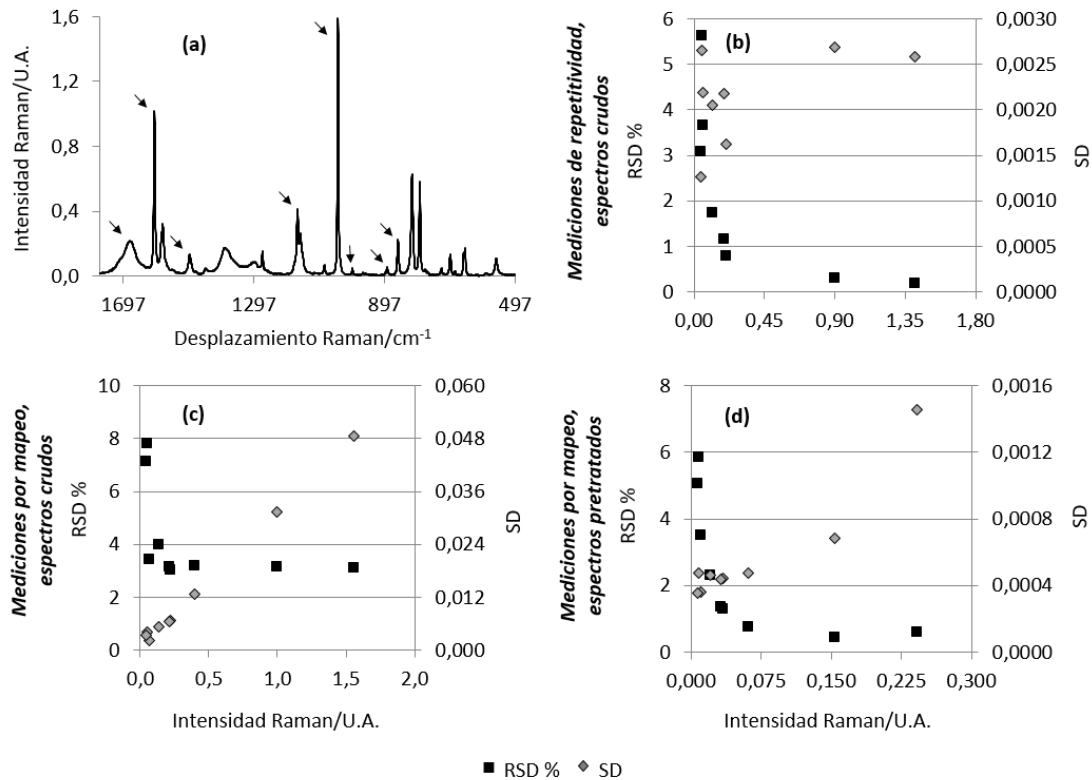


Figura 6.9 (a) Ejemplo de un espectro registrado con la fracción de 75-100 μ m en el macro-Raman. Las flechas señalan las intensidades que se grafican en los siguientes gráficos. (b)-(d) Evolución de SD y RSD % considerando las señales Raman de distinta intensidad: (b) Mediciones de repetitividad, espectros crudos. (c) Mediciones por mapeo, espectros crudos. (d) Mediciones por mapeo, espectros pretratados.

es lo que cabría esperar en un FT-Raman: cada espectro se obtiene mediante la transformación de un interferograma, en el cual efectivamente se presentan diferentes intensidades dependiendo del nivel de dispersión de las vibraciones activas en Raman; no obstante el ruido es igual a lo largo de todo el rango espectral que se está registrando. De esta forma la tendencia en los valores del ruido observada en nuestros espectros, es lo que cabría esperar para los instrumentos usados en este trabajo. Cuando se calculan los RSD % correspondientes, es evidente que los valores disminuyen al aumentar la intensidad de la banda.

Como se ha mencionado anteriormente, registrar espectros en diferentes posiciones del material en estudio es una práctica común para remediar la limitación dada por el diámetro de irradiación. Las Figuras 6.9c y 6.9d muestran la dispersión de las mediciones dependiendo de la magnitud de la intensidad medida, cuando el conjunto de espectros se registra en diferentes posiciones de la tableta. Considerando los datos sin pretratar de mapeo (Figura 6.9c), ahora hay un incremento lineal en la desviación estándar asociado a

cada intensidad; como consecuencia los valores de RSD % son casi constantes, con excepción de las intensidades más bajas en las cuales estos valores se incrementan significativamente. Luego del pretratamiento espectral (Figura 6.9d), los valores de desviación estándar tienden a ser constantes para la mayoría de intensidades (una tendencia similar a la descrita anteriormente para los valores del ruido en las mediciones de repetitividad), y los valores de RSD % decrecen proporcionalmente con la intensidad medida. Los picos más intensos presentan valores superiores de SD, sin embargo dado que se trata de picos muy intensos, los valores de RSD % que resultan son bajos. En general en todas las intensidades los valores de RSD % para los datos pretratados de mapeo son menores que los valores obtenidos para los espectros crudos, y sus magnitudes son muy similares a las encontradas para las mediciones de repetitividad. Estos resultados por tanto confirman que, cuando se normalizan los espectros crudos obtenidos en las mediciones por mapeo de un material de composición homogénea, la dispersión de los datos se reduce al mínimo alcanzable con este instrumento, el cual corresponde a la dispersión cuando todas las mediciones se realizan sobre el mismo punto.

6.4.6 Discusión sobre la evolución de las intensidades Raman en función del tamaño de partícula cuando se miden materiales compactados

En este estudio sólo se ha medido la radiación Raman reflejada, y siguiendo el desarrollo matemático de Schrader y Bergmann ¹², un conjunto de parámetros debe tomarse en cuenta cuando se trata de explicar la evolución observada en las intensidades de las bandas con el tamaño de partícula: un coeficiente de absorción, dos coeficientes de dispersión (inelástico y elástico), y además el grosor de la muestra (ecuación 2.13). El material seleccionado para la preparación de las tabletas puede considerarse como un polvo que no absorbe. Como mencionan Oelkrug y colaboradores ⁴⁰, los polvos completamente no absorbentes no existen, y según sus cálculos la absorción puede ignorarse para capas con un grosor inferior a los 3 mm. De esta manera, el coeficiente de absorción será muy bajo, y constante en todas las fracciones medidas. El coeficiente de dispersión inelástica también puede considerarse constante para todas las tabletas, por tener todas la misma composición química (esto según la ecuación 2.2, donde hay un término relacionado con la sección transversal de la dispersión Raman, la cual depende de la polarizabilidad de las moléculas que constituyen el material irradiado). Respecto al coeficiente de dispersión elástica, este es aproximadamente inversamente proporcional al diámetro de las partículas para los polvos cristalinos. Como se mencionó al inicio del Capítulo 2, sólo una pequeña fracción de los fotones dispersados se dispersa

inelásticamente, y por este motivo la intensidad de un espectro Raman está determinada por la reflectancia difusa de la luz incidente en cada fracción de tamaño de partícula. La variación intuitiva sería que la intensidad Raman aumente con el tamaño de partícula, lo cual es consecuencia de una menor pérdida de la radiación en los procesos de dispersión física cuando las partículas se van haciendo más grandes.

No obstante, los gráficos de las intensidades Raman versus el tamaño de partícula, considerando los datos crudos obtenidos por repetitividad y mapeo muestran dos tendencias, siendo la fracción de 25-50 μm el punto en el cual las intensidades dejan de crecer, luego estas son casi constantes para las fracciones de mayor tamaño (Figuras 6.4a, 6.4c, 6.6a, 6.6c). En este punto se debe considerar el último parámetro: el grosor del material. En el trabajo de Schrader y Bergmann se predice que la señal Raman se incrementa con el tamaño de partícula, sin embargo esto también depende del grosor del material. De hecho, hay un momento para cada fracción de tamaños en el cual las intensidades dejan de crecer. Esto se alcanza con grosores bajos en el caso de polvos muy finos, pero luego se necesitan espesores mayores para las fracciones de mayor tamaño de partícula. Respecto al movimiento de la radiación en la dirección axial, las pérdidas del altamente elevado flujo de fotones ocurre en la interfaz de los cristales y los espacios vacíos en la tableta compactada, y dado que estos eventos ocurren menos cuando se compacta una cantidad fija cristales más grandes, tiene sentido que se requiera un grosor mayor para observar una intensidad constante. Aún más, esta observación también tiene una consecuencia práctica para espesores relativamente bajos, dado que es posible diferenciar las tabletas constituidas por fracciones de polvo más fino, pero posteriormente, con el fin de obtener intensidades mayores para las fracciones de mayor tamaño de partícula, se necesitan capas de material más gruesas. Este es el motivo por el cual nosotros observamos cómo la señal se incrementa con el tamaño de partícula empezando en la fracción de menos de 20 μm hasta aproximadamente 40 μm , pero luego no es posible registrar intensidades mayores para las fracciones de mayor tamaño. Es necesario muestrear más material con el fin de seguir observando un incremento en la señal Raman con el tamaño de partícula.

Repasando las tendencias que se han reportado en los trabajos incluidos en la Tabla 6.1, anteriormente se hizo mención del trabajo de Chio y colaboradores ¹⁹ debido a que ellos también encontraron una estabilización en las intensidades para sus fracciones con partículas de mayor tamaño. Ahora se quiere traer nuevamente a discusión el trabajo de Kristova y colaboradores ²³, ya que ellos reportan un incremento en las intensidades en función del tamaño de partícula empezando en una fracción de 3 μm hasta llegar a 19 μm ;

sin embargo, cuando los tamaños siguen aumentando hasta los 121 μm las intensidades decrecen (esto último es lo que más se reporta en los trabajos experimentales previos). Respecto a lo que ocurre para tamaños mayores de 19 μm , ellos proponen como una posible explicación la reducción en la porosidad al haber progresivamente un mayor empaquetamiento cuando las partículas son más finas, y que entonces esto sirve para aumentar la intensidad de la señal Raman. La explicación tiene sentido, aunque no está acorde a las predicciones teóricas.

¿Por qué la tendencia en este trabajo se revierte para las fracciones con partículas inferiores a los 19 μm ? Dado que el intervalo considerado en este trabajo empieza con tamaños muy pequeños, los autores mencionan un fenómeno adicional relacionado con la radiación de excitación, el tamaño de las partículas, y además, el desplazamiento Raman de las distintas vibraciones activas en Raman que estaban estudiando. En su trabajo la vibración activa en Raman de mayor número de onda que se estudió está en 1436 cm^{-1} , y la menor a los 713 cm^{-1} , estos valores expresados como longitudes de onda equivalen a tamaños de partícula de 7 a 14 μm . Las partículas se pueden volver ópticamente delgadas[†] cuando el tamaño de partícula es igual o menor que la longitud de onda medida ^{41,42}. Los valores de 7 y 14 μm se encuentran entre las fracciones con tamaño de partícula entre 5 y 19 μm , por lo que dicen que proporciones crecientes de cada fracción de polvos, al ir de 19 μm , 5 μm y hasta los 3 μm contienen partículas que son ópticamente delgadas respecto a todas las vibraciones, y de esta forma justifican la progresiva degradación de las intensidades con las fracciones de menor tamaño. En nuestras mediciones se podría pensar que algo así empieza a ocurrir en la tableta constituida por partículas de menos de 20 μm (1039 cm^{-1} = 9.6 μm , 1601 cm^{-1} = 6.2 μm , 1674 cm^{-1} = 5.9 μm), y que este fenómeno, sumado al mayor coeficiente de dispersión elástica por ser las partículas más pequeñas, son la causa de las intensidades menores que se registraron con esta fracción. No obstante, el trabajo de Kristova y colaboradores se hizo con polvos sin compactar, mientras que nosotros tenemos tabletas firmes. En este sentido Salisbury y Wald ⁴³ reportaron que si las partículas se empaquetan juntas, éstas dispersan coherentemente como si fuesen partículas gruesas altamente dispersoras en superficie. Por tanto el único factor que participa en la disminución de las intensidades en función del tamaño de las partículas que constituyen las tabletas, es la distinta magnitud del coeficiente de dispersión elástica de las partículas presentes en cada fracción.

[†] En una partícula ópticamente delgada domina la dispersión en el volumen, es decir, la reflexión en la superficie es baja y es más importante la propagación de la onda electromagnética a través del material. Por otro lado un material ópticamente grueso los fotones no pueden pasar a través del medio sin ser absorbidos, y la reflexión en la superficie es muy importante.

Finalmente, es importante mencionar cómo la dependencia de las intensidades de señal Raman con el tamaño de partícula, será observable dependiendo del volumen de muestreo del instrumento. Está claro que para el rango de tamaños de partículas considerado en este estudio (de menos de 20 μm , a unos pocos cientos de μm), y teniendo diámetros de láser de 50 μm o 500 μm , las distintas propiedades de dispersión de los materiales se reflejan en la intensidad de los espectros adquiridos. En comparación, para los instrumentos que usan una sonda en el registro de los espectros (con diámetros de láser superiores a 3000 μm), las intensidades Raman no dependerán del tamaño de partícula^{18,20}. Los instrumentos FT-Raman usados en este estudio permiten determinar con mucha precisión la posición específica sobre el objeto en la que se va a registrar el espectro (por ejemplo, en el caso del análisis de una tableta farmacéutica que contiene marcas gravadas en su superficie, es posible evitar estas posiciones), y también el problema de la fluorescencia se reduce significativamente por hacer la excitación con un láser de 1064 nm. No obstante, los posibles errores por submuestreo pueden preocupar menos cuando se usan diámetros de irradiación mayores, aunque la fluorescencia puede que tome un papel más importante ya que los instrumentos que usan sondas realizan la excitación mediante un láser con una longitud de onda menor.

6.5 Conclusiones

Nuestros hallazgos experimentales coinciden con lo que predijeron teóricamente hace 50 años Schrader y Bergmann. Se han debatido las conclusiones reportadas en diversos trabajos previos, y en resumen se pretende resaltar lo necesario de hacer una lectura rigurosa de la sección experimental de todos estos estudios, en los que se ha investigado la dependencia de las intensidades Raman con el tamaño de partícula. Las tendencias observadas dependerán de la óptica de los instrumentos, y del grosor de la capa que está siendo irradiada con el láser; lo segundo es el motivo por el cual observamos que las intensidades crecen con el tamaño de partícula hasta aproximadamente 40 μm , pero que luego dejan de crecer para las fracciones con partículas más grandes. Mediante la medición de un conjunto de tabletas de distinto espesor, preparadas todas con partículas de 20-25 μm de KHP, se determinó que las intensidades crecen hasta tener una capa de 1.3 mm. Esto está en el orden de magnitud de lo que se ha predicho anteriormente mediante modelos, y se ajusta a los gráficos obtenidos para la evolución de las intensidades Raman con el tamaño de partícula, generados con tabletas de grosor entre 1.5 y 1.6 mm (Figuras 6.4 y 6.6).

Posteriormente para usar los espectros con fines analíticos, es común la aplicación de pretratamientos espectrales. En este sentido la combinación de las correcciones de línea base y la normalización a vector unidad usada en este trabajo, reduce considerablemente el efecto del tamaño de partícula en la intensidad de las señales, pero aún es significativo para los tamaños de partícula más pequeños. La precisión también es función del tamaño de partícula, pero en el caso de las mediciones por mapeo de un material de composición homogénea el pretratamiento prácticamente elimina esta contribución, y se pueden obtener valores de RSD % en el rango del 0.5 %. Se encuentran tendencias similares para el macro-Raman y el microscopio, sin embargo para el segundo, debido a la menor cantidad de partículas muestreadas, y el sistema menos optimizado de recolección de la radiación Raman en este instrumento, produce un aumento en los valores de RSD % que ahora están en el rango del 2 %.

Respecto a la magnitud del ruido de línea base asociado a muestras con distinto tamaño de partícula, éste varía de la misma manera que las intensidades de las vibraciones activas en Raman; no obstante esto se pudo observar para el macro-Raman pero no con los valores de ruido de línea base tan bajos que se registraron en el microscopio Raman.

Finalmente, también se hizo la estimación del ruido asociado a un amplio rango de intensidades que se pueden presentar en un espectro Raman. Dependiendo de la aplicación específica, la(s) banda(s) de interés puede que se distingan claramente de las otras partes del patrón espectral, o puede que sea necesario un mayor esfuerzo debido a una peor SNR. En este sentido se confirmó que en un instrumento FT-Raman, el ruido es constante para el amplio rango de intensidades que se pueden registrar en las muestras con una elevada respuesta Raman; y que para las mediciones realizadas en diferentes puntos de una muestra homogénea, el pretratamiento espectral puede llevar a un ruido similar al obtenido en mediciones sucesivas sobre un mismo punto.

6.6 Referencias

- (1) *Guidance for Industry PAT — A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing, and Quality Assurance. U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration; 2004.*
- (2) Kim, J.; Noh, J.; Chung, H.; Woo, Y.-A.; Kemper, M. S.; Lee, Y. *Anal. Chim. Acta* **2007**, *598* (2), 280–285.
- (3) Vankeirsbilck, T.; Vercauteren, A.; Baeyens, W.; Van der Weken, G.; Verpoort, F.; Vergote, G.; Remon, J. P. *Trends Anal. Chem.* **2002**, *21* (12), 869–877.

- (4) Pinzaru, S. C.; Pavel, I.; Leopold, N.; Kiefer, W. *J. Raman Spectrosc.* **2004**, *35* (5), 338–346.
- (5) Paudel, A.; Rajjada, D.; Rantanen, J. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2015**, *89*, 3–20.
- (6) Rodriguez, J. D.; Westenberger, B. J.; Buhse, L. F.; Kauffman, J. F. *Analyst* **2011**, *136* (20), 4232.
- (7) Gryniewicz-Ruzicka, C. M.; Rodriguez, J. D.; Arzhantsev, S.; Buhse, L. F.; Kauffman, J. F. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2012**, *61*, 191–198.
- (8) Arruabarrena, J.; Coello, J.; Maspoch, S. *Int. J. Pharm.* **2014**, *465* (1–2), 299–305.
- (9) Gómez, D. A.; Coello, J.; Maspoch, S. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2016**, *124*, 207–215.
- (10) De Beer, T. R.; Baeyens, W. R.; Heyden, Y. V.; Remon, J. P.; Vervaet, C.; Verpoort, F. *Eur J Pharm Sci* **2007**, *30* (3–4), 229–235.
- (11) Townshend, N.; Nordon, A.; Littlejohn, D.; Andrews, J.; Dallin, P. *Anal. Chem.* **2012**, *84* (11), 4665–4670.
- (12) Schrader, B.; Bergmann, G. *Fresenius' Zeitschrift für Anal. Chemie* **1967**, *225* (2), 230–247.
- (13) Kubelka, P.; Munk, F. *Zeitschrift für Tech. Phys.* **1931**, *12*, 593–601.
- (14) *Nanomaterials: Processing and Characterization with Lasers*; Singh, S., Zeng, H., Guo, C., Cai, W., Eds.; Wiley-YCH, 2012.
- (15) Arora, A. K.; Rajalakshmi, M.; Ravindran, T. R.; Sivasubramanian, V. *J. Raman Spectrosc.* **2007**, *38* (6), 604–617.
- (16) Osswald, S.; Mochalin, V. N.; Havel, M.; Yushin, G.; Gogotsi, Y. *Phys. Rev. B* **2009**, *80* (7), 75419.
- (17) Pellow-Jarman, M. V.; Hendra, P. J.; Lehnert, R. J. *Vib. Spectrosc.* **1996**, *12* (2), 257–261.
- (18) Wang, H.; Mann, C. K.; Vickers, T. J. *Appl. Spectrosc.* **2002**, *56* (12), 1538–1544.
- (19) Chio, C. H.; Sharma, S. K.; Lucey, P. G.; Muenow, D. W. *Appl. Spectrosc.* **2003**, *57* (7), 774–783.
- (20) Hu, Y.; Wikström, H.; Byrn, S. R.; Taylor, L. S. *Appl. Spectrosc.* **2006**, *60* (9), 977–984.
- (21) Townshend, N.; Nordon, A.; Littlejohn, D.; Myrick, M.; Andrews, J.; Dallin, P. *Anal. Chem.* **2012**, *84* (11), 4671–4676.
- (22) Chen, Z. P.; Li, L. M.; Jin, J. W.; Nordon, A.; Littlejohn, D.; Yang, J.; Zhang, J.; Yu, R. Q. *Anal. Chem.* **2012**, *84* (9), 4088–4094.
- (23) Kristova, P.; Hopkinson, L. J.; Rutt, K. J. *J. Phys. Chem. A* **2015**, *119* (20), 4891–4897.
- (24) Sparén, A.; Hartman, M.; Fransson, M.; Johansson, J.; Svensson, O. *Appl. Spectrosc.*

- 2015**, 69 (5), 580–589.
- (25) De La Pierre, M.; Carteret, C.; Maschio, L.; André, E.; Orlando, R.; Dovesi, R. *J. Chem. Phys.* **2014**, 140 (16), 164509.
- (26) Shekunov, B. Y.; Chattopadhyay, P.; Tong, H. H. Y.; Chow, A. H. L. *Pharm. Res.* **2007**, 24 (2), 203–227.
- (27) Rohrs, B. R.; Amidon, G. E.; Meury, R. H.; Secreast, P. J.; King, H. M.; Skoug, C. J. *J. Pharm. Sci.* **2006**, 95 (5), 1049–1059.
- (28) Hanan, Z. I.; Durgin, J. M. *Pharmacy practice for technicians*, 5th ed.; Cengage Learning: New York, 2015.
- (29) *Pharmaceutical Applications of Raman Spectroscopy*; Šašić, S., Ed.; John Wiley & Sons, Inc., 2008.
- (30) Fraser, S. J.; Gordon, K. C. *Eur. Pharm. Rev.* **2014**, 19, 3–8.
- (31) Csuros, M. *Environmental Sampling and Analysis. Lab Manual*; CRC Press, 1997.
- (32) Bell, S. E. J.; Beattie, J. R.; McGarvey, J. J.; Peters, K. L.; Sirimu, N. M. S.; Speers, S. J. *J. Raman Spectrosc.* **2004**, 35 (5), 409–417.
- (33) Esbensen, K. H.; Paasch-Mortensen, P. In *Process Analytical Technology*; Bakeev, K., Ed.; John Wiley & Sons, Ltd., 2010.
- (34) Orel, B.; Hadži, D.; Cabassi, F. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Spectrosc.* **1975**, 31 (2), 169–182.
- (35) Griffiths, P. R.; Yeboah, S. A.; Wang, S.-H. *Appl. Spectrosc. Vol. 38, Issue 2, pp. 259-264* **1984**, 38 (2), 259–264.
- (36) Zeaiter, M.; Roger, J.-M.; Bellon-Maurel, V.; Rutledge, D. N. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2004**, 23 (2), 157–170.
- (37) Rinnan, Å.; Berg, F. van den; Engelsen, S. B. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2009**, 28 (10), 1201–1222.
- (38) McCreery, R. L. *Raman Spectroscopy for Chemical Analysis*; John Wiley & Sons, Inc., 2000.
- (39) Matousek, P.; Parker, A. W. *Appl. Spectrosc.* **2006**, 60 (12), 1353–1357.
- (40) Oelkrug, D.; Ostertag, E.; Kessler, R. W. *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, 405 (10), 3367–3379.
- (41) Salisbury, J. W.; Hapke, B.; Eastes, J. W. *J. Geophys. Res.* **1987**, 92, 702–710.
- (42) Myers, T. L.; Brauer, C. S.; Su, Y.-F.; Blake, T. A.; Tonkyn, R. G.; Ertel, A. B.; Johnson, T. J.; Richardson, R. *Appl. Opt.* **2015**, 54 (15), 4863–4875.
- (43) Salisbury, J. W.; Wald, A. *Icarus* **1992**, 96, 121–128.

