

**DESARROLLO DE MÉTODO CUANTITATIVO PARA LA
DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE HUMEDAD EN EL PROCESO
DE GRANULACIÓN DE UN MEDICAMENTO UTILIZANDO LA
TECNOLOGÍA DE INFRARROJO CERCANO**

Por

Dustin E. Pérez García

Tesis investigativa como requisito para la obtención del grado de:

MAESTRO EN CIENCIA

en

QUÍMICA

***UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO
RECINTO UNIVERSITARIO DE MAYAGUEZ***

2011

Aprobado por:

Félix R .Román, Ph.D.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Luis A. Morell, Ph.D.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Samuel P. Hernández-Rivera, Ph.D.
Presidente, Comité Graduado

Fecha

Jayanta Banerjee, Ph.D.
Representante de Estudios Graduados

Fecha

Francis Patrón, Ph.D.
Director, Departamento de Química

Fecha

Abstract

The granulation process is one of the most important processes in the manufacture of a pharmaceutical product. This is due to that in this manufacturing step the active ingredient (AI) is mixed with the excipients. One type of granulation, the wet granulation is very common in pharmaceutical manufacturing. In wet granulation a binder in an aqueous solution is applied to form the desired granulation. Once the granules are formed they have to be dried to eliminate the water content, to ensure that it complies with the established specifications. The water content in the product is closely related to its product stability. It is very important to monitor the water content during this process because adequate moisture content will provide good flowability, density and compressibility characteristics, without affecting significantly the product stability.

Today, thanks to the implementation of chemometric methods, near Infrared spectroscopy (NIRS) can be used for the on-line and off-line as well at-line and in-line monitoring in the granulation process to know the moisture content level in a quick manner and even at a “real time” in an exact, precise and reliable manner.

In this paper I will explain the development and validation of various analytical methods using the NIRS technology, complying with the minimum requirements established by the International Conference on Harmonization (ICH) and the European Medicines Agency (EMA).

Resumen

El proceso de granulación es uno de los procesos más importantes en la manufactura de un producto farmacéutico. Esto se debe a que en este paso de manufactura es que se mezcla el ingrediente activo (IA) con los excipientes. La granulación húmeda es uno de los procesos de granulación más comúnmente utilizados en las industrias farmacéuticas ya que en la mayoría de los casos se requiere de la aplicación de un binder “pegamento” en solución acuosa para lograr la formación de los gránulos deseados. Una vez formado los gránulos estos deben ser secados para eliminar el agua presente y así asegurar que el producto cumpla con la especificación establecida. El contenido de agua presente en la granulación está estrechamente relacionado a la estabilidad del producto. Es por esta razón que es importante monitorear el contenido de humedad en este proceso ya que se debe alcanzar un contenido de agua adecuado en que la mezcla posea buenas características de fluidez, densidad y compresibilidad sin afectar significativamente la estabilidad del producto.

Hoy, gracias a la implementación de métodos quimiométricos la tecnología de infrarrojo cercano NIR puede ser utilizada para la monitorización tanto off-line como on-line, at-line o in-line en el proceso de granulación y conocer los niveles del contenido de humedad de una manera rápida e incluso en tiempo real de una manera exacta, precisa y confiable.

En este escrito se explica en detalle tanto el desarrollo como la validación de varios métodos analíticos utilizando la tecnología NIR cumpliendo con los requisitos mínimos establecidos por la Industrial Conference on Harmonization (ICH) y la European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA) para su implementación.

Agradecimientos

Quiero agradecer antes que todo al Ser Supremo que nos da aliento de vida día a día al cual llamamos DIOS, a mis hijos Ámbar N. Pérez Velázquez y Dustin A. Pérez Velázquez, a mi esposa Eva A. Velázquez Ramírez, a mis suegros, padres y hermanos que son mi mayor fuente de inspiración y apoyo. A las personas del Recinto Universitario de Mayagüez, que de algún modo u otro colaboraron conmigo para que este trabajo se pudiera llevar a cabo. Quiero agradecer en especial a mi gran mentor y hermano, el Dr. Samuel Hernández, al Dr. Carlos López, al Sr. Rafael Almodóvar, al Dr. Marco A. De Jesús, al Dr. Edwin Torres, a los colaboradores de Ciencias Sobre Ruedas y su director el Dr. Juan López Garriga. A los miembros de mi comité, el Dr. Luis A. Morell y al Dr. Félix Román, al Director del Departamento de Química, el Dr. Francis Patrón, al Sr. Franklin Troche y a todas las personas que de algún modo contribuyeron para que yo fuera parte del programa graduado del Departamento de Química del Recinto Universitario de Mayagüez.

De igual forma quiero agradecer a la gran familia de BMS-Humacao por haberme dado la oportunidad de colaborar en este proyecto, a la Gerente General la Ing. Debbie Vázquez, en especial a la Directora del Departamento de Recursos Humanos, la Sra. Grisel Castro, al Director del Departamento de Salud y Seguridad, el Ing. Alvin Crespo, por depositar su confianza y haber visto en mí la capacidad para realizar este proyecto. También quiero expresar mi gratitud a mi gran amigo y hermano de años al Sr. Fernando Rodríguez, al personal del Departamento de Control de Calidad, en especial a la Sra. Magdalena Morales, Directora de este Departamento, al Sr. Ángel Vega, al Sr. Ricardo Sotomayor y al Sr. Javier Ayala. Gracias de todo corazón, ya que sin ustedes no hubiera podido realizar este trabajo.

Tabla de Contenido

1 Introducción	1
1.1 Procesos de Mezclado	1
1.1.1 Compresión Directa	1
1.1.2 Granulación Húmeda	2
1.1.3 Granulación Seca	2
1.2 Metodo de Karl Fischer	2
1.3 Espectroscopía	6
1.3.1 Choque elástico	6
1.3.2 Choque inelástico	7
1.3.3 Absorción o emisión resonante de fotones	7
1.3.3.1 Absorbencia	8
1.3.3.2 Transmitancia	9
1.3.3.3 Reflectancia	9
1.4 Espectroscopia de Infrarrojo	11
1.4.1 Infrarrojo lejano	11
1.4.2 Infrarrojo Medio	11
1.4.3 Infrarrojo Cercano	11
1.4.3.1 Principios de Infrarrojo cercano	12
2 Quimiometría	16
2.1 Pasos a seguir en la creación de un modelo de predicción	16
2.1.1 Selección de un conjunto de muestras de calibración	17
2.1.2 Determinación del parámetro a predecir mediante un método de referencia	17
2.1.3 Obtención de la señal analítica mediante la nueva técnica instrumental	18
2.1.4 Cálculo del modelo	18
2.1.5 Validación del modelo	18
2.1.5.1 Especificidad	19
2.1.5.2 Linealidad	19
2.1.5.3 Rango	20
2.1.5.4 Exactitud	20
2.1.5.5 Precisión	21
2.1.5.6 Limite de detección	21
2.1.5.7 Limite de cuantificación	21
2.1.6 Aplicación del nuevo modelo analítico a muestras Desconocidas	21
2.1.7 Análisis de rutina y monitorización	22
2.1.8 Transferencia del modelo	22
2.2 Pre-tratamientos Espectrales	22
2.2.1 Promediado de espectros	23
2.2.2 Suavizado espectral	23
2.2.3 Corrección de línea base	23
2.2.4 Derivación	24
2.2.5 Corrección Multiplicativa de la Dispersión	24
2.2.6 Variable Normal Estándar	25
2.3 Reducción de Variables	25
2.3.1 Pre-tratamiento de Datos	25

2.3.2	Análisis de Componentes Principales	26
2.4	Aplicación Quimiométrica en Análisis Cualitativo	28
2.4.1	Métodos de Reconocimiento de Pautas	29
2.4.2	Bibliotecas de Identificación Espectral	30
2.5	Aplicación Quimiométrica en Análisis Cuantitativo	30
2.5.1	Regresión lineal Múltiple (MLR, Multiple Linear Regression)	31
2.5.1.1	Regresión Lineal Clásica (CLS)	31
2.5.1.1.1	Creación y multiplicación de matrices en CLS	31
2.5.1.1.2	Creación de la Calibración en CLS	33
2.5.1.1.3	Predicción de muestras desconocidas en CLS	34
2.5.1.2	Regresión lineal Inversa (ILS)	35
2.5.1.2.1	Creación y multiplicación de matrices en ILS	36
2.5.1.2.2	Creación de la Calibración en ILS	37
2.5.1.2.3	Predicción de muestras desconocidas en ILS	37
2.5.2	Métodos de calibración basados en reducción de variables	38
2.5.2.1	Regresión de Componentes Principales	38
2.5.2.1.1	Creación de la Calibración en PCR	39
2.5.2.1.2	Predicción de muestras desconocidas en PCR	40
2.5.2.2	Regresión de Cuadrados Mínimos Parciales (PLS)	41
2.5.2.3	Diferencia entre PLS y PCR	42
2.5.3	Evaluación de la capacidad predictiva del método	43
2.5.3.1	Error Absoluto	43
2.5.3.2	Bias	43
2.5.3.3	PRESS (Predicted Residual Error Sum of Squares)	44
2.5.3.4	Varianza de Predicción	44
2.5.3.5	SEP (Standard Error of Prediction)	45
2.5.3.6	MSEP (Mean Squared Error of Prediction)	45
2.5.3.7	RMSEP (Root Mean Standard Error of Prediction)	45
2.5.3.8	MSEC (Mean Squared Error of Calibration)	45
2.5.3.9	RMSEC (Root Mean Standard Error of Calibration)	46
2.5.3.10	Porcentaje Residual del Error Estándar de Calibración y Porcentaje Residual del Error Estándar de Predicción (%RSEC y %RSEP)	46
3	Trabajos Previos	47
4	Materiales y Métodos	57
4.1	Reactivos	57
4.2	Equipos Utilizados	58
4.2.1	Cristalería	58
4.2.2	Otros materiales	58
4.2.3	Aparatos Electrónicos	58
4.2.4	Software	58
4.3	Preparación de las muestras de calibración	59
4.4	Obtención de la señal analítica mediante la nueva técnica Instrumental	63
4.5	Determinación del parámetro a predecir mediante un método de referencia (KF)	63
4.6	Calculo del modelo	66
4.7	Selección del número de factores	67
5	Resultados y Discusión	68
5.1	Validación del modelo	68

5.1.1 Especificidad	70
5.1.2 Linealidad	71
5.1.3 Limite de detención (LD) y limite de cuantificación (LQ)	72
5.1.4 Exactitud	73
5.1.5 Precisión	75
5.1.6 Rango	79
5.2 Evaluación quimiométrica	81
6 Conclusión	83
7 Referencias	84

Lista de Tablas

Tabla 4.1 Composición de la granulación	57
Tabla 4.2 Porcientos de humedad aceptados	60
Tabla 4.3 Distribución de las muestras	60
Tabla 4.4 Muestras colocadas en horno a 60 °C al vacío (D)	62
Tabla 4.5 Muestras expuestas a humedad (W)	62
Tabla 4.6 Valores obtenidos mediante KF	65
Tabla 4.7 Resumen de los parámetros aplicados para cada uno de los métodos	66
Tabla 5.1: Pre-tratamientos aplicados y valores de algunos parámetros de evaluación quimiométricos obtenidos para cada uno de los métodos creados	68
Tabla 5.2: Tabla de ecuaciones para cada una de los métodos de calibración	72
Tabla 5.3: Resumen de los resultados obtenidos de los análisis de varianza para cada una de los métodos de calibración	72
Tabla 5.4: Valores de los límites de detección y cuantificación para cada una de las curvas de calibración	73
Tabla 5.5: Resumen de los parámetros de linealidad obtenida de los análisis de varianza para todas las regresiones de valores predichos del % de humedad mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de todas las presentaciones	74
Tabla 5.6: Resumen de todas las ecuaciones de las curvas de valores predichos del % de humedad mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de todas las presentaciones	74
Tabla 5.7: Medidas de precisión obtenidas para cada uno de los métodos	76
Tabla 5.8: Lecturas de una misma muestra para comparar precisión entre los métodos de NIR desarrollados	79
Tabla 5.9: Valores reportados para cada muestra mediante KF y los métodos desarrollados	80
Tabla 5.10: Parámetros de evaluación quimiométrica obtenidas sobre las muestras de validación	82
Tabla A-1a: Primera lectura de los pesos y de datos obtenidos de Karl Fischer para el conjunto de calibración	86
Tabla A-1b: Segunda lectura de los pesos y de datos obtenidos de Karl Fischer para el conjunto de calibración	87

Tabla A-1c: Tercera lectura de los pesos y de datos obtenidos de Karl Fischer para el conjunto de calibración	88
Tabla A-2: Valores de humedad y el promedio obtenidos mediante KF para el conjunto de calibración (Tabla 4.5 y 4.6 del texto)	90
Tabla A-3: Valores de humedad obtenidos mediante KF para el conjunto de muestras de validación (Tabla 4. del texto)	91
Tabla B-1a: Valores de los % de humedad de las muestras de calibración determinadas mediante KF y NIR por las distintas regresiones	92
Tabla B-1b: Valores de los % de humedad de las muestras de calibración determinadas mediante KF y NIR por las distintas regresiones	93
Tabla B-2: Tabla de ecuaciones, LD, LQ para las distintas regresiones de calibración	111
Tabla B-3: Presentación de los valores de R cuadrado, SS, MS y F obtenidos de los análisis de ANOVA de las regresiones de calibración	111
Tabla B-4: Pre-tratamientos aplicados y valores de calibración quimiométricos obtenidos para todas las curvas de calibración	112
Tabla C-1a: Valores del % de humedad por KF y predichos por NIR para las muestras de validación	113
Tabla C-1b: Valores del % de humedad por KF y predichos por NIR para las muestras de validación	114
Tabla C-2a: Resumen de los parámetros de linealidad obtenida de los análisis de varianza para todas las regresiones de valores predichos del % de humedad mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de todas las presentaciones	131
Tabla C-2b: Resumen de todas las ecuaciones de las curvas de valores predichos del % de humedad mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de todas las presentaciones	131
Tabla C-3a: Resumen de los parámetros de linealidad obtenida de los análisis de varianza para todas las regresiones de valores predichos del % de humedad mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de 20mg	148
Tabla C-3b: Resumen de todas las ecuaciones de las curvas de valores predichos del % de humedad mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de 20mg	148
Tabla C-4.1: Medidas de exactitud para MLRAb.20mg	149
Tabla C-4.2: Medidas de exactitud para PLSRAb.20mgB	149

Tabla C-4.3: Medidas de exactitud para MLRAb.3	150
Tabla C-4.4: Medidas de exactitud para PLSRAb.2	150
Tabla C-4.5: Medidas de exactitud para PLSRAb.1	151
Tabla C-4.6: Medidas de exactitud para PLSRAb.1SNV	151
Tabla C-4.7: Medidas de exactitud para PLSRAb.SNV1	152
Tabla C-4.8: Medidas de exactitud para PLSRAb.1SG	152
Tabla C-4.9: Valores de evaluación quimiométricos para cada uno de los métodos obtenidos de los valores predichos para las muestras de validación	153
Tabla C-5.1: Medidas de precisión para el método KF	153
Tabla C-5.2: Medidas de precisión para el método MLRAb.20mg	154
Tabla C-5.3: Medidas de precisión para el método PLSRAb.20mgB	154
Tabla C-5.4: Medidas de precisión para el método MLRAb.3	154
Tabla C-5.5: Medidas de precisión para el método PLSRAb.2	154
Tabla C-5.6: Medidas de precisión para el método PLSRAb.1	155
Tabla C-5.7: Medidas de precisión para el método PLSRAb.1SNV	155
Tabla C-5.8: Medidas de precisión para el método PLSRAb.SNV1	155
Tabla C-5.9: Medidas de precisión para el método PLSRAb.1SG	155
Tabla C-5.10: Reporte de valores del % de humedad para las muestras de 20mg	156
Tabla C-5.11: Reporte de valores promedio del % de humedad para las muestras de 20mg	157
Tabla C-6: Medida de la precisión instrumental	157

Lista de Figuras

Figura 1.1 Aparato de titulación potenciométrica Karl Fischer Modelo 841 Titrand	4
Figura 1.2 Reflectancia difusa y transmitancia difusa	10
Figura 1.3 Espectro Electromagnético	10
Figura 1.4 Sonda acoplada al FOSS XDS mediante fibra óptica	12
Figura 1.5 Diagrama de funciones potenciales para osciladores armónicos y anarmónicos	14
Figura 4.1 Espectrofotómetro de Infrarrojo Medio (NIR)	59
Figura 4.2: Grafica de logaritmo del PRESS vs. número de factores	67
Figura 5.1: Diagrama de muestreo de la mezcla (Composite) de dos lotes de 20mg	70
Figura B-1.1: Regresión de calibración MLRAb.20mg	94
Figura B.1.2: Regresión de calibración PLSRAb.20mgB	97
Figura B-1.3: Regresión MLRAb.3	99
Figura B-1.4: Regresión de calibración PLSRAb.2	101
Figura B-1.5: Regresión de calibración PLSRAb.1	103
Figura B-1.6: Regresión de calibración PLSRAb.1SNV	105
Figura B-1.7: Regresión de calibración PLSRAb.SNV1	107
Figura B-1.8: Regresión de calibración PLSRAb.1SG	109
Figura C-2.1: Curva de valores predichos del % de humedad mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de todas las presentaciones utilizando la regresión (MLRAb.20mg)	115
Figura C-2.2: Curva de valores predichos del % de humedad mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de todas las presentaciones utilizando la regresión (PLSRAb.20mgB)	117
Figura C-2.3: Curva de valores predichos del % de humedad mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de todas las presentaciones utilizando la regresión (MLRAb.3)	119
Figura C-2.4: Curva de valores predichos del % de humedad mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de todas las presentaciones utilizando la regresión (PLSRAb.2)	121

Figura C-2.5: Curva de valores predichos del % de humedad mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de todas las presentaciones utilizando la regresión (PLSRAb.1)	123
Figura C-2.6: Curva de valores predichos del % de humedad mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de todas las presentaciones utilizando la regresión (PLSRAb.1SNV)	125
Figura C-2.7: Curva de valores predichos del % de humedad mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de todas las presentaciones utilizando la regresión (PLSRAb.SNV1)	127
Figura C-2.8: Curva de valores predichos del % de humedad mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de todas las presentaciones utilizando la regresión (PLSRAb.1SG)	129
Figura C-3.1: Curva de valores del % de humedad predichos mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de 20mg utilizando la regresión (MLRAb.20mg)	132
Figura C-3.2: Curva de valores del % de humedad predichos mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de 20mg utilizando la regresión (PLSRAb.20mgB)	134
Figura C-3.3: Curva de valores del % de humedad predichos mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de 20mg utilizando la regresión (MLRAb.3)	136
Figura C-3.4: Curva de valores del % de humedad predichos mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de 20mg utilizando la regresión (PLSRAb.2)	138
Figura C-3.5: Curva de valores del % de humedad predichos mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de 20mg utilizando la regresión (PLSRAb.1)	140
Figura C-3.6: Curva de valores del % de humedad predichos mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de 20mg utilizando la regresión (PLSRAb.1SNV)	142
Figura C-3.7: Curva de valores del % de humedad predichos mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de 20mg utilizando la regresión (PLSRAb.SNV1)	144
Figura C-3.8: Curva de valores del % de humedad predichos mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de 20mg utilizando la regresión (PLSRAb.1SG)	146

Lista de Apéndices

Apéndice A	84
Sec A-1: Determinación del contenido de humedad mediante Karl Fischer	87
Apéndice B	90
Sec. B-1: Regresiones	92
Sec. B-1.1: Análisis de la Varianza (ANOVA) para la regresión de calibración MLRAb.20mg	92
Sec. B-1.1.1: Ejemplo de la corrección de la ecuación de la curva de calibración MLRAb.20mg	94
Sec. B-1.1.2: Determinación del Límite de Detección (LD) y Límite de Cuantificación (LQ) para la regresión de calibración MLRAb.20mg	94
Sec. B-1.2: Análisis de la regresión de calibración PLSRAb.20mgB	95
Sec. B-1.2.1: Ecuación de la curva de calibración de calibración PLSRAb.20mgB Corregida	97
Sec. B-1.2.2: Límite de Detección (LD) y Límite de Cuantificación (LQ) para la regresión PLSRAb.20mgB	97
Sec. B-1.3: Análisis de la regresión MLRAb.3	97
Sec. B-1.3.1: Ecuación de la curva de calibración MLRAb.3 corregida	99
Sec. B-1.3.2: Límite de Detección (LD) y Límite de Cuantificación (LQ) para la regresión de calibración MLRAb.3	99
Sec. B-1.4: Análisis de la regresión de calibración PLSRAb.2	99
Sec. B-1.4.1: Ecuación de la curva de calibración PLSRAb.2 corregida	101
Sec. B-1.4.2: Límite de Detección (LD) y Límite de Cuantificación (LQ) para la regresión de calibración PLSRAb.2	101
Sec. B-1.5: Análisis de la regresión de calibración PLSRAb.1	101
Sec. B-1.5.1: Ecuación de la curva de calibración PLSRAb.1 corregida	103
Sec. B-1.5.2: Límite de Detección (LD) y Límite de Cuantificación (LQ) para la regresión de calibración PLSRAb.1	103
Sec. B-1.6: Análisis de la regresión de calibración PLSRAb.1SNV	103
Sec. B-1.6.1: Ecuación de la curva de calibración PLSRAb.1SNV corregida	105
Sec. B-1.6.2: Límite de Detección (LD) y Límite de Cuantificación (LQ) para la regresión de calibración PLSRAb.1SNV	105
Sec. B-1.7: Análisis de la regresión de calibración PLSRAb.SNV1	105
Sec. B-1.7.1: Ecuación de la curva de calibración PLSRAb.SNV1 corregida	107
Sec. B-1.7.2: Límite de Detección (LD) y Límite de Cuantificación (LQ) para la regresión de calibración PLSRAb.SNV1	107
Sec. B-1.8: Análisis de la regresión de calibración PLSRAb.1SG	107
Sec. B-1.8.1: Ecuación de la curva de calibración PLSRAb.1SG corregida	109
Sec. B-1.8.2: Límite de Detección (LD) y Límite de Cuantificación (LQ) para la regresión de calibración PLSRAb.1SG	109
Apéndice C	111
Sec. C-1: Validación	111
Sec. C-2: Gráficas del contenido de humedad para todas las muestras de validación	113

Sec. C-2.1: Análisis de la regresión para la curva de valores predichos del % de humedad mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de todas las presentaciones utilizando la regresión (MLRAb.20mg)	113
Sec. C-2.1.1: Ecuación de la curva corregida para la curva de valores predichos del % de humedad mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de todas las presentaciones utilizando la regresión (MLRAb.20mg)	114
Sec. C-2.2: Análisis de la regresión para curva de valores predichos del % de humedad mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de todas las presentaciones utilizando la regresión (PLSRAb.20mgB)	115
Sec. C-2.2.1: Ecuación de la curva corregida para la curva de valores predichos del % de humedad mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de todas las presentaciones utilizando la regresión (PLSRAb.20mgB)	116
Sec. C-2.3: Análisis de la regresión para curva de valores predichos del % de humedad mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de todas las presentaciones utilizando la regresión (MLRAb.3)	117
Sec. C-2.3.1: Ecuación de la curva corregida para la curva de valores predichos del % de humedad mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de todas las presentaciones utilizando la regresión (MLRAb.3)	118
Sec. C-2.4: Análisis de la regresión para curva de valores predichos del % de humedad mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de todas las presentaciones utilizando la regresión (PLSRAb.2)	119
Sec. C-2.4.1: Ecuación de la curva corregida para la curva de valores predichos del % de humedad mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de todas las presentaciones utilizando la regresión (PLSRAb.2)	120
Sec. C-2.5: Análisis de la regresión para curva de valores predichos del % de humedad mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de todas las presentaciones utilizando la regresión (PLSRAb.1)	121
Sec. C-2.5.1: Ecuación de la curva corregida para la curva de valores predichos del % de humedad mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de todas las presentaciones utilizando la regresión (PLSRAb.1)	122
Sec. C-2.6: Análisis de la regresión para curva de valores predichos del % de humedad mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de todas las presentaciones utilizando la regresión (PLSRAb.1SNV)	123
Sec. C-2.6.1: Ecuación de la curva corregida para la curva de valores predichos del % de humedad mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de todas las presentaciones utilizando la regresión (PLSRAb.1SNV)	124
Sec. C-2.7: Análisis de la regresión para curva de valores predichos del % de humedad mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de todas las presentaciones utilizando la regresión (PLSRAb.SNV1)	125
Sec. C-2.7.1: Ecuación de la curva corregida para la curva de valores predichos del % de humedad mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de todas las presentaciones utilizando la regresión (PLSRAb.SNV1)	126
Sec. C-2.8: Análisis de la regresión para curva de valores predichos del % de humedad mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de todas las presentaciones utilizando la regresión (PLSRAb.1SG)	127
Sec. C-2.8.1: Ecuación de la curva corregida para la curva de valores predichos del % de humedad mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de todas las presentaciones utilizando la regresión (PLSRAb.1SG)	128

Sec. C-3: Análisis de regresiones para las muestras de validación de 20mg	130
Sec. C-3.1: Análisis de la regresión para curva de valores del % de humedad predichos mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de 20mg utilizando la regresión (MLRAb.20mg)	130
Sec. C-3.1.1: Ecuación de la curva corregida para la curva de valores predichos del % de humedad mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de 20mg utilizando la regresión (MLRAb.20mg)	131
Sec. C-3.2: Análisis de la regresión para curva de valores del % de humedad predichos mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de 20mg utilizando la regresión (PLSRAb.20mgB)	132
Sec. C-3.2.1: Ecuación de la curva corregida para la curva de valores predichos del % de humedad mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de 20mg utilizando la regresión (PLSRAb.20mgB)	133
Sec. C-3.3: Análisis de la regresión para curva de valores del % de humedad predichos mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de 20mg utilizando la regresión (MLRAb.3)	134
Sec. C-3.3.1: Ecuación de la curva corregida para la curva de valores predichos del % de humedad mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de 20mg utilizando la regresión (MLRAb.3)	135
Sec. C-3.4: Análisis de la regresión para curva de valores del % de humedad predichos mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de 20mg utilizando la regresión(PLRAb.2)	136
Sec. C-3.4.1: Ecuación de la curva corregida para la curva de valores predichos del % de humedad mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de 20mg utilizando la regresión (PLSRAb.2)	137
Sec. C-3.5: Análisis de la regresión para curva de valores del % de humedad predichos mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de 20mg utilizando la regresión (PLSRAb.1)	138
Sec. C-3.5.1: Ecuación de la curva corregida para la curva de valores predichos del % de humedad mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de 20mg utilizando la regresión (PLSRAb.1)	139
Sec. C-3.6: Análisis de la regresión para curva de valores del % de humedad predichos mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de 20mg utilizando la regresión (PLSRAb.1SNV)	140
Sec. C-3.6.1: Ecuación de la curva corregida para la curva de valores predichos del % de humedad mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de 20mg utilizando la regresión (PLSRAb.1SNV)	141
Sec. C-3.7: Análisis de la regresión para curva de valores del % de humedad predichos mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de 20mg utilizando la regresión (PLSRAb.SNV1)	142
Sec. C-3.7.1: Ecuación de la curva corregida para la curva de valores predichos del % de humedad mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de 20mg utilizando la regresión (PLSRAb.SNV1)	143
Sec. C-3.8: Análisis de la regresión para curva de valores del % de humedad predichos mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de 20mg utilizando la regresión (PLSRAb.1SG)	144
Sec. C-3.8.1: Ecuación de la curva corregida para la curva de valores predichos del % de humedad mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de 20mg utilizando la regresión (PLSRAb.1SG)	145

CAPÍTULO I

Introducción

Mike Tousey de DI Pharma Tech [1] señaló en el 2005 que los asuntos principales en la manufactura de un medicamento son los procesos de Formulación, Mezclado, Molienda, Granulación, Secado, Mezclado Final, Formación de la tableta, Labrado de la tableta, Capa y el Encapsulado. El conocer y monitorear cada uno de estos procesos es de suma importancia para garantizar un buen control de calidad del producto. Estos procesos de manufactura deben ser realizados del mismo modo y monitoreados por el Departamento de Control de Calidad (QC por sus siglas en inglés) para asegurar que el producto esté siempre dentro de los parámetros establecidos y así garantizar la reproducibilidad entre cada lote que sea manufacturado.

En la manufactura de cada fármaco se debe mezclar el ingrediente activo farmacéutico (**IAF**) con los excipientes, garantizando que la mezcla posea buenas características de flujo, densidad y compresibilidad. Los procesos más comunes utilizados por las industrias farmacéuticas para mezclar el **IAF** con los excipientes son la Compresión Directa, la Granulación Húmeda y la Granulación Seca.

1.1 Procesos de Mezclado

1.1.1 *Compresión Directa*

En la Compresión Directa se mezclan los excipientes con el **IAF** en seco y luego se prosigue con el proceso de compresión para la formación de la tableta. Este proceso es aplicado a polvos que al unirse y ser mezclados permanecen mezclados por su gran adhesión formando una mezcla adecuada para su posterior compresión.

1.1.2 Granulación Húmeda

La Granulación Húmeda consiste en la unión del **IAF** con los excipientes mediante la aplicación de un material adhesivo conocido como “**binder**”. Este material adhesivo es mezclado con agua o disolventes y rociado a la mezcla de polvos causando que estos se adhieran formando los gránulos. Luego, la mezcla es secada hasta alcanzar el nivel de humedad deseado. Este proceso es aplicado cuando los excipientes y el activo no forman una buena mezcla mediante el proceso de Compresión Directa. Es de suma importancia que los niveles de humedad presentes en este proceso sean los adecuados para asegurar una buena fluidez, compresión y estabilidad del producto.

1.1.3 Granulación Seca

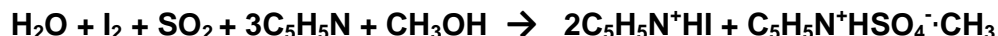
Este tipo de granulación consiste en la aplicación mecánica para la densificación y compactación de la mezcla formando una especie de galleta. Una vez formada la galleta esta será fragmentada formándose así los gránulos deseados. Este tipo de granulación es aplicada cuando los gránulos no pueden obtenerse mediante la Compresión Directa o la Granulación Húmeda debido a que el producto no puede ser sometido a disolventes o calor.

El contenido de humedad en el proceso de Granulación Húmeda de una droga farmacéutica es determinada mediante la técnica de Karl Fischer (KF) como criterio de control de calidad del producto.

1.2 Método de Karl Fischer

El método de titulación potenciométrica de Karl Fischer fue publicado por primera vez en 1935 por el químico alemán Karl Fischer. Este método ha sido utilizado para la

cuantificación en una amplia gama de productos por diversas industrias para conocer su contenido de agua [2]. La misma consiste de una reacción cuantitativa conocida como la reacción de Bunsen, que fue descrita en 1853 mediante el cual el agua presente en la muestra reacciona con yodo (I_2) y dióxido de azufre en presencia de metanol (MeOH) y una base orgánica nitrogenada (una amina) para producir yoduro de hidrógeno y trióxido de azufre [3]. El MeOH reacciona con el trióxido de azufre para producir ácido metilsulfúrico. Simultáneamente, el MeOH previene que el agua reaccione con el trióxido de azufre formado y que la reacción se desplace hacia los reactivos afectando la estequiometría de la reacción. Luego, el ácido metilsulfúrico reacciona con la base nitrogenada para completar la reacción. La reacción química que se lleva a cabo en la titulación potenciométrica de KF es la descrita a continuación:



Descripción del sistema de Karl Fischer

El aparato de titulación potenciométrica de KF consiste de una celda electroquímica formada de dos compartimientos conocidos como el ánodo y el cátodo. Estos compartimientos están separados por una membrana de iones permeable. En ambos compartimientos se encuentran dos electrodos de platino conocidos como el electrodo de generación y el electrodo de medición por los cuales viaja la corriente eléctrica que se mantiene constante durante la titulación. El punto final de la titulación se detecta por el aparato una vez se observa un cambio abrupto en la corriente eléctrica del sistema indicando que la reacción ha alcanzado el equilibrio.



**Figura 1.1 Aparato de titulación potenciométrica Karl Fischer
Modelo 841 Titrando**

En el proceso de medición se genera yodo a partir de la oxidación del ion yoduro en el electrodo de generación el cual reacciona con el dióxido de azufre en presencia de una base orgánica nitrogenada. Luego ocurre una reacción estequiométrica con el agua presente en la muestra.

La ley de Faraday establece que:

$$n = (1/zF) \cdot I \cdot t \quad (1)$$

donde:

n = cantidad en moles del analito.

z = electrones envueltos en la reacción química.

F = constante de Faraday ($F=qN_A$) equivalente a $96,485 \text{ C mol}^{-1}$.

donde:

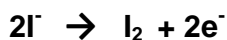
q = carga de un electrón 1.602×10^{-19} coulombios por electrón.

N_A = el número de Avogadro equivalente a 6.022×10^{23} iones por mol.

I = corriente de titulación en amperios (A)

t = tiempo medido en segundos (s)

De acuerdo a esta ley, para producir un mol de una sustancia que requiera de un electrón se necesitan 96,485 C. Un coulombio (C) equivale a la carga transportada por una corriente de 1 amperio en un segundo. Para una reacción de Karl Fischer dos electrones son liberados por dos iones de yoduro para producir un mol de yodo el cual reacciona con el agua presente en la muestra. Esto quiere decir que por cada mol de agua presente en la muestra se requiere de un mol de yodo, y que para producir un mol de yodo a partir de dos iones de yoduro se producen dos moles de electrones que equivalen a $2 \times 96,485$ C según se ilustra en la siguiente reacción.



De esta manera, midiendo la corriente eléctrica en la reacción con un amperómetro y el tiempo en segundos podemos cuantificar la cantidad de agua presente en una sustancia.

La técnica de KF “off-line” y la de LOD (“thermogravimetric Lost on Dry at-line”) son técnicas muy confiables para el monitoreo y la cuantificación del contenido de humedad en el proceso de granulación, pero requieren de la colección y manejo de muestra del área de proceso al laboratorio para llevar a cabo el análisis mientras continúa el proceso de secado. Ésto requiere de pérdida de tiempo y nunca se puede obtener un resultado certero en tiempo real. En adición, el manejo de la muestra puede traer como consecuencia problemas en la calidad del análisis si éstas no se manejan adecuadamente.

Por otra parte, LOD no es una técnica específica para la determinación del contenido de agua, ya que todos los componentes volátiles contribuyen a la pérdida termogravimétrica.

La espectroscopía de Infrarrojo Cercano (NIR por sus siglas en inglés) ha demostrado ser una herramienta muy útil tanto para el monitoreo del secado en procesos de granulación, como para el análisis residual de disolventes como metanol [4]. Este aparato puede ser conectado directamente “on-line” al equipo de proceso obteniendo datos cualitativos y cuantitativos en tiempos reales. Es una técnica rápida, no destructiva y puede almacenar información automáticamente. La técnica de NIR no da paso al error humano ya que no requiere del manejo de muestras y lo que es mejor, no genera desperdicios, dando como resultado una menor pérdida de tiempo de manufactura, datos en tiempos reales y un alivio al medioambiente de manera costo efectiva.

1.3 Espectroscopía

La espectroscopía es la rama de la ciencia que estudia la interacción que existe entre la luz y la materia y los cambios que ésta experimenta una vez incide sobre la misma. Esta interacción puede ser de tres tipos:

1.3.1 Choque elástico

Se le conoce como choque elástico a una colisión entre dos o más cuerpos en la que éstos no sufren deformaciones permanentes durante el impacto, conservándose así tanto el momento lineal como la energía cinética del sistema y no hay intercambio de masa entre los cuerpos una vez se separen después del choque.

1.3.2 Choque inelástico

En este tipo de colisión, la energía cinética no se conserva. Como consecuencia, los cuerpos que colisionan pueden deformarse y su temperatura puede aumentar como resultado del impacto.

1.3.3 Absorción o emisión resonante de fotones

En este tipo de interacción, la sustancia puede absorber o emitir un cuanto de luz. La espectroscopía se relaciona en la mayoría de los procesos analíticos a este tipo de interacción.

La ecuación básica que define la espectroscopía es:

$$\Delta E = h\nu \quad (2)$$

donde:

ΔE = es la diferencia de energía entre dos estados cuánticos de la sustancia estudiada.

h = es la constante de Planck que equivale a $6.626 \times 10^{-34} \text{ J}\cdot\text{s}$.

ν = es la frecuencia equivalente al cuanto de luz.

Esta diferencia en energía depende de la composición química o de la estructura de la molécula estudiada y es por tal razón que la espectroscopía nos puede brindar una información muy útil en la Química Analítica. La información obtenida mediante un instrumento espectroscópico se conoce como un espectro. Se denota como un espectro a la gráfica de la intensidad de luz absorbida o emitida en función de frecuencia o de longitud de onda.

En términos generales, en todos los métodos espectroscópicos ocurre el mismo fenómeno. Primero se irradia la muestra con una fuente de energía. Una vez el haz de luz interactúa con la superficie de la muestra, ésta puede ser absorbida, transmitida o reflejada. De este modo, midiendo a qué frecuencia absorbe la muestra y cuánto absorbe, transmite o refleja, se puede identificar una muestra desconocida y determinar cuánto hay de la misma.

1.3.3.1 Absorbencia

A una frecuencia dada, la cantidad de energía absorbida o transmitida por una muestra va a depender de la cantidad de moléculas que absorban en esa frecuencia en específico. Según la ley de Beer-Lambert existe una relación exponencial entre la absorbencia y la concentración de la muestra. A bajas concentraciones esta relación entre absorbencia y concentración tiene un comportamiento lineal.

La absorbencia para un solo componente a una longitud de onda en específico está definida por la siguiente ecuación:

$$A=KC \quad (3)$$

donde:

A = absorbencia.

K = coeficiente de absortividad molar.

C = concentración de la muestra.

1.3.3.2 Transmitancia

Cuando una sustancia es irradiada con un haz de luz, la luz es absorbida y parte pasa a través de la muestra. La transmitancia se define en términos de porcentaje como la razón de la intensidad de la luz que pasa a través de la muestra vs. la intensidad de la energía que incide sobre la muestra.

$$\%T = I/I_0 \times 100 \quad (4)$$

donde:

I = es intensidad de la luz que pasa a través de la muestra.

I_0 = la intensidad de la energía que incide sobre la muestra.

La transmitancia es utilizada para sustancias que exhiban transparencia.

1.3.3.3 Reflectancia

Por otra parte una vez la muestra es irradiada, la luz que no es absorbida ni transmitida puede ser reflejada. En espectroscopia de infrarrojo cercano la transmitancia difusa y la reflectancia difusa son las más comúnmente utilizadas. El tipo de medición que se utilice dependerá de las propiedades ópticas de la muestra. La transmitancia difusa se utiliza para sustancias que exhiban transparencia mientras que la reflectancia difusa se utiliza para sólidos, semisólidos y sustancias turbias.

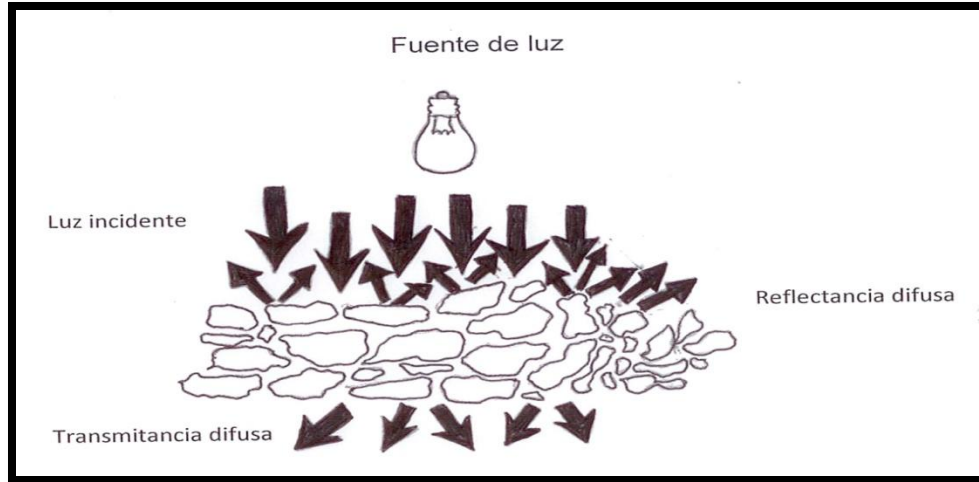
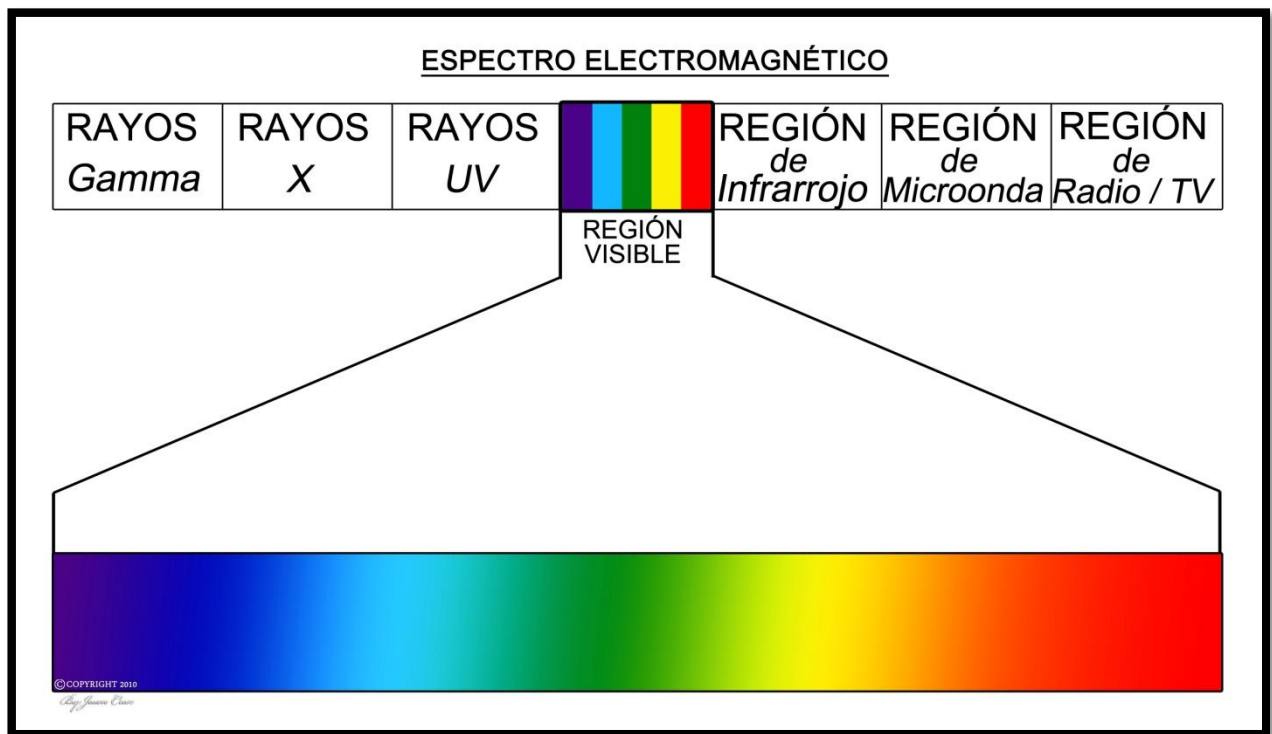


Figura 1.2 Reflectancia difusa y transmitancia difusa

En la actualidad, existen métodos espectroscópicos que comprenden todas las regiones del espectro electromagnético desde rayos gamma hasta la región de radiofrecuencia.

Figura 1.3 Espectro Electromagnético



1.4 Espectroscopía de Infrarrojo

La región infrarroja comprende desde 33 cm^{-1} hasta $13,000\text{ cm}^{-1}$ y se subdivide en infrarrojo lejano, infrarrojo medio y el infrarrojo cercano [5].

1.4.1 Infrarrojo lejano

Esta región del infrarrojo comprende desde 33 cm^{-1} hasta 650 cm^{-1} siendo la región más cercana a la región de microondas dentro del espectro electromagnético. Es por esto que es la región del infrarrojo de más baja energía y está asociada al movimiento rotacional de las moléculas.

1.4.2 Infrarrojo medio

El infrarrojo medio comprende desde 650 cm^{-1} hasta los 4000 cm^{-1} . Esta región está asociada tanto a los movimientos rotacionales como a los vibracionales de las moléculas. Es en esta región donde se encuentran las bandas fundamentales correspondientes a cada uno de los enlaces presentes en las moléculas. Debido a que la región del infrarrojo medio es de mayor energía que la región del infrarrojo lejano, le permite a los espectrofotómetros de infrarrojo medio realizar análisis a distancia acoplados a fibra óptica.

1.4.3 Infrarrojo cercano

El **infrarrojo cercano** conocido como **NIR** por sus siglas en inglés, comprende desde 4000 cm^{-1} hasta los $13,000\text{ cm}^{-1}$ (**800 – 2500 nm**) y es la región más cercana a la región visible dentro del espectro de radiación electromagnética. En esta región ocurren los movimientos vibracionales de las moléculas o sobretonos correspondientes a las bandas fundamentales observadas en la región del infrarrojo medio. Como esta región es de mayor energía que la región del infrarrojo medio, permite que el instrumento sea

acoplado a una fibra óptica para realizar análisis a distancias mayores que las que se pueden realizar mediante un instrumento de infrarrojo medio sin pérdida significativa de información.



Figura 1.4 Sonda acoplada al FOSS XDS mediante fibra óptica

1.4.3.1 Principios de Infrarrojo cercano

Básicamente para que una molécula diatómica absorba radiación infrarroja se debe alcanzar exactamente la frecuencia vibracional de la molécula. Una vez se alcanza la frecuencia vibracional de la molécula debe ocurrir un cambio en el momento dipolar de la molécula para que esta banda sea activa en la región del infrarrojo y se pueda observar la señal en el espectro. Una molécula diatómica puede modelarse como un oscilador armónico en la cual dos esferas de masa m_1 y m_2 están unidas por un resorte con una constante de fuerza K .



La Ley de Hooke establece que la frecuencia vibracional de una molécula diatómica será directamente proporcional a la fortaleza del resorte (enlace) e inversamente proporcional a las masas unidas al resorte. Esto se expresa en la siguiente ecuación:

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (5)$$

donde:

ν = frecuencia vibracional de la molécula

k = constante de fuerza

μ = masa reducida de los dos átomos enlazados

Se ha observado que las moléculas diatómicas no se comportan como un oscilador armónico ideal sino más bien como un oscilador anarmónico como se ilustra en la **Figura 1.5**. Esto se debe a que existe una repulsión coulombica entre los núcleos de los átomos cuando estos se acercan ocasionando un incremento en su energía potencial, mayor que la que se puede predecir para un oscilador armónico. Por otra parte, cuando estos núcleos se alejan acercándose el nivel de disociación la energía potencial se estabiliza. Las moléculas se comportan como un oscilador armónico solamente en su nivel más bajo de energía cercano a su estado raso ($\nu=0$).

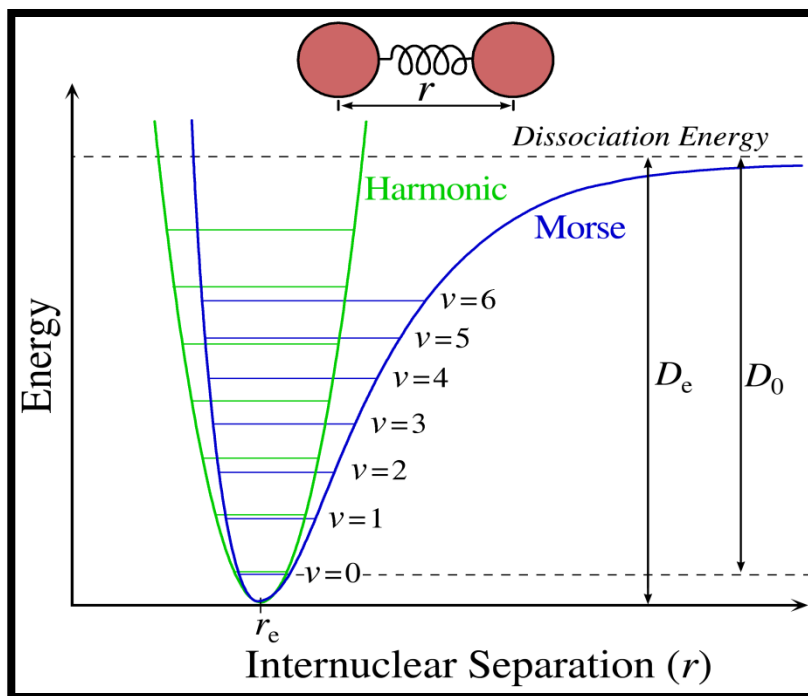


Figura 1.5 Diagrama de funciones potenciales para osciladores armónicos y anarmónicos

En el oscilador anarmónico se pueden observar las bandas fundamentales correspondientes al estado de transición ($\Delta v = \pm 1$) y los sobretonos ($\Delta v = \pm 2, \pm 3, \pm 4, \dots$). Estas transiciones correspondientes a los sobretonos son menos probables de que ocurran dando como consecuencia bandas más ensanchadas, solapadas y del orden de 10 a 100 veces más débiles que las bandas fundamentales. En **NIR** las señales que se observan son correspondientes a los sobretonos y a la combinación de las bandas vibraciones fundamentales de los grupos funcionales **-CH**, **-NH**, **-OH**, etc. También se observa que las diferencias entre los niveles de energía no son de igual magnitud como se observa en el oscilador armónico.

La espectroscopía, al igual que todo método analítico, brinda un conjunto de datos que se denomina como señal analítica o espectro. Dicha señal posee una magnitud física

matemáticamente calculable, que incorpora información química y física de la sustancia analizada. Para poder interpretar dicha información es necesario correlacionar correctamente la señal analítica con el parámetro analítico a ser medido. En algunos métodos analíticos como en el caso de los métodos cromatográficos, establecer dicha correlación se hace más simple ya que la muestra es pre-concentrada o separada de los otros componentes de la muestra haciendo que la señal obtenida sea producto directo del analito. Esto no es así para los métodos de espectroscopia infrarroja ya que la señal obtenida es producto de todos los componentes presentes en la muestra.

En la actualidad, gracias a los ordenadores computacionales, al desarrollo de instrumentos analíticos y a la aplicación de métodos quimiométricos, se puede procesar e interpretar una gran cantidad de información analítica en tiempos muy cortos. Estos métodos quimiométricos son basados en la aplicación de cálculos matemáticos, métodos estadísticos y de lógica formal para el pre-tratamiento y procesamiento de las señales analíticas [6]. De esta manera podemos extraer la máxima información útil y relevante de toda la señal analítica obtenida, permitiendo establecer los parámetros óptimos en el desarrollo de métodos analíticos [7]. Hoy día, gracias a su gran utilidad, estos métodos quimiométricos se han aplicado tanto a métodos espectroscópicos como a métodos cromatográficos.

CAPÍTULO 2

Quimiometría

En el desarrollo de este trabajo se han utilizado ciertas aplicaciones que la quimiometría brinda para resolver problemas que son comunes en el desarrollo de métodos analíticos utilizando NIR. Algunas de estas aplicaciones son:

Filtrado de las señales: mediante la aplicación de determinados métodos quimiométricos, se puede mejorar la calidad de la señal espectral obtenida, extrayendo la información útil y relevante de la que no lo es. De esta forma se puede reducir el ruido.

Métodos de reconocimiento de pautas: estos métodos quimiométricos permiten relacionar una serie de muestras y agruparlas según la similitud de sus espectros. También permiten crear nuevos grupos capaces de clasificar nuevas muestras y poder determinar si son pertenecientes o no a ese grupo.

Métodos de calibración multivariantes: La quimiometría brinda distintos métodos en los que se relaciona la señal analítica con la propiedad a determinarse. De esta forma se pueden crear curvas de calibración que sean capaces de predecir dicha propiedad en muestras desconocidas.

2.1 Pasos a seguir en la creación de un modelo de predicción

El propósito de crear un modelo analítico a partir de un conjunto de datos ya sea para un análisis cualitativo o cuantitativo de un parámetro en específico, es obtener un modelo que sea capaz de predecir este parámetro en nuevas muestras desconocidas. Para crear un modelo preciso y robusto capaz de predecir el parámetro a determinarse de un modo confiable, se debe realizar siguiendo los siguientes pasos: selección de un conjunto

de muestras de calibración, determinación del parámetro a predecir mediante un método de referencia, obtención de la señal analítica mediante la nueva técnica instrumental, cálculo del modelo, validación del modelo, aplicación del nuevo modelo analítico a muestras desconocidas, análisis de rutina y monitorización y por último la transferencia del modelo, si aplica.

2.1.1 Selección de un conjunto de muestras de calibración

Para que el modelo tenga una buena capacidad de predicción se debe seleccionar un conjunto limitado de muestras en las que se represente la variabilidad física y química que pueda encontrarse en el análisis de rutina. En el caso de la creación de un modelo multivariable creado para análisis cuantitativo, las muestras deberán ser representativas de todo el rango del parámetro a determinarse (ej: rango de concentraciones del ingrediente activo en una tableta que debe estar de un 50% a un 150% del valor aceptado). Para modelos de análisis cualitativo al igual que para modelos de análisis cuantitativo, las muestras deberán poseer toda la variabilidad que se pueda encontrar en el análisis de rutina como por ejemplo tamaño de partículas, proveedor, excipientes, nivel de pureza, entre otros.

2.1.2 Determinación del parámetro a predecir mediante un método de referencia

Para poder obtener un modelo de análisis multivariable que tenga una buena capacidad predictiva, se debe seleccionar un método de referencia que sea preciso y exacto ya que de esto dependerá directamente nuestro modelo de calibración.

2.1.3 Obtención de la señal analítica mediante la nueva técnica instrumental

En este paso, se obtienen las señales analíticas del conjunto de muestras de calibración, siguiendo el procedimiento establecido para la nueva técnica instrumental que se seleccionó. En el caso de métodos espectroscópicos, se colectan los espectros para cada una de las muestras y se almacenan en el computador para su posterior tratamiento y correlación. Es importante seguir el mismo paso en el tratamiento y colección de los espectros para minimizar las variaciones.

2.1.4 Cálculo del modelo

En espectroscopía de NIR para poder obtener un modelo analítico, se requiere del pre-tratamiento y de la aplicación de métodos quimiométricos a los espectros obtenidos para relacionar la señal obtenida con el parámetro a determinarse. Esto no es así para métodos cromatográficos en donde existe una relación lineal entre la altura o el ancho de pico con la concentración de la muestra.

Estos pre-tratamientos como la aplicación de la primera y segunda derivada o la corrección de la línea base, son capaces de reducir el ruido aumentando la razón señal a ruido. Por otra parte, mediante la aplicación de ciertos métodos quimiométricos podemos extraer la información útil del espectro de la que no lo es y optimizar los parámetros del modelo para aumentar la precisión y la exactitud de los resultados.

2.1.5 Validación del modelo

El objetivo principal de la validación de un procedimiento analítico es demostrar que el procedimiento es conveniente para ese propósito. Un grupo de expertos de la International Conference on Harmonisation (ICH por sus siglas en inglés) en acorde con las

agencias regulatorias desarrollaron una guía detallando los criterios que se deben tomar en consideración en la validación de un procedimiento analítico para que este cumpla con los requisitos mínimos establecidos por las agencias regulatorias de la Unión Europea, Japón y Estados Unidos [8,9].

En este paso se aplica el modelo de predicción a un conjunto de muestras externas (que no son parte del modelo de predicción) cuyo parámetro ya ha sido determinado mediante el método de referencia. Los resultados obtenidos se comparan estadísticamente para demostrar especificidad, linealidad, rango, exactitud, precisión, robusticidad, reproducibilidad, límite de detección y límite de cuantificación. En otras palabras, que no existe diferencia entre ambos valores y que el modelo tiene igual o mejor capacidad predictiva que el modelo de referencia.

2.1.5.1 Especificidad

La investigación de la especificidad conduce a la validación de una prueba de identificación, la investigación de impurezas y el ensayo. El procedimiento utilizado dependerá de los objetivos intencionados del procedimiento analítico. No siempre es posible el demostrar que un procedimiento analítico es totalmente específico para un analito (discriminación completa). En este caso la combinación de dos o más procedimientos analíticos es recomendada para alcanzar el nivel necesario de discriminación.

2.1.5.2 Linealidad

Esta puede ser evaluada mediante inspección visual graficando la señal en función del contenido o concentración del analito. Luego se calcula la regresión lineal del método

de cuadrados mínimos para demostrar linealidad. Se recomienda un mínimo de 5 concentraciones.

2.1.5.3 Rango

El rango específico es derivado de los estudios de la linealidad y depende de la intención de la aplicación del procedimiento. El rango debe establecer que el procedimiento analítico provee un grado aceptable de linealidad, exactitud y precisión cuando se aplica a muestras que contienen cantidades de analito dentro y en los extremos del rango del procedimiento analítico. Para un ensayo de una droga o de un producto terminado la concentración determinada mediante el procedimiento analítico debe estar dentro del 80-120% de la concentración establecida para dicho producto.

2.1.5.4 Exactitud

La exactitud debe ser establecida a través del rango específico del procedimiento analítico. Existen varios métodos para establecer la exactitud:

1. Aplicación del procedimiento analítico a un analito de concentración conocida.
2. Comparación de los resultados obtenidos mediante el procedimiento analítico con los obtenidos de un método de referencia ya establecido.

La exactitud puede ser determinada una vez que la precisión, linealidad y especificidad hayan sido establecidas. Esta se prueba con un mínimo de 9 determinaciones (3 replicas a 3 concentraciones diferentes).

2.1.5.5 Precisión

La precisión debe determinarse utilizando un mínimo de 9 determinaciones a un rango específico del procedimiento. Para demostrar la precisión se determina la desviación estándar, desviación estándar relativa (RSD) y el intervalo de confianza.

2.1.5.6 Limite de detección

El límite de detección (LD) puede ser determinado mediante la desviación estándar:

$$LD = \frac{3.3S_b}{M} \quad (6)$$

Donde:

S_b = desviación estándar del blanco

M = pendiente de la curva de calibración

2.1.5.7 Limite de cuantificación

El límite de cuantificación (LQ) puede ser determinado al igual que el límite de detección mediante la desviación estándar.

$$LQ = \frac{10S_b}{M} \quad (7)$$

Donde:

S_b = desviación estándar del blanco

M = pendiente de la curva de calibración

2.1.6 Aplicación del nuevo modelo analítico a muestras desconocidas

Una vez se ha demostrado y se ha validado la capacidad de predicción del modelo, se aplica a muestras desconocidas tomándose como aceptables los valores obtenidos.

2.1.7 Análisis de rutina y monitorización

En esta etapa, se continúa con la aplicación del modelo a nuevas muestras. Algunas de estas muestras deberán ser analizadas mediante el método de referencia para verificar si el modelo continúa dando resultados confiables. De igual forma que se verifica el modelo, es conveniente la inspección y el mantenimiento del equipo para garantizar el buen funcionamiento del mismo.

2.1.8 Transferencia del modelo

En algunos casos, es necesario transferir el modelo de un instrumento a otro para realizar predicciones en muestras desconocidas mediante análisis de rutina. En la mayoría de los casos, hay que realizar una serie de cambios en el modelo para que éste brinde resultados confiables. Estos resultados deberán ser verificados estadísticamente para asegurar que no existe variabilidad en los resultados obtenidos.

2.2 Pre-tratamientos Espectrales

En un espectro de infrarrojo se puede encontrar información útil relacionada a nuestra muestra en conjunto a señales no deseadas. Este tipo de señales no deseadas se denominan como “ruido”. El ruido puede deberse a varios factores tales como variaciones en temperatura, humedad, cambios en voltaje o corriente, fenómenos atmosféricos, variación en la composición de la muestra, tamaño de partícula, etc. [5]. Mediante la aplicación de ciertos pre-tratamientos espectrales, se puede reducir o eliminar el ruido minimizando variaciones no relacionadas al parámetro a determinarse.

A continuación, se discutirán algunos pre-tratamientos espectrales que son los más utilizados en análisis espectroscópicos [10].

2.2.1 Promediado de espectros

Debido a que las señales no deseadas que no tienen relación con la muestra (denominadas ruido) son de naturaleza aleatoria, promediar un número determinado de espectros de una misma muestra reduce la presencia de las mismas. Esto tiene como consecuencia un incremento en la razón señal / ruido (S/N por siglas en inglés).

2.2.2 Suavizado espectral

En algunas ocasiones en que la razón señal / ruido es demasiado pequeña como para ser incrementada mediante el promediado de espectros, se aplican métodos de suavizado espectral que consisten en la aplicación de algoritmos matemáticos para eliminar el ruido aleatorio de alta frecuencia.

Uno de los métodos de suavizado espectral más comúnmente utilizados son los que se basan en filtrados de Savitzky-Golay.

2.2.3 Corrección de línea base

Este tipo de tratamiento corrige ciertas tendencias de la línea base que aportan ruido a la señal analítica. Una forma de corrección de línea base muy utilizada en NIR se denomina como De-Trending en la cual se ajusta el espectro original a una función cuadrática. Luego, esta función cuadrática se le resta al espectro original eliminando la curvatura ascendente, a medida que disminuye la frecuencia. Este tipo de tratamiento se aplica para cada espectro por separado y no depende de un espectro de referencia.

2.2.4 Derivación

Este tipo de pre-tratamiento es de los más comúnmente utilizados en NIR para minimizar los efectos de las desviaciones de la línea base ocasionada por los efectos de la dispersión. Mediante la aplicación de la primera y segunda derivada se eliminan los problemas de desplazamiento de la línea base y el ensanchamiento de las bandas aumentando la resolución de los espectros. En la segunda derivada, a diferencia de la primera derivada, corrige el efecto ascendente de la pendiente y se observan los máximos del espectro como mínimos. Según se utilizan derivadas superiores, se aumenta el ruido en el espectro, por tal razón, no se sugiere la utilización de derivadas superiores a la segunda derivada.

2.2.5 Corrección Multiplicativa de la Dispersión

Siempre que se mide reflectancia en NIR la presencia de diferentes tamaños de partícula en las muestras puede ocasionar un desplazamiento en la señal espectral debido a efectos de dispersión. Estos efectos de dispersión son mucho más notables en mezclas, suspensiones, pastas y gránulos con grandes tamaños de partículas. La Corrección Multiplicativa de la Dispersión denominada en inglés como Multiplicative Scatter Correction (MSC) fue propuesta por Geladi et al. [11]. Este tipo de corrección le aplica a cada espectro original los parámetros de la recta obtenida por mínimos cuadrados, representando los valores de absorbencia de un intervalo de longitudes de onda en la que nuestro analito no absorbe ante los valores de absorbencia de un espectro de referencia que es normalmente el valor promedio del conjunto de las muestras a tratar. En este tipo de corrección se tiene como desventaja que si alguno de los espectros originales es

modificado, el espectro de referencia cambia. Esto significa que los valores de la recta obtenida por mínimos cuadrados deben recalcularse nuevamente.

2.2.6 Variable Normal Estándar

Este otro tipo de pre-tratamiento también conocido como Standard Normal Variate (SNV) al igual que MSC es utilizado para eliminar los efectos de la dispersión ocasionados por el tamaño de partícula [12]. A diferencia de MSC mediante la corrección por SNV no se requiere de un espectro de referencia ya que la corrección consiste en centrar cada espectro, restando el valor promedio de absorbancia del espectro a cada uno de los valores de absorbancia a cada longitud de onda, dividiendo el resultado entre la desviación estándar del espectro. Se han realizado estudios en donde se demuestra que existe una relación lineal entre MSC y SNV [13].

2.3 Reducción de Variables

En quimiometría se han desarrollado métodos capaces de reducir el gran volumen de información proveniente en un espectro de infrarrojo a un número menor de variables sin la pérdida significativa de datos relevantes. Uno de los métodos más utilizados para este propósito es el análisis componentes principales o Principal Component Analysis (PCA) [7,14].

2.3.1 Pre-tratamiento de Datos

Comúnmente los datos son tratados antes de aplicar cualquier método para la reducción de variables. La razón es evitar o minimizar posibles efectos que puedan afectar una vez se aplique el proceso de reducción. Tres ejemplos de pre-tratamientos de variables son: el centrado promedio, escalado discrepante y el auto-escalado [7,15].

Para una serie de datos en una matriz X , donde cada fila es representativa de cada muestra y cada columna corresponde a cada longitud de onda (variable) el centrado promedio, escalado discrepante y el auto-escalado se determinarán de la siguiente forma:

centrado promedio: se obtiene calculando el valor promedio de cada variable (\bar{X}_k) del conjunto de calibración para cada columna de la matriz y se le resta a cada elemento de la columna (X_{jk}).

$$X_{jk}^{centrado} = (X_{jk} - \bar{X}_k) \quad (8)$$

escalado discrepante: se obtiene dividiendo el valor de cada variable (X_{jk}) y se divide entre la desviación estándar (S_k) del conjunto de calibración para cada columna.

$$X_{jk}^{escalado-disc.} = (X_{jk} / S_k) \quad (9)$$

auto-escalado: es la aplicación del centrado promedio en conjunto con el escalado discrepante. Dicho de otra manera, se divide el centrado promedio para cada elemento del conjunto de calibración en cada columna ($X_{jk}^{centrado}$) entre la desviación estándar correspondiente para cada columna (S_k).

$$X_{jk}^{auto-escalado} = \frac{(X_{jk} - \bar{X}_k)}{S_k} \quad (10)$$

2.3.2 Análisis de Componentes Principales

Si se tiene un espectro el cual tiene un numero w de longitudes de onda (variables), entonces este se puede describir como un vector de w coeficientes. Si creamos un espacio en donde cada longitud de onda representa una dimensión en el espacio, entonces

tendremos un espacio de **w** dimensiones, en donde cada muestra (**s**) estará representada por un punto en el espacio. Entonces, si se tiene **s** número de muestras, se tendrán **s** números de puntos en un espacio de **w** dimensiones. Todos los puntos que tengan algo en común, aparecerán agrupados en una misma región del espacio y los que no tengan nada en común, aparecerán separados en algún otro lugar del espacio. Estos grupos que aparecen juntos en la misma región del espacio se les denominan **agregados** o **“clusters”**.

Un Análisis de Componentes Principales (**PCA** por sus siglas en inglés) reduce la dimensionalidad de este espacio, hallando las direcciones que explican la máxima variabilidad de las muestras y utilizarlas como nuevos ejes de coordenadas a las cuales se les denomina como componentes principales (**PC** por sus siglas en inglés). Esto quiere decir, que un espacio de **w** dimensiones quedará reducido a un espacio de **a** dimensiones sin alterarse de ningún modo, la información relevante. Visto geométricamente, un **PCA** es un nuevo sistema de coordenadas, que utiliza menos ejes que el sistema de coordenadas original. Las muestras se representarán como puntos dentro de este nuevo sistema de coordenadas. El primer componente principal será una combinación lineal de las **w** variables que explican la máxima variabilidad de las muestras y el segundo componente principal será ortogonal al primero, explicando la máxima variabilidad luego de haberle restado las explicadas por el primer componente principal. Matemáticamente, la dirección de los ejes de estos nuevos sistemas de coordenadas se puede definir como **“loadings, eigenvector, factores o componente principal”** que son el coseno del ángulo de estos nuevos ejes con respecto a los originales. Y los **“score”** representan las proyecciones o coordenadas de cada uno de los puntos pertenecientes a cada una de las muestras dentro de este nuevo sistema de coordenadas.

Una matriz de **X** datos espectrales, se puede descomponer numéricamente en el producto de dos matrices: una de **score T** y otra de **loadings P**, quedando un residual **E**. Esta relación se puede expresar mediante la siguiente ecuación:

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP}^T + \mathbf{E} \quad (11)$$

PCA permite determinar la matriz de **loading P** realizando un ajuste matemático por mínimos cuadrados a **X** en la matriz de **score T** y de igual forma se puede encontrar la propiedad de la matriz de score **T** realizándole el ajuste matemático a **X** en la matriz de **loading P**. Mediante la aplicación de un algoritmo conocido como NIPALS (Nonlinear Iterative Partial Least Square) o Singular Value Descomposition (**SVD**) [14].

Cada componente principal posee información de distinta relevancia, siendo la información del primer PC la de mayor importancia que la de los PC's subsiguientes. La matriz **X** posee un numero **w** de vectores y cada vector está compuesto por loadings y scores. Como PCA reduce el espacio de **w** dimensiones, a uno de **a** dimensiones, la matriz **X** se puede expresar mediante la siguiente ecuación:

$$\mathbf{X} = \mathbf{T}_1\mathbf{P}_1^t + \mathbf{T}_2\mathbf{P}_2^t + \dots + \mathbf{T}_a\mathbf{P}_a^t + \mathbf{E} \quad (12)$$

De esta forma la matriz **X**, descrita inicialmente por variables correlacionadas, quedará definida por un nuevo conjunto de variables (PC's) no correlacionadas entre sí en un nuevo sistema de coordenadas de ejes ortogonales.

2.4 Aplicación Quimiométrica en Análisis Cualitativo

La quimiometría brinda ciertas herramientas que se aplican en la clasificación de una sustancia a partir de la medición de ciertas características o magnitudes físicas

previamente determinadas. Estas herramientas o técnicas se denominan como Métodos de Reconocimiento de Pautas o *Pattern Recognition Methods (PRM)*.

2.4.1 Métodos de Reconocimiento de Pautas

Mediante los métodos de reconocimiento de pautas se clasifica una sustancia como perteneciente o no a un grupo basándose en su similitud, parámetro que puede ser obtenido mediante el procesamiento de datos obtenidos de la señal analítica. La similitud puede ser expresada mediante medidas de correlación o distancias.

Medidas de correlación: se mide calculando el coeficiente de correlación entre dos muestras. El valor para este coeficiente oscila de -1 a 1 en donde 1 indica similitud.

$$C_{mn} = \frac{\sum_{i=1}^j (x_{in} - \bar{x}_m)(x_{in} - \bar{x}_n)}{\sqrt{\sum_{i=1}^j (x_{in} - \bar{x}_m)^2 \sum_{i=j}^j (x_{in} - \bar{x}_n)^2}} \quad (13)$$

Medidas de Distancias: la similitud es basada en la medida de la distancia entre una muestra y el centroide de una clase. Existen varios tipos de distancias. Dos ejemplos de diferentes tipos de distancia que se discuten en la referencia [16] son; la distancia Euclídea y la distancia Mahalanobis. La medida de la distancia **D** entre una muestra **x_i** y un centroide de una clase **μ** se calcula:

$$D^2 = (x_i - \mu)C^{-1}(x_i - \mu) \quad (14)$$

siendo **C** la matriz de dispersión de los datos alrededor del centroide. Si la matriz de dispersión **C** es igual a 1 la distancia se conocerá como distancia Euclídea (**ED**). Por otra

parte si la matriz es igual a la matriz de varianza-covarianza se conocerá como distancia de Mahalanobis.

Los métodos de reconocimiento de pautas se clasifican en métodos supervisados y no supervisados [17]:

Métodos supervisados: Estos métodos de clasificación utilizan un conjunto de muestras de calibración cuya clasificación o agrupación le es conocida para la identificación de muestras desconocidas. Este método es muy utilizado en las industrias farmacéuticas para la identificación de materiales de partida “raw materials”.

Métodos no supervisados: En este tipo de método no se tiene un conjunto de calibración de clasificación conocida. Se trata de descubrir agrupaciones de pautas en el espacio de N-dimensiones sin saber a qué clase pertenece cada muestra.

2.4.2 Bibliotecas de Identificación Espectral

Entre las aplicaciones de los Métodos de Reconocimiento de Pautas uno de los de mayor utilidad es la creación de bibliotecas espectrales. Una vez creadas estas bibliotecas, pueden ser utilizadas para la posterior identificación de muestras desconocidas clasificándolas como pertenecientes a algún grupo dentro de la biblioteca o a ninguna de ellas. Esta es una herramienta muy útil para la identificación de muestras desconocidas de una forma fácil, rápida y confiable.

2.5 Aplicación Quimiométrica en Análisis Cuantitativo

Las técnicas de cuantificación utilizadas en espectroscopia son basadas en métodos de calibración multivariable. Esto es debido a la complejidad y al gran número de variables o señales que brinda un espectro de infrarrojo cercano [18].

2.5.1 Regresión Lineal Múltiple (MLR, “Multiple Linear Regression”)

En el método de regresión lineal múltiple se determina una relación lineal entre la señal y la concentración de cada componente de una mezcla mediante la aplicación de mínimos cuadrados. Este tipo de relación puede ser clásica o inversa.

2.5.1.1 Regresión Lineal Clásica (CLS)

En este tipo de regresión se establece la ley de Beer-Lambert (**ver sección 1.3.3.1**) donde existe una relación lineal a bajas concentraciones entre la concentración de un componente y la absorbancia a una sola longitud de onda.

$$\mathbf{A} = \mathbf{K}\mathbf{C} \quad (15)$$

Para una muestra compuesta de **c** número de componentes a **w** número de longitudes de onda, la señal analítica **A** es igual a la concentración **C** de cada componente multiplicada por un coeficiente de proporcionalidad **K** expresada de la siguiente forma:

$$\begin{aligned} A_1 &= K_{11}C_1 + K_{12}C_2 + \dots + K_{1c}C_c \\ A_2 &= K_{21}C_1 + K_{22}C_2 + \dots + K_{2c}C_c \\ A_3 &= K_{31}C_1 + K_{32}C_3 + \dots + K_{3c}C_c \\ &\dots \quad \dots \quad \dots \quad \dots \quad \dots \\ A_w &= K_{w1}C_1 + K_{w2}C_2 + \dots + K_{wc}C_c \end{aligned} \quad (16)$$

2.5.1.1.1 Creación y multiplicación de matrices en CLS

Como se puede observar en la ecuación (16) la absorbancia total a **w** longitud de onda es simplemente la sumatoria de todas las absorbancias para cada uno de los componentes de la mezcla a esa longitud de onda.

Es por tal razón que podemos utilizar un sistema de multiplicación de matrices para definir la ecuación (14).

$$\mathbf{A} = \mathbf{K}\mathbf{C} \quad (17)$$

donde:

\mathbf{A} = es la matriz de absorbancia de la forma:

$$\begin{matrix} A_{11} & A_{12} & A_{13} & \dots & A_{1s} \\ A_{21} & A_{22} & A_{23} & \dots & A_{2s} \\ A_{31} & A_{32} & A_{33} & \dots & A_{3s} \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ A_{w1} & A_{w2} & A_{w3} & \dots & A_{ws} \end{matrix} \quad (18)$$

donde:

A_{ws} es la absorbancia a la longitud de onda w para la muestra s .

\mathbf{K} = es la matriz de coeficiente de absortividad molar de la forma:

$$\begin{matrix} K_{11} & K_{12} & K_{13} & \dots & K_{1c} \\ K_{21} & K_{22} & K_{23} & \dots & K_{2c} \\ K_{31} & K_{32} & K_{33} & \dots & K_{3c} \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ K_{w1} & K_{w2} & K_{w3} & \dots & K_{wc} \end{matrix} \quad (19)$$

donde K_{wc} es el coeficiente de absortividad molar a la longitud de onda w para el componente c .

\mathbf{C} = es la matriz de concentraciones de la forma:

$$\begin{matrix} C_{11} & C_{12} & C_{13} & \dots & C_{1s} \\ C_{21} & C_{22} & C_{23} & \dots & C_{2s} \\ C_{31} & C_{32} & C_{33} & \dots & C_{3s} \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ C_{c1} & C_{c2} & C_{c3} & \dots & C_{cs} \end{matrix} \quad (20)$$

donde C_{cs} es la concentración del componente c para la muestra s .

Así que si se obtienen cuatro espectros a 7 longitudes de onda de cuatro muestras que contiene una mezcla de dos componentes se puede representar la ecuación (17) de la siguiente forma:

$$\begin{array}{ccc}
 \begin{array}{c} \mathbf{[A]} \\ YYY Y \\ YYY Y \\ YYY Y \\ Y \mathbf{a} Y Y \\ YYY Y \\ YYY Y \\ YYY Y \end{array} & = & \begin{array}{c} \mathbf{[K]} \\ Y Y \\ Y Y \\ Y Y \\ \mathbf{r} \mathbf{z} \\ Y Y \\ Y Y \\ Y Y \end{array} \times \begin{array}{c} \mathbf{[C]} \\ Y \mathbf{n} Y Y \\ Y \mathbf{m} Y Y \\ \\ \\ \\ \\ \end{array} \quad (21)
 \end{array}$$

Como se puede observar en la ecuación (21) el valor de la absorbancia para el objeto **a** de la cuarta línea de la segunda columna de la matriz **A**, está dada por la multiplicación del vector de la cuarta línea de **K** con la segunda columna de **C** de la siguiente forma:

$$\mathbf{a} = (\mathbf{r} \times \mathbf{n}) + (\mathbf{z} \times \mathbf{m}) \quad (22)$$

Un dato muy importante que se debe tener en cuenta, es que para poder multiplicar dos matrices, el número de columnas de la primera matriz debe ser igual al número de líneas de la segunda y el producto de estas tendrá tantas líneas como tenga la primera y el número de columnas de la segunda matriz.

2.5.1.1.2 Creación de la Calibración en CLS

Cuando se crea una calibración utilizando una regresión lineal clásica (**CLS**), primero se calcula la matriz de **K_{cal}** correlacionando la matriz de **C** con la de **A** obtenida de

los espectros de las muestras de calibración. Luego para determinar la concentración de las muestras desconocidas se correlaciona la matriz de $\mathbf{K}_{cal.}$ obtenida de los espectros de las muestras de calibración con la matriz de \mathbf{A} obtenida de la muestra desconocida.

Para obtener $\mathbf{K}_{cal.}$ se multiplica cada lado de la ecuación (17) por \mathbf{C}^T , la matriz transpuesta de \mathbf{C} .

$$\mathbf{AC}^T = \mathbf{KCC}^T \quad (23)$$

Luego se despeja para \mathbf{K} multiplicando cada lado por $[\mathbf{CC}^T]^{-1}$, la matriz pseudo inversa de \mathbf{C} .

$$\mathbf{AC}^T[\mathbf{CC}^T]^{-1} = \mathbf{K} = \mathbf{K}_{cal.} \quad (24)$$

Para que una matriz \mathbf{C} tenga matriz pseudo inversa debe ser una matriz cuadrada, es decir que deberá tener al menos tantas líneas como columnas. Por tal razón en CLS se debe tener al menos el mismo número de muestras como el número de componentes que posea la muestra. Otro dato importante es que en CLS se debe conocer la concentración de cada uno de los componentes presentes en las muestras.

2.5.1.1.3 Predicción de muestras desconocidas en CLS

Una vez determinada la matriz $\mathbf{K}_{cal.}$, se utiliza para determinar la concentración de muestras desconocidas a partir de sus espectros. Primero se reemplaza la nueva matriz $\mathbf{K}_{cal.}$ en la ecuación (15) utilizando la matriz de absorbancias ($\mathbf{A}_{desc.}$) obtenida del espectro de la muestra desconocida.

$$\mathbf{A}_{desc.} = \mathbf{K}_{cal.} \mathbf{C}_{desc.} \quad (25)$$

Luego se multiplica ambos lados por la matriz transpuesta de \mathbf{K}_{cal} (\mathbf{K}^T) y se despeja la ecuación para $\mathbf{C}_{desc.}$ como se realizó en la sección 2.5.1.1.2 se obtiene:

$$[\mathbf{K}^T \mathbf{K}]^{-1} \mathbf{K}^T \mathbf{A}_{desc.} = \mathbf{C}_{desc.} \quad (26)$$

2.5.1.2 Regresión Lineal Inversa (ILS)

En la regresión lineal inversa se establece una relación inversa a la ley de Beer-Lambert. En algunas ocasiones a la regresión lineal inversa se le conoce como calibración de **matriz P**.

$$\mathbf{C} = \mathbf{P} \mathbf{A} \quad (27)$$

Para una mezcla de \mathbf{c} número de componentes a \mathbf{w} número de longitudes de onda, la concentración para cada componente \mathbf{c} es igual a la sumatoria de todas las absorbancias a cada longitud de onda \mathbf{w} multiplicada por su correspondiente coeficiente de proporcionalidad \mathbf{P} expresada de la siguiente forma:

$$\begin{aligned} \mathbf{C}_1 &= \mathbf{P}_{11}\mathbf{A}_1 + \mathbf{P}_{12}\mathbf{A}_2 + \dots + \mathbf{P}_{1w}\mathbf{A}_w \\ \mathbf{C}_2 &= \mathbf{P}_{21}\mathbf{A}_1 + \mathbf{P}_{22}\mathbf{A}_2 + \dots + \mathbf{P}_{2w}\mathbf{A}_w \\ \mathbf{C}_3 &= \mathbf{P}_{31}\mathbf{A}_1 + \mathbf{P}_{32}\mathbf{A}_3 + \dots + \mathbf{P}_{3w}\mathbf{A}_w \\ \dots & \quad \dots \quad \dots \quad \dots \quad \dots \\ \mathbf{C}_c &= \mathbf{P}_{c1}\mathbf{A}_1 + \mathbf{P}_{c2}\mathbf{A}_2 + \dots + \mathbf{P}_{cw}\mathbf{A}_w \end{aligned} \quad (28)$$

2.5.1.2.1 Creación y multiplicación de matrices en ILS

Como se puede observar en la ecuación (28) de igual forma que en CLS, se puede utilizar un sistema de multiplicación de matrices para definir la ecuación (27).

$$\mathbf{C} = \mathbf{P} \mathbf{A} \quad (29)$$

donde:

\mathbf{C} = es la matriz de concentraciones de la forma:

$$\begin{array}{cccccc} \mathbf{C}_{11} & \mathbf{C}_{12} & \mathbf{C}_{13} & \dots & \mathbf{C}_{1s} \\ \mathbf{C}_{21} & \mathbf{C}_{22} & \mathbf{C}_{23} & \dots & \mathbf{C}_{2s} \\ \mathbf{C}_{31} & \mathbf{C}_{32} & \mathbf{C}_{33} & \dots & \mathbf{C}_{3s} \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ \mathbf{C}_{c1} & \mathbf{C}_{c2} & \mathbf{C}_{c3} & \dots & \mathbf{C}_{cs} \end{array} \quad (30)$$

donde \mathbf{C}_{cs} es la concentración del componente \mathbf{c} para la muestra \mathbf{s} .

\mathbf{P} = es la matriz de coeficiente de absortividad molar de la forma:

$$\begin{array}{cccccc} \mathbf{P}_{11} & \mathbf{P}_{12} & \mathbf{P}_{13} & \dots & \mathbf{P}_{1w} \\ \mathbf{P}_{21} & \mathbf{P}_{22} & \mathbf{P}_{23} & \dots & \mathbf{P}_{2w} \\ \mathbf{P}_{31} & \mathbf{P}_{32} & \mathbf{P}_{33} & \dots & \mathbf{P}_{3w} \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ \mathbf{P}_{c1} & \mathbf{P}_{c2} & \mathbf{P}_{c3} & \dots & \mathbf{P}_{cw} \end{array} \quad (31)$$

donde \mathbf{P}_{cw} es el coeficiente de absortividad molar para el componente \mathbf{c} a una longitud de onda \mathbf{w} .

\mathbf{A} = es la matriz de absorbancia de la forma:

$$\begin{array}{cccccc} \mathbf{A}_{11} & \mathbf{A}_{12} & \mathbf{A}_{13} & \dots & \mathbf{A}_{1s} \\ \mathbf{A}_{21} & \mathbf{A}_{22} & \mathbf{A}_{23} & \dots & \mathbf{A}_{2s} \\ \mathbf{A}_{31} & \mathbf{A}_{32} & \mathbf{A}_{33} & \dots & \mathbf{A}_{3s} \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ \mathbf{A}_{w1} & \mathbf{A}_{w2} & \mathbf{A}_{w3} & \dots & \mathbf{A}_{ws} \end{array} \quad (32)$$

donde A_{ws} es la absorbancia a la longitud de onda w para la muestra s .

2.5.1.2.2 Creación de la Calibración en ILS

Cuando se crea una calibración utilizando **ILS**, primero se calcula la matriz de P_{cal} correlacionando la matriz de C con la de A obtenida de los espectros de las muestras de calibración. Luego para determinar la concentración de las muestras desconocidas se correlaciona la matriz de P_{cal} , obtenida de los espectros de las muestras de calibración con la matriz de A obtenida de la muestra desconocida.

Para obtener P_{cal} , se multiplica cada lado de la ecuación (17) por A^T , la matriz transpuesta de A .

$$CA^T = PAA^T \quad (33)$$

Luego se despeja para P multiplicando cada lado por $[AA^T]^{-1}$, la matriz pseudo inversa de A .

$$CA^T[AA^T]^{-1} = P_{cal} \quad (34)$$

Nuevamente para que una matriz A tenga matriz pseudo inversa debe ser una matriz cuadrada, es decir que deberá tener al menos tantas líneas como columnas. Es por esta razón que en ILS debemos tener al menos el mismo número de muestras que variables “longitudes de onda”.

2.5.1.2.3 Predicción de muestras desconocidas en ILS

Una vez determinada la matriz P_{cal} , esta se utiliza para determinar la concentración de muestras desconocidas a partir de sus espectros. Lo primero que se hace es reemplazar la nueva matriz P_{cal} en la ecuación (29), luego utilizando la matriz de

absorbancias ($A_{desc.}$) obtenida del espectro de la muestra desconocida se determina la concentración del desconocido.

$$C_{desc.} = P_{cal} A_{desc.} \quad (35)$$

2.5.2 Métodos de calibración basados en reducción de variables

En los métodos basados en la reducción de variables se utiliza un número menor de variables a la contenida en los espectros originales. Por lo que la calibración no se realiza sobre los datos originales, sino sobre este nuevo conjunto de variables, simplificando el modelo y la interpretación de los resultados.

De la misma forma que en PCA, la reducción de variables se realiza de modo que no se pierda la información relevante contenida en el número de variables original (ver sección 2.3.2).

2.5.2.1 Regresión de Componentes Principales

La Regresión de Componentes Principales (PCR, “*Principal Component Regression*”) es la creación de una regresión lineal inversa (ILS) utilizando los scores obtenidos de un Análisis de Componentes Principales (PCA, “*Principal Component Analysis*”) sobre los datos originales.

PCR tiene la ventaja sobre CLS e ILS ya que al reducir el número de variables se elimina el ruido y se minimizan los problemas de colinealidad (diferentes variables independientes aportan la misma información ya que están altamente correlacionadas), asociados a un número grande de variables. En PCR se tiene una buena capacidad predictiva gracias a que los scores tienen la misma información relevante contenida en los datos originales.

2.5.2.1.1 Creación de la Calibración en PCR

La calibración en PCR se realiza exactamente igual que en ILS (ver sec. 2.5.1.2.2), a diferencia de que en vez de realizarse utilizando los valores de absorbencia expresados en el sistema de coordenadas espectrales originales, se utilizan los mismos valores de absorbencia expresados en el nuevo sistema de coordenadas (PC's) retenidos (ver sec. 2.3.2). Este nuevo sistema de coordenadas no es otra cosa que las proyecciones de la data espectral original en unos vectores conocidos como (basis vectors) o componente principal (PC). Las nuevas proyecciones se calculan de la siguiente forma:

$$\mathbf{A}_{\text{proj.}} = \mathbf{V}_c^T \mathbf{A} \quad (36)$$

donde:

$\mathbf{A}_{\text{proj.}}$ = matriz que contiene las nuevas coordenadas o proyecciones

\mathbf{V}_c = a la matriz que contiene los basis vectors, tiene tantas líneas como longitudes de onda y tantas columnas como PC's, eigenvectors o factores retenidos.

\mathbf{A} = es la matriz de absorbencias original, tiene tantas líneas como longitudes de onda y tantas columnas como número de muestras.

Sustituyendo estas nuevas proyecciones por la matriz de \mathbf{A} en la ecuación (29) se obtiene:

$$\mathbf{C} = \mathbf{F} \mathbf{A}_{\text{proj.}} \quad (37)$$

Se utilizó la letra \mathbf{F} para diferenciarla de la matriz \mathbf{P} de ILS. Una vez sustituida las proyecciones en la ecuación se resuelve exactamente igual que en ILS. Primero se calcula la matriz de $\mathbf{F}_{\text{cal.}}$ correlacionando la matriz de \mathbf{C} con la de $\mathbf{A}_{\text{proj.}}$ obtenida de los espectros de las muestras de calibración. Luego para determinar la concentración de las muestras

desconocidas se correlaciona la matriz de $F_{cal.}$ obtenida de los espectros de las muestras de calibración con la matriz de A obtenida de la muestra desconocida.

Para obtener F se multiplica cada lado de la ecuación (37) por $A_{proj.}^T$, la matriz transpuesta de $A_{proj.}$.

$$CA_{proj.}^T = FA_{proj.}A_{proj.}^T \quad (38)$$

Luego se despeja para F multiplicando cada lado por $[A_{proj.} A_{proj.}^T]^{-1}$, la matriz pseudo inversa de $A_{proj.}$.

$$CA_{proj.}^T [A_{proj.} A_{proj.}^T]^{-1} = F \quad (39)$$

2.5.2.1.2 Predicción de muestras desconocidas en PCR

Una vez determinada la matriz F , se utiliza para determinar la concentración de muestras desconocidas a partir de sus espectros. Primero se sustituye la expresión $A_{proj.}$ de la ecuación (36) en la ecuación (37) utilizando la nueva matriz F calculada de las muestras de calibración. Luego utilizando la matriz de absorvancias ($A_{desc.}$) obtenida del espectro de la muestra desconocida se determina la concentración.

$$C_{desc.} = F V_c^T A_{desc.} \quad (40)$$

Como se puede calcular las cantidades tanto de V_c como de A en el momento de la calibración se puede escribir la ecuación (39) de la siguiente forma:

$$C_{desc.} = F_{cal.} A_{desc.} \quad (41)$$

La matriz de calibración $F_{cal.}$ tendrá la misma forma o dimensiones que la matriz $K_{cal.}$ en **CLS**. Es decir que tendrá tantas líneas como número de componentes y tantas columnas como longitudes de onda (F_{cw}).

2.5.2.2 Regresión de Cuadrados Mínimos Parciales (PLS)

PLS, al igual que PCR, encuentra un nuevo sistema de coordenadas espectrales para extraer la información útil y relevante de la que no lo es, habiendo eliminando el ruido. La diferencia es que PLS utiliza una estrategia diferente que PCR para establecer este nuevo sistema de coordenadas, encontrando los factores (eigenvector) tanto para los datos espectrales (matriz X) como para los datos de concentración (matriz Y). Esto elimina el ruido en ambos set de datos brindándole a PLS una gran ventaja sobre PCR, ya que en PCR se toman los valores de concentración como valores reales libres de ruido teniendo mayores efectos de colinealidad que PLS. Otra cosa que hace PLS es que una vez establece los eigenvectors para las proyecciones espectrales correspondientes a los eigenvectors de las proyecciones de concentración, este puede rotarlos para fijarlos y hallar una mejor correlación entre ellos. Esta correlación se expresa en la siguiente ecuación:

$$Y_f = B_f X_f \quad (42)$$

donde:

Y_f = proyección de un solo dato de concentración dentro del factor (**f**) de concentración.

$$Y_f = U_f Q_f^t + E \quad (43)$$

U_f = matriz de scores
 Q_f = matriz de loadings
 E = matriz de residuales

X_f = proyección del correspondiente dato espectral dentro del factor (**f**) espectral.

$$X_f = T_f P_f^t + F \quad (44)$$

T_f = matriz de scores
 P_f = matriz de loadings
 F = matriz de residuales

B_f = a la constante de proporcionalidad entre el par de factores (**f**) de concentración y el espectral.

Si se tiene un conjunto de **S** muestras, **F** factores, **W** longitudes de onda y **C** componentes o especies absorbentes, las dimensiones de las matrices en las ecuaciones **43** y **44** serán las siguientes: **T** y **U** (**S** x **F**), **P^t** (**F** x **W**) y **Q^t** (**F** x **C**). Debido a que los eigenvectors (loadings) son rotados para hallar la máxima capacidad predictiva para la matriz **Y**, estos no tendrán la misma dirección que en PCA.

2.5.2.3 Diferencias entre PLS y PCR

Básicamente PLS se realiza siguiendo los mismos pasos que en PCR excepto que:

1. La matriz de absorbencia y de concentración en PCR están orientadas del modo de columna (**A_{WS}**, **C_{CS}**) a diferencia de PLS que están orientadas del modo de líneas (**A_{SW}**, **C_{SC}**).
2. En adición de un sistema de ejes de coordenadas para los datos espectrales (matriz-X), se establece un sistema de ejes de coordenadas para los datos de concentración (matriz-Y).
3. Además de expresar la data espectral como proyecciones dentro de los factores espectrales, de igual forma se expresa la data de concentración dentro de los factores de concentración.
4. Una vez establecidos los factores espectrales con sus respectivos factores de concentración, estos se rotan para encontrar una mejor relación lineal entre las proyecciones espectrales dentro de los factores espectrales con sus correspondientes proyecciones de concentración dentro de los factores de

concentración. Luego se utilizan estas proyecciones para calcular los coeficientes de la curva de calibración rango por rango (factor por factor).

2.5.3 Evaluación de la capacidad predictiva del método

La función de todo método de calibración es, predecir en futuras muestras la propiedad para la cual fue creada, de modo que el valor obtenido difiera lo menos posible del valor real. Es por esta razón, que es de suma importancia evaluar la capacidad predictiva del método creado, utilizando muestra externas que no formaron parte de la creación del modelo de calibración. Algunos de los criterios que se utilizan para realizar esta evaluación lo son el Error Absoluto, Bias, PRESS (Predicted Residual Error Sum of Squares), Varianza de Predicción, SEP (Standard Error of Prediction), MSEP (Mean Squared Error of Prediction), RMSEP (Root Mean Standard Error of Prediction), MSEC (Mean Squared Error of Calibration) y RMSEC (Root Mean Standard Error of Calibration).

2.5.3.1 Error Absoluto

Es el resultado obtenido, del valor predicho (\bar{y}), menos el valor real (y), para esa misma muestra obtenido del método de referencia [19].

$$EA = |\bar{y} - y| \quad (45)$$

2.5.3.2 Bias (B)

Cuando se tienen más de una muestra externa para evaluar el método, se puede definir el bias como el promedio de los errores, expresado de la siguiente forma:

$$B = \overline{\bar{y} - y} \quad (46)$$

2.5.3.3 PRESS (Predicted Residual Error Sum of Squares)

El PRESS es simplemente la sumatoria del cuadrado de los errores de todas las muestras de predicción.

$$PRESS = \sum_{i=1}^n (\bar{y} - y)^2 \quad (47)$$

Si se aplica esta ecuación al conjunto de calibración, se denominara **cross validation leave-one-out**. En el método de **cross validation leave-one-out** se divide el conjunto de calibración en varios bloques o segmentos. El modelo se construye tantas veces como el número de segmentos que se haya determinado, tomando un segmento para comprobar los resultados y el resto de los segmentos para construir el modelo de calibración. Luego se inserta el segmento extraído para construir el modelo nuevamente, dejando el siguiente para comprobar el resultado y así sucesivamente hasta que se tomen todos los segmentos.

2.5.3.4 Varianza de Predicción (S^2)

Se define como:

$$S^2 = \frac{\sum_{i=j}^n (\bar{y} - y - bias)^2}{n - 1} \quad (48)$$

donde:

n = al número de muestras del conjunto de predicción.

2.5.3.5 SEP (Standard Error of Prediction)

El **SEP** se aplica cuando la curva de calibración es creada con un conjunto de muestras independientes al conjunto de predicción y se define como la raíz cuadrada de la Varianza de Predicción (**S**²):

$$SEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=j}^n (\bar{y} - y - bias)^2}{n - 1}} \quad (49)$$

2.5.3.6 MSEP (Mean Squared Error of Prediction)

MSEP se define como el SEP (Standard Error of Prediction) dividido por el número (**n**) de muestras:

$$MSEP = \frac{PRESS}{N} \quad (50)$$

2.5.3.7 RMSEP (Root Mean Standard Error of Prediction)

El **RMSEP** es simplemente la raíz cuadrada de *Mean Squared Error of Prediction*.

$$RMSEP = \sqrt{\frac{PRESS}{n}} \quad (51)$$

2.5.3.8 MSEC (Mean Squared Error of Calibration)

Mean Squared Error of Calibration se define como el **PRESS** dividido entre los grados de libertad (**F**).

$$MSEC = \frac{PRESS}{F} \quad (52)$$

donde los grados de libertad cambian según el tipo de regresión:

Tipo de regresión	F
CLS	$n - c - 1$
ILS	$n - w - 1$
PCR	$n - f - 1$
PLS	$n - f^* - 1$

n = número de muestras

c = número de componentes

w = número de longitudes de onda

f = número de factores para la matriz X

f^* = número de factores para la matriz X y la matriz Y

2.5.3.9 RMSEC (Root Mean Standard Error of Calibration)

RMSEC se define como la raíz cuadrada de *Mean Squared Error of Calibration*.

$$RMSEC = \sqrt{\frac{PRESS}{F}} \quad (53)$$

2.5.3.10 Porcentaje Residual del Error Estándar de Calibración y Porcentaje Residual del Error Estándar de Predicción (%RSEC y %RSEP)

Se define como:

$$\%RSEC = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (Y_i^{pred} - Y_i^{ref})^2}{\sum_{i=1}^n (Y_i^{ref})^2}} \times 100 \quad (54)$$

CAPÍTULO 3

Trabajos Previos

R.A. Mattes y colaboradores de la FOSS NIR Systems, Inc. realizaron un trabajo investigativo en el que monitorearon un secado de granulación utilizando un instrumento de NIR (modelo FOS Systems XDS) conectado por medio de una sonda de fibra óptica a una granuladora (VMA 70) [4]. Esta sonda posee un corte en ángulo de 45 grados para desviar el polvo en un flujo cuasilaminar en la ventana de medición, manteniendo una densidad constante de la muestra en la ventana de la interface.

Experimento

Se preparó una carga de 24 kg de masa la cual estaba constituida por un 91% de lactosa anhidrida y un 9% de almidón 1500 en una granuladora. Se mezcló la carga seca en la granuladora homogéneamente por un periodo de 10 minutos. Luego, se le roció agua, metanol y tinte amarillo (FD&C #6) a la carga y se mezcló. El tinte amarillo se añadió en un rango de partes por billón (ppb) y no era fuente de interferencia en las lecturas de NIR. Los espectros de NIR fueron colectados continuamente durante el mezclado y la granulación. Se tomaron muestras para ser analizadas por LOD a intervalos de tiempo específicos. Cada espectro de NIR tomado consistió de 32 rastreos co-añadidos y se hizo referencia de los espectros en un rango de 800 – 2100 nM.

Luego de haber mezclado la carga con agua y metanol, se corrió un ciclo de aglomeración durante 6 minutos. La operación de secado del mezclado se comenzó aplicando vacío a 200 mbar aproximadamente y calor mediante el uso de un sistema de “Heated Jacket”. Este secado fue uniforme y gradual en un periodo de aproximadamente 43 minutos a una velocidad de agitación de 200 rpm y mediante purga con nitrógeno a una velocidad de 1.0

NM³/h y una temperatura y presión estándar. Todos los espectros fueron colectados continuamente durante todo el mezclado, la granulación y la operación de secado (aproximadamente dos rastreos completos de 32 rastreos co-añadidos por minuto), resultando en aproximadamente 150 espectros por lote. Se corrieron tres lotes de prueba y tres lotes de calibración. Toda la colección de espectros y el análisis fueron realizados utilizando el programa “Vision” de FOSS NIR Systems.

Resultados y Discusión

a. Análisis de humedad

Se tomaron espectros de NIR por separado a todos los componentes primarios (“raw materials”) utilizados en el proceso de granulación (lactosa anhidrida, metanol, almidón 1500 y agua). Para propósitos de cuantificación utilizaron la segunda derivada de los espectros para remover las señales no deseadas de la línea base y aumentar las señales de absorción. Los picos de absorción en la segunda derivada aparecen invertidos con respecto a los espectros de los componentes utilizados como materia prima. En una de las figuras del escrito en referencia ilustran los espectros obtenidos de la materia prima durante el ciclo de secado. Se nota en el espectro ilustrado que el agua absorbe fuertemente en el rango de 1400 – 1900 nM de un espectro de NIR.

En otra de las figuras muestran el crecimiento de las bandas en la región donde el agua absorbe para cada una de las muestras, de acuerdo a su contenido de humedad. Como se utiliza la segunda derivada como pre-tratamiento matemático de los espectros, el contenido de humedad se expresa como un crecimiento invertido en la dirección contraria a los espectros obtenidos para cada una de las muestras en esta región. Es decir, los máximos que se obtuvieron en los espectros se observan como mínimos cuando se aplica la segunda derivada. Los valores de los resultados que tomaron para cada material de partida “raw material” y el

por ciento gravimétrico añadido durante la granulación, los utilizaron como valor inicial para modelar el humedecimiento durante el ciclo de secado. Se modelaron al menos cuatro grados de libertad que fueron: el contenido de metanol, el contenido de agua, variación de temperatura y la variación en la densidad del material.

R.A. Mattes y colaboradores realizaron una gráfica de una regresión lineal en la cual muestran el valor predicho por NIR versus el valor calculado por LOD. Dicha regresión tuvo un R^2 de 0.9541 y un SEC de 0.0966%. En la **tabla 1** que se muestra más adelante, ilustran que la mezcladora 4 tenía inicialmente 1.22% de humedad antes de la granulación, luego se le añadió 0.5% de humedad durante la granulación, resultando en aproximadamente 0.53% luego del secado. El método se repitió para cada uno de los mezclados posteriores (5 y 6). Estos valores y los valores intermedios lineales interpolados, se aplicaron a los espectros adquiridos al tiempo correspondiente. Se desarrolló una regresión de cuadrados mínimos parciales (PLS por sus siglas en inglés) de tres factores utilizando los valores obtenidos para las 18 muestras ilustradas en la tabla ilustrada. La intensidad de la segunda derivada y la variación normal estándar para la corrección de dispersión sobre el rango de 1100 – 2100 nm fueron aplicados para desarrollar el modelo con un coeficiente de correlación (R^2) de 0.9541 y un error estándar de calibración de 0.0966%. El error estándar de la validación cruzada fue de 0.1835, razonable para un pequeño grupo de muestras.

Los espectros obtenidos en el ciclo de secado se utilizaron para desarrollar el modelo de predicción, creando una biblioteca para cualificar las muestras para la cuantificación. Esta biblioteca y el modelo de predicción se utilizaron en un análisis de rutina para predecir el promedio de cinco muestras consecutivas. Algunas muestras no fueron predichas al inicio del proceso ya que el promedio de los espectros no alcanzaban la cualificación de la biblioteca por las altas revoluciones y turbulencia durante el ciclo de mezclado.

Tabla 1: Muestras de LOD y Predicciones por NIR

Mezclado	Muestra	% LOD	MeOH		
			% H ₂ O	LOD- %H ₂ O	%MeOH
			NIR	NIR	NIR
4	7	1.22	1.23	-	-
4	67	10.1	1.73	8.37	8.22
4	104	5.3	1.32	3.98	3.64
4	137	2.1	0.89	1.21	0.32*
4	176	1.1	0.7	0.4	0.75
4	204	1.27	0.53	0.74	0.35
5	206	1.35	1.38	-	-
5	315	9.9	1.7	8.2	7.82
5	346	4.95	1.43	3.52	4.44
5	381	1.97	0.97	1	0.45
5	410	1.25	0.77	0.48	1.07
5	432	1.07	0.64	0.43	0.49
6	468	1.36	1.32	-	-
6	563	9.42	1.75	7.67	7.77
6	604	3.42	1.28	2.14	1.94
6	631	1.9	0.99	0.91	0.71
6	663	1.34	0.76	0.58	0.93
6	693	0.96	0.63	0.33	0.12

* Indica que la muestra no pasó la cualificación de la biblioteca.

b. Análisis de metanol

En otra figura del escrito en referencia muestran la segunda derivada del espectro tomado de la mezcladora 5 en la región analítica que utilizaron para la predicción de los niveles de metanol en el mezclado de lactosa anhidra y almidón 1500. Para poder estimar los niveles de metanol, los valores de la humedad predichos por el modelo de NIR fueron sustraídos de los valores obtenidos por LOD. Un modelo fue obtenido del resultado de 17 valores ajustados (*véase tabla 1*). No se utilizó uno de los espectros en el modelo ya que estuvo fuera de la cualificación de la biblioteca. Ellos desarrollaron un modelo de Cuadrados Mínimos Parciales

(PLS) utilizando las intensidades de la segunda derivada en la región de 1800-2100 nm resultando en un valor de R^2 de 0.9823, y un valor de 0.4427% para el error estándar de calibración. El valor para el error estándar de la validación cruzada fue de 0.6224.

Estas muestras no tuvieron una separación adecuada según ilustraron en una de las figuras del escrito en referencia, debido a que el metanol fue removido inicialmente de manera muy rápida a diferencia del agua que fue removida de manera cuasi-lineal en función de tiempo.

En una de las figuras ilustran la gráfica de un análisis de rutina para el proceso de granulación y secado del mezclado 4. Estos espectros se analizaron por un análisis de rutina promediando cinco espectros por cada predicción y examinándolos con la biblioteca de cualificación. El nivel inicial de metanol de algunas muestras no fue predicho por el análisis de rutina ya que el promedio de sus espectros no coincidía con la biblioteca de cualificación. Esto se debió a la alta turbulencia y granulación que se tenía a consecuencia de las altas revoluciones del ciclo de mezclado.

El nivel de metanol alcanzó un mínimo y luego aumentó ligeramente antes de alcanzar el mínimo final. Este efecto posiblemente fue causado por la liberación de metanol intersticial de los gránulos una vez éstos se fragmentaron.

Conclusión

El método de predicción de Espectroscopía de NIR para determinar el contenido de agua y la pérdida de metanol en muestras de lactosa anhidra y almidón 1500, durante el los procesos de mezclado, granulación y secado a pesar de que no conocían los valores con exactitud, demostraron ser muy razonables al comienzo y al final del proceso en comparación con los valores conocidos en estos dos puntos del proceso. Las pruebas

realizadas indican que utilizando una nueva sonda con un ángulo de 45 grados acoplada a un NIR se puede medir *in-situ* el contenido de agua y metanol en muestras en movimiento a pesar de la turbulencia, si esta sonda es colocada de una manera adecuada de modo tal que la densidad del material permanezca constante.

En otro trabajo Robert A. Mattes, Denise E. Root y Andrew P. Birkmire realizaron un monitoreo en línea del contenido de humedad presente en un proceso de granulación de Lactosa, Celulosa microcristalina y Crospovidone utilizando la tecnología de infrarrojo cercano (NIR) [20]. Según R. A. Mattes y colaboradores el monitorear el contenido de humedad en este proceso es de suma importancia para su posterior compresión, ya que si los gránulos son sobre secados, la tableta se fragmentará. Por otra parte, si el contenido de humedad es muy elevado se formará un producto muy pastoso que imposibilitará su posterior compactación. También, el exceso de humedad afectará la estabilidad del producto una vez este sea almacenado.

Experimento

Todos los espectros se colectaron utilizando un instrumento Foss NIR Systems XDS Process Analyzer con un “software” Vision. Cada espectro consistía de 16 rastreos tomados en el rango de 800-2100 nm. Utilizaron una sonda acoplada a fibra óptica al instrumento de NIR ubicado en un lugar remoto al equipo de granulación. La sonda utilizada tenía un diseño con un ángulo de 45 grados el cual se insertó en un contenedor dentro del granulador marca Niro, modelo MP 2/3 Precision Granulator.

Todas las muestras eran tomadas con una especie de cuchara la cual una vez se le tomaba el espectro se limpiaba con un sistema de purga mediante ventilación. Una vez limpiada la cuchara esta estaba lista para tomar la siguiente muestra y tomarle el espectro.

Ellos prepararon una carga de lactosa (Pharmatose 200M, DMV), celulosa microcristalina (Avicel PH 101, FMC) y crospovidone (Polyplasdone XL 10, ISP) en el granulador Niro y la cargaron en un contenedor de producto. El producto fue mezclado durante 5 minutos y luego secado hasta alcanzar la homogeneidad deseada. Una vez homogeneizado, el producto se roció con una solución acuosa al 15 % de polyvinyl pyrrolidone (Plasdone K29/32) atomizado a una presión de 1.5 bar. Los espectros de NIR fueron colectados cada 40 segundos durante la operación del mezclado y las muestras de LOD fueron tomadas a intervalos de 5 minutos aproximadamente. Las muestras analizadas por LOD fueron de 2.0 g y se analizaron a 160 °C por 15 minutos utilizando un instrumento Mettler Toledo (Columbus, OH) HR73 halogen moisture analyzer. El proceso de secado comenzaba una vez la bomba que impulsaba la solución acuosa de “polyvinyl pyrrolidone” al 15% se detenía. Esta operación de secado fue uniforme y gradual durante un periodo de 15 minutos.

Resultados y Discusión

En una de las figuras del escrito en referencia muestran los espectros de las muestras colectadas en el granulador. Según ilustran los espectros, el agua absorbe fuertemente en la región de 1400 y 1900 nm. En otra figura ilustran la segunda derivada de los espectros ilustrados antes ilustrados. Comúnmente, en espectroscopía de infrarrojo cercano (NIR) se utiliza la segunda derivada como pre- tratamiento matemático de los espectros para minimizar la línea de fondo ocasionada por la dispersión “scattering” y mejorar la absorbancia de los picos. Los picos de absorción en la segunda derivada aparecen invertidos con respecto a los espectros de los componentes utilizados como materia prima. En otra de las figuras se observa un alargamiento espectral en la región utilizada para realizar el modelo de predicción de humedad.

R. A. Mattes y colaboradores desarrollaron una regresión de Cuadrados Mínimos Parciales (PLS por sus siglas en inglés) de dos factores utilizando los espectros de calibración y los valores obtenidos mediante LOD para cada una de las muestras como valores de referencia. La intensidad de la segunda derivada sobre la región de 900-2100 nM fue utilizada para desarrollar un modelo de predicción con un valor de R^2 de 0.9896 y un error estándar de calibración de 0.2171. Ellos obtuvieron un modelo de predicción con una buena linealidad con el número de muestras utilizadas según demuestran en otra de las figuras del escrito en referencia. Según los autores de este artículo el modelo pudo haberse hecho aun más robusto si se hubiesen utilizado un número mayor de muestras en el modelo de calibración. Ellos llevaron a cabo un análisis de rutina utilizando el modelo de predicción. En el escrito ilustra una gráfica con los resultados que obtuvieron en dicho análisis. Mediante esta gráfica pudieron obtener el por ciento de humedad vs. tiempo demostrando que este “software” es muy útil para desarrollar métodos tanto cualitativos como cuantitativos para la obtención de información en tiempo real.

En otra de las figuras ilustran en una misma gráfica tres análisis de rutina utilizando el mismo modelo de predicción para tres procesos de granulación distintos. En los tres procesos se granuló el material utilizando una atomización a una presión de 1.5 bar.

Los autores muestran mediante una tabla una comparación de los datos obtenidos mediante NIR y LOD para los tres procesos de granulación. Los valores de LOD demostraron un error estándar de predicción de 0.4232%. Se observó un mayor incremento en el error de predicción para las muestras con mayor humedad. Según el autor, la exactitud del modelo puede ser mejorada utilizando el método de Karl Fischer como referencia debido a que el análisis se realiza en un menor tiempo.

Según se demuestra en una de las figuras, se puede determinar el punto final de secado en el ciclo de secado para todas las muestras con un error mínimo. Esto le permite al operador optimizar el tiempo de secado de la manera más óptima sin que el material se dañe o se degrade.

Conclusión

En conclusión, se puede utilizar la técnica de NIR para determinar o predecir con certeza el por ciento de humedad en el proceso de granulación de lactosa, celulosa microcristalina y crospovidone. Mediante esta técnica se puede determinar con exactitud el punto final del secado cuando el nivel de humedad está en un punto asintóticamente bajo en el ciclo de secado. Esta prueba demostró la habilidad de la sonda para medir el contenido de humedad en muestras fluidas siempre y cuando ésta sea colocada en un área y forma apropiada para aumentar el tiempo de contacto. La exactitud de este modelo de predicción podría mejorarse si se utilizara un número mayor de muestras para realizar la regresión y si se utilizara un modelo de referencia más confiable como el de Karl Fischer.

En otro trabajo, M. Alcalá, M. Blanco, M. Bautista y Josep M. González, desarrollaron un método para identificar y cuantificar el contenido de humedad en tiempo real (on-line) en un proceso de granulación utilizando la tecnología de NIR [21]. Ellos realizaron un análisis de componentes principales (PCR) y una regresión de cuadrados mínimos parciales (PLSR) aplicando SNV y la 1^{ra} y 2^{da} derivada aplicando el método de Savitzky-Golay. En los resultados que obtuvieron, observaron como variaban los espectros en relación a las distintas etapas del proceso de granulación logrando determinar el punto final del secado.

En un trabajo realizado en 2002 por G.X. Zhou y colaboradores, en donde monitorearon un secado (in-line) en un proceso de granulación húmeda, encontraron diferencias significativas en un análisis de componentes principales que realizaron sobre la data espectral. Ellos, lograron determinar y diferenciar las bandas que correspondían al agua no enlazada de las correspondientes al agua enlazada que se encontraban en la red cristalina de los compuestos hidratados [22]. De este modo, pudieron demostrar que la técnica de NIR es una herramienta muy útil para la determinación y diferenciación del agua superficial y el agua presente en la red cristalina de los compuestos hidratados.

CAPÍTULO 4

Materiales y Métodos

4.1 Reactivos

El porcentaje de agua fue determinado en granulación de una droga desconocida manufacturada en una planta ubicada en Humacao, Puerto Rico. Por razones de confidencialidad, no se darán detalles de la identidad de la droga, ni de su ingrediente activo. Se utilizaron muestras de granulación de distintos lotes y de distintos tipos de potenciación. En la tabla 4.1 se muestran los componentes de cada tipo de granulación según su potencia:

Tabla 4.1 Composición de la granulación

Ingrediente	Aplicación	Manufacturero	Potencia				
			2mg	5mg	10/30mg	15mg	20mg
IA	Ingrediente Activo	Planta de Humacao	2mg	5mg	10mg	15mg	10mg
Lactose Monohydrate	Excipiente	DMV International	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E
Microcrystalline Cellulose	Excipiente	FMC - Inc.	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E
Magnesium Stearate	Lubricante	Mallinckrodt	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E
Corn Starch	Excipiente	Tate & Lyle	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E
Hydroxypropyl Cellulose	Binder	Hercules	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E

***N/E cantidad no especificada**

Para la determinación del porcentaje de humedad en la granulación mediante el método de referencia (Karl Fischer), se utilizó Metanol Anhidro, libre de acetona (Mallinckrodt Cat. No. 3016, aprox. 0.001% acetone) y Hydranal Composite 5 (Riedel-de Haën Cat. No. 34805) como agente titulador. Para humedecer las muestras y preparar las

muestras de la curva de calibración, se utilizó agua destilada de la planta que es la que se utiliza en el proceso de granulación para la manufactura del producto.

4.2 Equipos Utilizados

4.2.1 Cristalería

- 1) Petri dish de 15mL y de 200 mL
- 2) vials con tapas de 20mL
- 3) botellas con tapas color ámbar de 100mL

4.2.2 Otros materiales

- 1) parafina
- 2) espátulas de acero inoxidable
- 3) papel de pesada
- 4) botella rociadora
- 5) desecador

4.2.3 Aparatos Electrónicos

- 1) horno de secado calibrado a 60 °C conectado a una bomba de vacío
- 2) balanza analítica (Mettler Toledo, Delta Range AT261)
- 3) Karl Fischer (Metrohm, 841 Titrando) ilustrado en la figura 1.1
- 4) Foss NIR (XDSsystem Rapid Content Analyzer)

4.2.4 Software

- 1) Vision 3.2
- 2) Excel

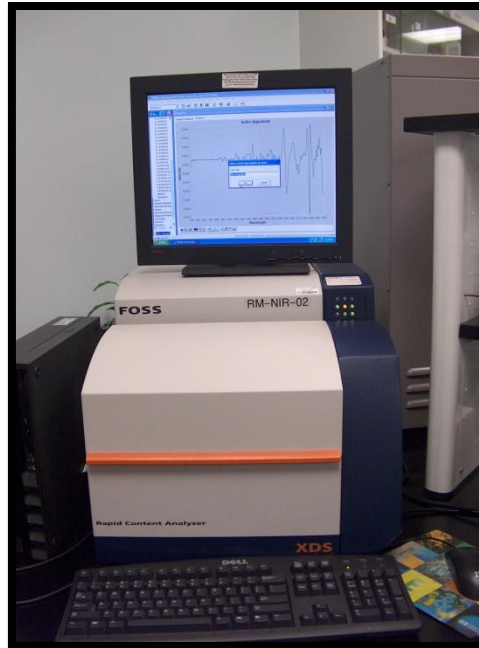


Figura 4.1 Espectrofotómetro de Infrarrojo Medio (NIR)

4.3 Preparación de las muestras de calibración

Se utilizó cinco lotes distintos (9G**952, 9G**953, 9G**954, 9G**956, 9G**960) de una misma potencia (20 mg) para preparar las muestras de calibración. Estas muestras fueron colectadas en el área de manufactura y llevadas en botellas color ámbar selladas con tapa y parafina dentro de bolsas zip-lock con material secante hasta el cuarto de humedad controlada dentro del laboratorio de **QC**. Se utilizó distintos lotes para tratar de obtener un muestreo más representativo de la variabilidad que se pudiera obtener en los análisis de rutina posteriores. Se decidió que la curva de calibración tuviese un número no menor de 30 puntos para que ésta fuera suficientemente robusta cumpliendo con la regla de los cinco que establece que el número de muestras debe ser por lo menos cinco veces mayor que el número de componentes presentes en las muestras. Para establecer el rango de la curva, se prepararon muestras que estuvieran entre el 80 y un 120% de los valores máximos del porcentaje de humedad aceptados para cada una de las potencias, haciendo la curva más

robusta en la región de aceptación. Los valores máximos aceptados para cada potencia son detallados en la tabla 4.2.

Tabla 4.2 Porcientos de humedad aceptados

Potencia	% de humedad aceptada
2mg	4.8
5mg	4.6
10/30mg	4.4
15mg	4.1
20mg	4.4

Según el método de referencia utilizado (Karl Fischer), se requiere aproximadamente 0.8 g de muestra para realizar cada lectura. Se estableció realizar las lecturas en triplicado para lo que se requería un mínimo de 2.4 g por muestra. Como la cantidad de muestra de cada lote disponible era limitada, se realizó un análisis para decidir cómo se manejarían las muestras teniendo en consideración la cantidad disponible. En la tabla 4.3 se representa cómo se distribuyó el muestreo. .

Tabla 4.3 Distribución de las muestras

Petri	Masa (g)	Masa/2.900 g	# de muestras
9G**52D	8.4044	2.898	2
9G**52W	12.0080	4.141	4
9G**53D	12.4655	4.298	4
9G**53W	12.0052	4.140	4
9G**54D	7.6489	2.638	2
9G**54W	12.4401	4.290	4
9G**56D	10.1822	3.511	3
9G**56W	9.0000	3.103	3
9G**60D	11.0741	3.819	3
9G**60W	8.8624	3.056	2

Total de muestras	31
Muestras Std.	5
Gran Total	36

Se tomó una muestra de cada lote para tener cinco muestras estándares clasificadas como (**Std**). Luego, según se ilustra en la tabla 4.3 la cantidad de muestras restantes se dividieron en 10 platos Petri de 200ml con las cantidades ilustradas en la segunda columna. Se colocó una muestra representativa de cada lote en un horno calibrado a 60⁰C al vacío y a este conjunto de muestras se le clasificó con la letra **D**. Las otras cinco muestras representativas de cada lote se expusieron en humedad en un sonicador con agua a una temperatura de 60 ⁰C y se les clasificó con la letra **W**. Para calcular cuantas muestras se podían extraer de cada Petri se dividió la cantidad de muestra presente en cada Petri entre 2.900 g, ya que se requiere un mínimo de 2.400 g para las tres lecturas de **KF**. El número de muestras que se pueden extraer por Petri se ilustra en la cuarta columna de la tabla 4.3 sumando un total de 36 muestras. En las tablas 4.4 y 4.5 se ilustra la masa y los intervalos de tiempo en que se tomaron muestras de los Petri colocados en el horno calibrado a 60 ⁰C al vacío (**D**) y en humedad (**W**). Las muestras que se extrajeron fueron pesadas y colocadas en botellas de muestras (“vials”) con tapa de 20 ml los cuales habían sido purgados previamente con nitrógeno de alta pureza para extraerle toda la humedad y el dióxido de carbono. Algunas de las muestras se tuvieron que humedecer con una pistola rociadora ya que en el sonicador no se podían alcanzar niveles de humedad superiores a 4.7 %.

Tabla 4.4 Muestras colocadas en horno a 60 °C al vacío (D)

Muestra	Masa	Intervalo de tiempo en minutos
Exp.7(52D1)	2.9081	8
Exp.7(52D2)	2.9092	8
Exp.7(53D1)	2.9054	38
Exp.7(53D2)	2.9013	88
Exp.7(53D3)	2.9023	273
Exp.7(53D4)	2.9038	1240
Exp.7(54D1)	2.9012	38
Exp.7(54D2)	2.9080	148
Exp.7(56D1)	2.9028	53
Exp.7(56D2)	2.9075	118
Exp.7(56D3)	2.5102	321
Exp.7(60D1)	2.9012	53
Exp.7(60D2)	2.9089	148
Exp.7(60D3)	2.9052	805

Tabla 4.5 Muestras expuestas a humedad (W)

Muestra	Masa	Intervalo de tiempo en minutos
Exp.7(52W1)	2.9012	15
Exp.7(52W2)	2.9091	15
Exp.7(52W3)	2.9023	rociadas
Exp.7(52W4)	2.9046	rociadas
Exp.7(53W1)	2.9079	rociadas
Exp.7(53W2)	2.9088	rociadas
Exp.7(53W3)	2.9014	30
Exp.7(53W4)	2.9067	rociadas
Exp.7(54W1)	2.9024	rociadas
Exp.7(54W2)	2.9039	rociadas
Exp.7(54W3)	2.9045	30
Exp.7(54W4)	2.9030	75
Exp.7(56W1)	2.9043	rociadas
Exp.7(56W2)	2.9047	rociadas
Exp.7(56W3)	2.9024	rociadas
Exp.7(60W1)	2.9039	rociadas
Exp.7(60W2)	2.9035	rociadas

4.4 Obtención de la señal analítica mediante la nueva técnica instrumental

En el manejo de las muestras antes y después de su extracción de las botellas de muestras o “vials” se les colocó el tapón y se sellaban con parafina para evitar que estas sufrieran alteraciones con el ambiente. Luego se transportaron en un desecador hacia el área donde se encontraba el espectrómetro de NIR para la adquisición y almacenamiento de sus espectros. Antes de tomarle los espectros a cada uno de los vials se corrió un blanco el cual contenía solamente nitrógeno gaseoso de alta pureza. Luego de haber corrido el blanco los “vials” que contenían las muestras se agitaron e impactaron levemente sobre la mesa de laboratorio para compactar el material, posteriormente se limpiaba el vial utilizando kimwipes para eliminar el agua que se pudiera haberse condensado y adherido en el fondo del vial. Se utilizó un espectrofotómetro de infrarrojo cercano marca FOSS NIR modelo XDS Rapid Content Analyzer con un detector de silicio y otro de sulfuro de plomo (PbS) alcanzando un rango de detección de 400 – 2500 nm con una resolución de 0.5 nm. Todos los espectros registrados fueron el producto del promediado de 32 barridos/min. Una vez se tomaron los espectros las muestras se colocaron nuevamente en el desecador para transportarlas hacia el cuarto de humedad controlada para tomarles el porcentaje de humedad mediante el método de referencia (KF).

4.5 Determinación del parámetro a predecir mediante un método de referencia (KF)

Todas las lecturas de KF se realizaron en triplicado utilizando un aparato de Karl Fischer (Metrohm, 841 Titrando) ilustrado en la figura 1.1 y siguiendo el método establecido por la compañía para ese tipo de granulación. Previamente a utilizar el KF se le determinaba el factor (F) de calibración, para tomar en consideración el estado del agente titrante (Hydranal Composite 5). Este factor era determinado diariamente siguiendo el método establecido para ese propósito, el cual consistía de una titulación con una cantidad

de agua conocida. Una vez se determinaba el factor (**F**) el instrumento estaba listo para tomarle las lecturas a las muestras.

Luego de determinarse el factor se llamaba el método de granulación ya establecido en el instrumento y se esperó hasta que la solución se acondiciono. Una vez acondicionada la solución se corría un blanco sin echar nada en la solución. Después de haber corrido el blanco se aguardaba nuevamente a que se acondicionara la solución y se vertió 0.800 g aproximadamente de la muestra en la solución para determinar el porcentaje de humedad. La información que brinda el instrumento es el volumen de agente titulante que se requiere para alcanzar el punto de equivalencia de la solución. Es por tal razón que para poder determinar el % de humedad presente se debe aplicar la siguiente ecuación matemática:

$$\% \text{ de humedad} = \frac{(V_{\text{muestra}} - V_{\text{blanco}}) \times F \times 100}{M_{\text{muestra}} \times 1000}$$

donde;

V_{muestra} = volumen en mL que se requirió para la titulación de la muestra

V_{blanco} = volumen en mL que se requirió para la titulación del blanco

F = factor determinado diariamente

M_{muestra} = masa de la muestra vertida en la solución

Una vez se determinó el % de humedad a todas las muestras en triplicado el valor promedio de las lecturas se utilizó para correlacionarlas con los espectros y realizar la curva de calibración en el NIR. En la tabla 4.6 se muestran todos los valores obtenidos mediante KF para todas las muestras de calibración (véase Apéndice A).

Tabla 4.6 Valores obtenidos mediante KF

Muestra	% de humedad mediante KF			
	1ra lectura	2da lectura	3ra lectura	Promedio
Exp.7(52Std.)	4.44	4.38	4.48	4.43
Exp.7(53Std.)	4.44	4.39	4.38	4.41
Exp.7(54Std.)	4.45	4.37	4.31	4.38
Exp.7(56Std)	4.61	4.4	4.56	4.52
Exp.7(60Std.)	4.41	4.47	*	4.44
Exp.7(52D1)	4.28	4.45	4.17	4.3
Exp.7(52D2)	4.51	4.59	4.6	4.57
Exp.7(53D1)	4.58	4.58	4.55	4.57
Exp.7(53D2)	4.38	4.41	4.25	4.35
Exp.7(53D3)	4.28	4.3	4.38	4.32
Exp.7(53D4)	3.18	3.21	3.19	3.19
Exp.7(54D1)	4.35	4.37	4.41	4.38
Exp.7(54D2)	3.92	4.1	4.29	4.1
Exp.7(56D1)	4.62	4.57	4.55	4.58
Exp.7(56D2)	4.34	4.4	4.37	4.37
Exp.7(52W1)	4.19	4.2	4.33	4.24
Exp.7(52W2)	4.35	4.26	4.49	4.37
Exp.7(52W3)	8.6	8.58	8.6	8.59
Exp.7(52W4)	8.15	7.94	8.08	8.05
Exp.7(53W1)	5.23	5.23	5.34	5.26
Exp.7(53W2)	5.08	5.27	5.14	5.16
Exp.7(53W3)	4.29	4.29	*	4.29
Exp.7(53W4)	4.97	5.04	5.13	5.05
Exp.7(54W1)	5.51	5.53	5.59	5.54
Exp.7(54W2)	5.17	5.11	5.07	5.11
Exp.7(54W3)	4.48	4.52	4.39	4.47
Exp.7(54W4)	4.67	4.61	*	4.64
Exp.7(56W1)	4.92	4.88	4.89	4.9
Exp.7(56W2)	4.77	4.74	4.82	4.78
Exp.7(56W3)	4.73	4.68	4.74	4.72
Exp.7(60W1)	4.91	4.91	4.94	4.92
Exp.7(60W2)	4.29	4.38	4.38	4.3
* Muestras perdidas				

4.6 Cálculo del modelo

Primeramente se llevo a cabo una selección de las regiones donde el agua absorbe en NIR. La selección fue realizada utilizando la tabla de correlación brindada en el manual del equipo y mediante inspección visual de los espectros de las muestras de calibración. Se utilizó el Software Vision 3.2 para el tratamiento de los espectros y la obtención de la curva de calibración. Se realizaron varios tipos de curvas de calibración (**Multiple Lineal Regression MLR y Partial Least Square Regression PLS**) utilizando diferentes regiones y aplicando distintos pre-tratamientos. Se aplicó la primera y segunda derivada como pre-tratamiento espectral ya que tanto la primera como la segunda derivada corrigen el desplazamiento de la línea base y los efectos ocasionados por la dispersión de luz debido al tamaño de las partículas. La segunda derivada corrige además la pendiente de la curva. En la segunda derivada los máximos observados en el espectro aparecen como mínimos con una mayor resolución ya que se elimina el solapamiento de las bandas. Se aplicó Standard Normal Variate (SNV) y el método de Savitzky-Golay SG en algunas de las curvas para verificar si se observaban cambios positivos. En la tabla 4.7 se resumen los pre-tratamientos en el orden que se aplicaron y el número de factores aplicados para cada una de las curvas realizadas.

Tabla 4.7: Resumen de los parámetros aplicados para cada uno de los métodos

	MLR- Ab.20mg	PLSR- Ab.20mgB	MLR- Ab.3	PLSR- Ab.2	PLSR- Ab.1	PLSR- Ab.1SNV	PLSR- Ab.SNV1	PLSR- Ab.1SG
Regiones		760-772 1408-1466 1910-1954		948-990 1324-1448 1850-1950	948-990 1324-1448 1850-1950	948-990 1324-1448 1850-1950	948-990 1324-1448 1850-1950	948-990 1324-1448 1850-1950
Longitud de onda	1876.5		1883.5					
Pre-tratamientos	2da Derivada	2da Derivada	2da Derivada	2da Derivada	1ra Derivada	1ra Derivada SNV	SNV 1ra Derivada	1ra Derivada SG
Factores		4		5	4	5	3	5

4.7 Selección del número de factores

El número de factores fue determinado mediante una gráfica realizada del logaritmo del PRESS vs. el número de factores donde se seleccionó el primer factor correspondiente al menor valor del logaritmo del PRESS. En la **Figura 4.2** se ilustra un ejemplo de esta gráfica.

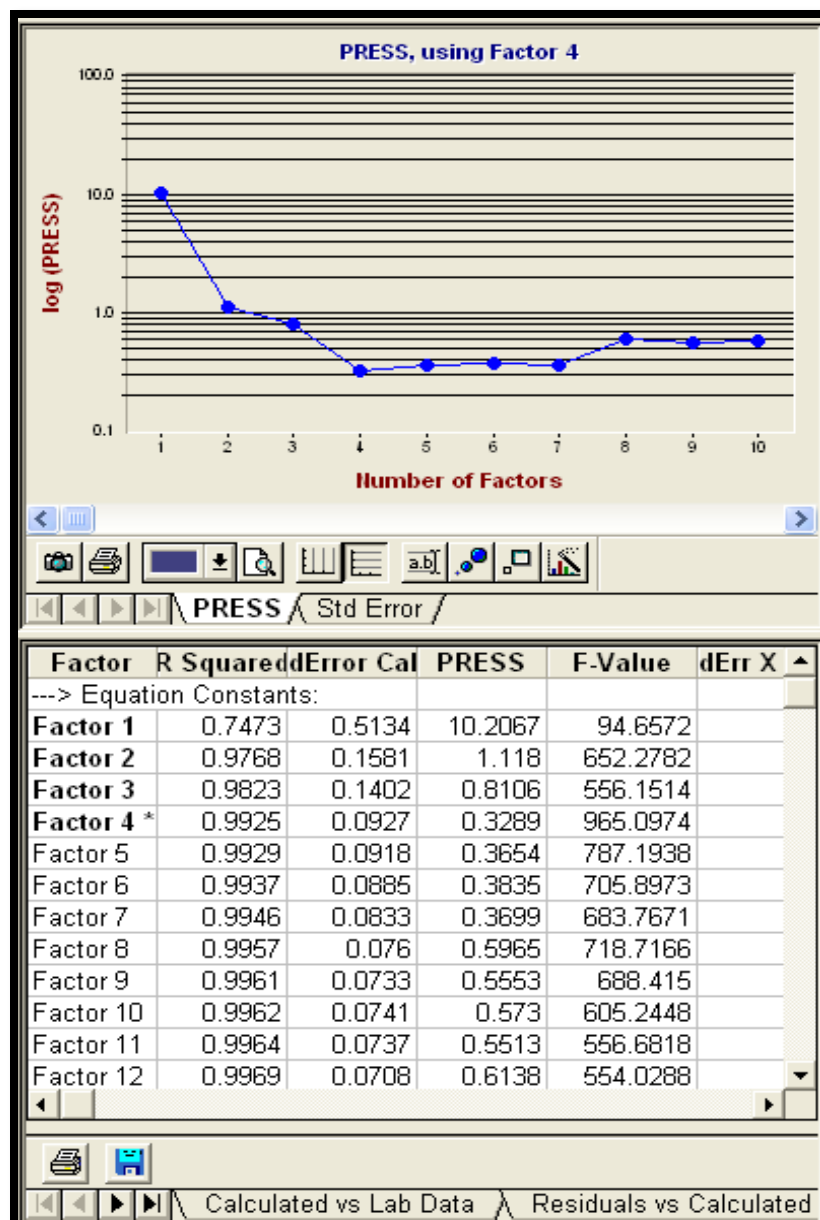


Figura 4.2: Gráfica de logaritmo del PRESS vs. número de factores

CAPÍTULO 5

RESULTADOS Y DISCUSIÓN OBTENIDOS

De todos los métodos creados los que obtuvieron los valores más bajos tanto en el Error Estándar de Calibración (SEC), como en el Error Estándar de Validación Cruzada (SECV) y el PRESS más bajo fue el de PLSRAb.1SG seguido de PLSRAb.2 y PLSRAb.1 respectivamente. En la **Tabla 5.1** se muestran algunos de los valores de evaluación quimiométricos obtenidos para cada uno de los métodos desarrollados.

Tabla 5.1: Pre-tratamientos aplicados y valores de algunos parámetros de evaluación quimiométricos obtenidos para cada uno de los métodos creados

	MLRAb.20mg	PLSRAb.20mgB	MLRAb.3	PLSRAb.2	PLSRAb.1	PLSRAb.1SNV	PLSRAb.SNV1	PLSRAb.1SG
Regiones		760-772 1408-1466 1910-1954		948-990 1324-1448 1850-1950	948-990 1324-1448 1850-1950	948-990 1324-1448 1850-1950	948-990 1324-1448 1850-1950	948-990 1324-1448 1850-1950
Longitud de onda	1876.5		1883.5					
Pre-tratamientos	2da Derivada	2da Derivada	2da Derivada	2da Derivada	1ra Derivada	1ra Derivada SNV	SNV 1ra Derivada	1ra Derivada SG
Factores		4		5	4	5	3	5
SEC	0.11	0.09	0.12	0.09	0.09	0.09	0.10	0.09
MSECV		0.10		0.10	0.10	0.10	0.11	0.09
R Squared	0.9841	0.9925	0.9873	0.9931	0.9936	0.9938	0.9910	0.9941
F-Value	1946.1	965.1	2102.2	807.9	1133.9	892.9	1096.0	764.6
PRESS		0.3289		0.3184	0.3229	0.3622	0.4056	0.2801
%RSEC	2.1	1.5	3.4	1.7	1.7	1.6	1.9	1.8

5.1 Validación del modelo:

Para la validación de los modelos de calibración creados se utilizaron muestras externas de otros lotes que no fueron parte de la curva de calibración. Se utilizaron tres muestras de un mismo lote de una presentación de 20mg rotuladas como E.8L955(Std.1)A20mg, E.8L955(Std.2)A20mg y E.8L955(Std.3)A20mg respectivamente.

También se realizó una mezcla (Composite) de dos lotes distintos de una presentación de 20mg debido a que la cantidad de muestra era limitada. De esta mezcla se sacaron cinco porciones en cinco Petri los cuales se rotularon como E.9Com.Std.A, E.9Com.Std.B, E.9Com.Std.C, E.9Com.W y E.9Com.D respectivamente. A cada una de las muestras rotuladas como E.9Com.Std.A, E.9Com.Std.B y E.9Com.Std.C se le tomaron espectros de NIR y se le determinó el % de humedad mediante KF. La muestra rotulada como E.9Com.Std.A se le tomo un total de once espectros para evaluar la precisión instrumental en cada uno de los métodos de calibración.

En diez de las once lecturas realizadas para la muestra E.9Com.Std.A se compacto levemente la muestra antes de tomarle el espectro según se realizó para las muestras de calibración y en una de las lecturas no se compacto para verificar si se observaba algún cambio. La muestra en el Petri rotulada como E.9Com.W fue rociada con agua destilada igual a la utilizada en el proceso de manufactura para humedecerla tal y como se realizó para las muestras de calibración. Una vez humedecida se tomaron tres muestras y se rotularon como E.9Com.WA, E.9Com.WB y E.9Com.WC respectivamente. El otro Petri que contenía la muestra rotulada como E.9Com.D se colocó en el horno calibrado a 60°C conectado a una bomba de vacío. Luego de un periodo de 1360 min. aproximadamente en el horno se tomaron tres muestras las cuales se rotularon como E.9Com.DA, E.9Com.DB y E.9Com.DC respectivamente. Una vez extraídas las muestras se le tomaron los espectros y se le determinaron los % de humedad mediante KF. En el **Figura 4.3** se ilustra un diagrama de cómo se extrajeron las muestras.

También se utilizaron lotes de otras presentaciones (2mg, 5mg, 15mg y 10/30mg) para verificar la capacidad predictiva de los distintos modelos de calibración creados. Todos estos lotes utilizados para la validación fueron manufacturados en distintas

campañas para así asegurarnos de que fueron manufacturados utilizando distintos lotes de materiales de partida (raw materials). De esta manera se garantiza la mayor variabilidad posible en las muestras analizadas retando aun más los métodos creados.

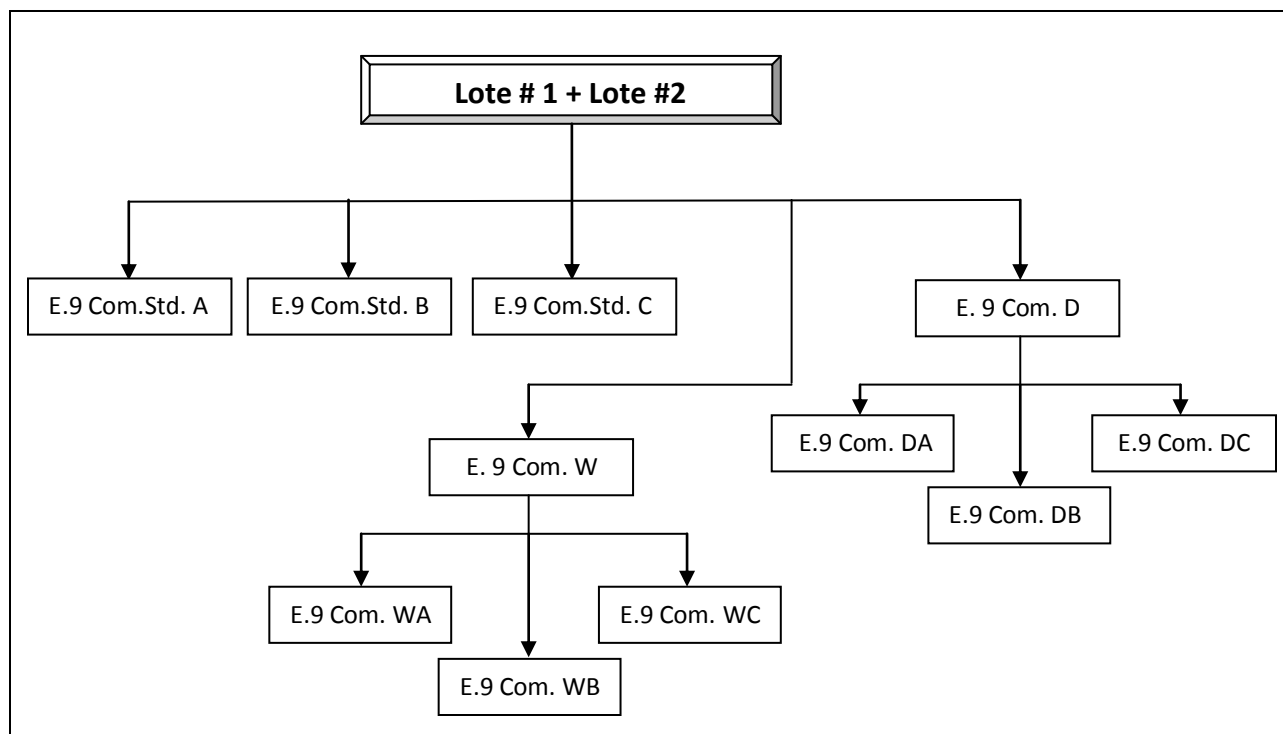


Figura 5.1: Diagrama de muestreo de la mezcla (composite) de dos lotes de 20mg

5.1.1 Especificidad

Se creó una librería espectral para realizar un análisis cualitativo dentro del método previo a la cuantificación del contenido de humedad. Esta librería consistía de 36 muestras de distintos lotes con diferentes contenidos de humedad del mismo tipo de presentación. Mediante la determinación del coeficiente de correlación espectral para medir la similitud entre los espectros de la librería creada y las futuras muestras de predicción a una tolerancia máxima del 95% de varianza acumulativa, el método determina si las muestras

son pertenecientes o no al grupo. Si la muestra no es reconocida como perteneciente al grupo el método **no** continuará con el posterior análisis de cuantificación para el contenido del % de humedad, dando una señal la cual indicará “Fail”. Por otra parte si la muestra es reconocida como perteneciente al método este proseguirá a realizar la cuantificación dando el contenido del % de humedad presente en la muestra.

5.1.2 Linealidad

La linealidad de todos los métodos creados, fueron evaluados mediante inspección visual del gráfico del contenido del % de humedad en las muestras de calibración determinadas por el método de KF vs. el predicho mediante cada uno de los métodos de NIR. Se calculó la regresión lineal para cada una de las gráficas mediante cuadrados mínimos para verificar la pendiente de la curva así como el valor de R^2 (coeficiente de correlación cuadrado). También se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA) para cada una de las gráficas para demostrar estadísticamente que había linealidad y que no hubiese errores sistemáticos en los métodos.

Según las ecuaciones de la línea para cada uno de los métodos se observó que existía una relación lineal entre los valores del porcentaje de humedad determinados mediante KF y los determinados por todos los métodos creados en NIR. En la **Tabla 5.2** se presentan todas las ecuaciones para cada uno de los métodos creados. (véase ejemplo de ecuación corregida en la **Sec. B-1.1.1 del Apéndice B**)

Se puede observar en la **Tabla 5.3**, que de todos los métodos creados, los que tuvieron un mejor valor de R^2 fueron los realizados mediante PLS ante los creados mediante MLR. Esto se debe a que PLS tiene la capacidad de hallar una mejor correlación

entre la información espectral y la de concentración que la que tiene MLR. En el Apéndice B se ilustran todas las curvas de calibración para cada uno de los métodos.

Tabla 5.2: Tabla de ecuaciones para cada una de los métodos de calibración

Regresión	Ecuación de la gráfica	Ecuación corregida
MLRAb.20mg	$y = 0.9883x + 0.0573$	$y = 1.00 (\pm 0.02)x - 0.01 (\pm 0.09)$
PLSRAb.20mg	$y = 0.9945x + 0.0219$	$y = 1.00 (\pm 0.01)x + 0.01 (\pm 0.06)$
MLRAb.3	$y = 0.9942x - 0.0103$	$y = 0.98 (\pm 0.03)x + 0.1 (\pm 0.1)$
PLSRAb.2	$y = 0.9939x + 0.0247$	$y = 1.00 (\pm 0.01)x + 0.01 (\pm 0.07)$
PLSRAb.1	$y = 0.9943x + 0.0232$	$y = 1.00 (\pm 0.01)x + 0.01 (\pm 0.07)$
PLSRAb.1SNV	$y = 0.9943x + 0.0236$	$y = 1.00 (\pm 0.01)x + 0.01 (\pm 0.07)$
PLSRAb.SNV1	$y = 0.9902x + 0.0473$	$y = 1.00 (\pm 0.02)x - 0.00 (\pm 0.08)$
PLSRAb.1SG	$y = 0.9868x + 0.0778$	$y = 1.00 (\pm 0.01)x - 0.04 (\pm 0.07)$

Tabla 5.3: Resumen de los resultados obtenidos de los análisis de varianza para cada una de los métodos de calibración

Regresión	R Cuadrado	R Cuadrado Ajustado	SSreg.	SSres.	MSreg.	MSres.	F	Valor P
MLRAb.20mg	0.9891	0.9888	33.4888	0.3675	33.4888	0.0108	3098.6	5.49497E-35
PLSRAb.20mgB	0.9943	0.9941	33.6618	0.1945	33.6618	0.0057	5883.8	1.10309E-39
MLRAb.3	0.9740	0.9733	32.9771	0.8792	32.9771	0.0259	1275.3	1.52796E-28
PLSRAb.2	0.9926	0.9924	33.6059	0.2504	33.6059	0.0074	4563.5	8.0681E-38
PLSRAb.1	0.9932	0.9930	33.6272	0.2291	33.6272	0.0067	4990.1	1.78492E-38
PLSRAb.1SNV	0.9934	0.9932	33.6314	0.2249	33.6314	0.0066	5084.4	1.30089E-38
PLSRAb.SNV1	0.9909	0.9907	33.5496	0.3067	33.5496	0.0090	3719.8	2.53546E-36
PLSRAb.1SG	0.9925	0.9923	33.6024	0.2539	33.6024	0.0075	4500.5	1.02037E-37

5.1.3 Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LQ)

Los límites de detección y de cuantificación de cada uno de los métodos desarrollados fueron determinados mediante la desviación estándar del blanco y la pendiente de cada una de las curvas de calibración (véase ej. en la **Sec. B-1.1.1 del Apéndice B**). En la **Tabla 5.4** se ilustran los valores de LD y LQ para cada una de los métodos de calibración.

Tabla 5.4: Valores de los límites de detección y cuantificación para cada una de las curvas de calibración

Regresión	LD	LQ
MLRAb.20mg	0.29	0.87
PLSRAb.20mg	0.21	0.63
MLRAb.3	0.44	1.34
PLSRAb.2	0.24	0.71
PLSRAb.1	0.23	0.68
PLSRAb.1SNV	0.22	0.68
PLSRAb.SNV1	0.26	0.79
PLSRAb.1SG	0.24	0.72

Según se puede observar en la tabla 4.10 los métodos desarrollados mediante PLS obtuvieron límites de cuantificación (LQ) menores que los que se obtuvieron mediante los métodos creados por MLR.

5.1.4 Exactitud

Se compararon los valores del contenido de humedad para cada una de las muestras de validación determinados mediante los métodos de NIR vs. los valores aceptados como reales (KF). Incluyendo las muestras de validación de todas las presentaciones se encontró que dos de los métodos creados (PLSRAb.20mg y MLRAb.3) dieron concentraciones de humedad fuera de un rango de 80 – 120% en comparación con los valores de KF. Tres dieron valores entre el 80 – 120% (MLRAb.20mg, PLSRAb.1 y PLSRAb.1SNV) y tres dieron valores entre un rango de 90 – 110% (PLSRAb.2, PLSRAb.SNV1 y PLSRAb.1SG) Demostrando tener una mejor exactitud en la mayoría de las pruebas realizadas ante los demás métodos. (véase **Tabla C-4.1** a la **C-4.8** del **Apéndice C**)

De igual forma en estos últimos tres métodos mencionados se observó una menor diferencia con respecto a los valores obtenidos mediante KF para cada una de las

muestras de validación, dando como consecuencia un menor error relativo que los observados en el resto de los métodos. Se graficó los valores del contenido de humedad vs. los valores obtenidos mediante cada uno de los métodos desarrollados para cada una de las muestras de validación incluyendo las muestras de otras presentaciones y se observó que el método de PLSRab.1 obtuvo una buena exactitud y un buen R cuadrado a pesar de que una de las muestras dio un valor en el rango del 89% con respecto a el valor obtenido mediante KF para esa misma muestra. En la **Tabla 5.5** y **5.6** se ilustran los valores de R cuadrado y las ecuaciones para cada uno de las gráficas.

Tabla 5.5: Resumen de los parámetros de linealidad obtenida de los análisis de varianza para todas las regresiones de valores predichos del % de humedad mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de todas las presentaciones

Regresión	R Cuadrado	R Cuadrado Ajustado	SSreg.	SSres.	MSreg.	MSres.	F	Valor P
MLRab.20mg	0.9379	0.9340	42.2121	2.7942	42.2121	0.1746	241.7	4.45944E-11
PLSRab.20mgB	0.9767	0.9753	43.9580	1.0483	43.9580	0.0655	670.9	1.71964E-14
MLRab.3	0.9181	0.9130	41.3223	3.6840	41.3223	0.2302	179.5	4.1102E-10
PLSRab.2	0.9825	0.9814	44.2180	0.7883	44.2180	0.0493	897.5	1.75351E-15
PLSRab.1	0.9828	0.9818	44.2332	0.7730	44.2332	0.0483	915.5	1.4993E-15
PLSRab.1SNV	0.9812	0.9801	44.1623	0.8440	44.1623	0.0527	837.2	3.02785E-15
PLSRab.SNV1	0.9761	0.9746	43.9312	1.0751	43.9312	0.0672	653.8	2.10408E-14
PLSRab.1SG	0.9826	0.9815	44.2230	0.7833	44.2230	0.0490	903.4	1.66569E-15

Tabla 5.6: Resumen de todas las ecuaciones de las curvas de valores predichos del % de humedad mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de todas las presentaciones

Regresión	Ecuación de la gráfica	Ecuación corregida
MLRab.20mg	$y = 1.0767x - 0.3309$	$y = 0.87(\pm 0.06)x + 0.6(\pm 0.3)$
PLSRab.20mgB	$y = 1.1549x - 0.729$	$y = 0.85(\pm 0.03)x + 0.7(\pm 0.2)$
MLRab.3	$y = 1.1313x - 0.4258$	$y = 0.81(\pm 0.06)x + 0.7(\pm 0.3)$
PLSRab.2	$y = 1.0099x - 0.0244$	$y = 0.97(\pm 0.03)x + 0.1(\pm 0.2)$
PLSRab.1	$y = 1.0345x - 0.1009$	$y = 0.95(\pm 0.03)x + 0.2(\pm 0.2)$
PLSRab.1SNV	$y = 1.0629x - 0.2945$	$y = 0.92(\pm 0.03)x + 0.4(\pm 0.2)$
PLSRab.SNV1	$y = 1.0213x + 0.0332$	$y = 0.96(\pm 0.04)x + 0.1(\pm 0.2)$
PLSRab.1SG	$y = 0.9868x + 0.0778$	$y = 1.01(\pm 0.01)x - 0.04(\pm 0.07)$

5.1.5 Precisión

La precisión de los métodos fue evaluada en base a la desviación estándar y el porcentaje residual de la desviación estándar (%RSD). Se utilizaron solamente las muestras de validación de 20mg para determinar la precisión del método ya que el tiempo era limitado para realizar las medidas de KF en triplicado para las muestras de las otras presentaciones.

Se observó en cuatro de los métodos desarrollados (PLSRAb.2, PLSRAb.1, PLSRAb.SNV1 y en PLSRAb.1SG) desviaciones en las medidas menores que las observadas en el método de KF para las mismas muestras. Lo mismo se observó para los valores del %RSD. Se calculó el S_{pooled} de todos los métodos para obtener una mejor representación de la desviación estándar observada en cada una de las muestras. Nuevamente se observó que los mismos métodos obtuvieron un valor del S_{pooled} menor que el observado para KF. Se realizó una prueba F sobre todas las desviaciones estándares así como para los S_{pooled} de cada uno de los métodos de NIR desarrollados en comparación con las desviaciones observadas en KF para determinar si había diferencia estadísticamente significativa entre los métodos. Según los resultados obtenidos de la prueba F sobre los S_{pooled} observados de la **Tabla 5.7** se determinó la diferencia estadísticamente significativa a favor del método de KF ante el de NIR solamente en el método desarrollado mediante PLS utilizando las regiones de 760-772nm, de 1408-1466nm y 1910-1954nm (PLSRAb.20mg). En cuanto a los resultados obtenidos de la prueba F realizadas para las desviaciones estándares se observó diferencia estadísticamente significativa a favor del método PLSRAb.2 ante el de KF, solamente a concentraciones cercanas a 4.3% de humedad (centro de la curva). A concentraciones en ambos extremos de la curva (valores aproximados a 3.0% y 7.1%) no se encontró diferencia

estadísticamente significativa entre los dos métodos. En resumen todos los métodos que dieron valores de exactitud para las lecturas de todas las muestras entre un rango del 90-110% en comparación con los valores de KF para las mismas muestras tuvieron igual o mejor precisión que el método de KF.

Tabla 5.7: Medidas de precisión obtenidas para cada uno de los métodos

KF							
Muestra (20mg) pot.	1ra Lectura	2da Lectura	3ra Lectura	Promedio	Stdev	%RSD	Pooled Stdev (Sp)
E.8L955(Std.1)A(20mg)	4.493	4.477	4.454	4.47	0.02	0.4	0.08
E.9ComStd.A	4.068	4.048	4.032	4.05	0.02	0.4	
E.9Com.WA	7.086	7.228	6.947	7.1	0.1	2.0	
E.9Com.DA	2.921	2.954	3.041	2.97	0.06	2.1	

MLRAb.20mg									
Muestra (20mg) pot.	1ra Lectura	2da Lectura	3ra Lectura	Promedio	Stdev	%RSD	Pooled Stdev (Sp)	Prueba F (Stdev.)	Prueba F (Spooled)
E.8L955(Std.1)A(20mg)	3.875	4.034	4.088	4.0	0.1	2.8	0.09	31.20	1.48
E.9ComStd.A	4.436	4.458	4.491	4.46	0.03	0.6		2.38	
E.9Com.WA	7.886	7.879	7.700	7.8	0.1	1.3		1.77	
E.9Com.DA	2.991	3.182	3.177	3.1	0.1	3.5		3.09	

Valor de la Tabla con 2
grados de libertad

19

Valor de la Tabla con 8 grados de libertad

3.44

PLSRAb.20mgB									
Muestra (20mg) pot.	1ra Lectura	2da Lectura	3ra Lectura	Promedio	Stdev	%RSD	Pooled Stdev (Sp)	Prueba F (Stdev.)	Prueba F (Spooled)
E.8L955(Std.1)A(20mg)	4.455	4.350	4.432	4.41	0.05	1.2	0.2	7.70	6.09
E.9ComStd.A	4.437	4.400	4.368	4.40	0.03	0.8		3.72	
E.9Com.WA	7.562	7.607	7.359	7.5	0.1	1.8		1.14	
E.9Com.DA	1.966	2.378	2.675	2.3	0.4	15.2		33.14	

Valor de la Tabla con 2
grados de libertad

19

Valor de la Tabla con 8 grados de libertad

3.44

Tabla 5.7: Continuación

MLRAb.3

	1ra	2da	3ra				Pooled	Prueba F	Prueba F
Muestra (20mg) pot.	Lectura	Lectura	Lectura	Promedio	Stdev	%RSD	Stdev (Sp)	(Stdev.)	(Spooled)
E.8L955(Std.1)A(20mg)	4.072	4.200	4.228	4.17	0.08	2.0	0.1	17.56	2.47
E.9ComStd.A	4.517	4.536	4.607	4.55	0.05	1.0		7.03	
E.9Com.WA	8.297	8.245	8.105	8.2	0.1	1.2		2.01	
E.9Com.DA	3.131	3.456	3.504	3.4	0.2	6.0		10.76	

Valor de la Tabla con 2 grados de libertad

19

Valor de la Tabla con 8 grados de libertad

3.44

PLSRAb.2

	1ra	2da	3ra				Pooled	Prueba F	Prueba F
Muestra (20mg) pot.	Lectura	Lectura	Lectura	Promedio	Stdev	%RSD	Stdev (Sp)	(Stdev.)	(Spooled)
E.8L955(Std.1)A(20mg)	4.346	4.340	4.345	4.344	0.003	0.08	0.06	36.27	1.67
E.9ComStd.A	4.297	4.295	4.294	4.295	0.002	0.04		88.61	
E.9Com.WA	7.353	7.337	7.160	7.3	0.1	1.47		1.72	
E.9Com.DA	2.975	2.986	3.075	3.01	0.05	1.82		1.27	

Valor de la Tabla con 2 grados de libertad

19

Valor de la Tabla con 8 grados de libertad

3.44

PLSRAb.1

	1ra	2da	3ra				Pooled	Prueba F	Prueba F
Muestra (20mg) pot.	Lectura	Lectura	Lectura	Promedio	Stdev	%RSD	Stdev (Sp)	(Stdev.)	(Spooled)
E.8L955(Std.1)A(20mg)	4.373	4.395	4.401	4.39	0.02	0.3	0.05	1.74	2.68
E.9ComStd.A	4.301	4.313	4.305	4.306	0.006	0.1		9.25	
E.9Com.WA	7.406	7.409	7.296	7.37	0.06	0.9		4.75	
E.9Com.DA	2.953	2.968	3.078	3.00	0.07	2.3		1.22	

Valor de la Tabla con 2 grados de libertad

19

Valor de la Tabla con 8 grados de libertad

3.44

PLSRAb.1SNV

	1ra	2da	3ra				Pooled	Prueba F	Prueba F
Muestra (20mg) pot.	Lectura	Lectura	Lectura	Promedio	Stdev	%RSD	Stdev (Sp)	(Stdev.)	(Spooled)
E.8L955(Std.1)A(20mg)	4.246	4.292	4.300	4.28	0.03	0.7	0.07	2.13	1.38
E.9ComStd.A	4.268	4.301	4.324	4.30	0.03	0.7		2.46	
E.9Com.WA	7.264	7.296	7.180	7.25	0.06	0.8		5.51	
E.9Com.DA	2.831	2.977	3.050	3.0	0.1	3.8		3.26	

Valor de la Tabla con 2 grados de libertad

19

Valor de la Tabla con 8 grados de libertad

3.44

Tabla 5.7: Continuación

PLSRAb.SNV1									
Muestra (20mg) pot.	1ra Lectura	2da Lectura	3ra Lectura	Promedio	Stdev	%RSD	Pooled Stdev (Sp)	Prueba F (Stdev.)	Prueba F (Spooled)
E.8L955(Std.1)A(20mg)	4.299	4.352	4.361	4.34	0.03	0.8	0.04	0.36	3.15
E.9ComStd.A	4.409	4.420	4.424	4.418	0.008	0.2		4.83	
E.9Com.WA	7.496	7.507	7.390	7.46	0.06	0.9		4.75	
E.9Com.DA	3.204	3.257	3.302	3.25	0.05	1.5		1.60	
Valor de la Tabla con 2 grados de libertad								19	
Valor de la Tabla con 8 grados de libertad									3.44

PLSRAb.1SG									
Muestra (20mg) pot.	1ra Lectura	2da Lectura	3ra Lectura	Promedio	Stdev	%RSD	Pooled Stdev (Sp)	Prueba F (Stdev.)	Prueba F (Spooled)
E.8L955(Std.1)A(20mg)	4.331	4.333	4.337	4.334	0.003	0.1	0.06	40.26	1.47
E.9ComStd.A	4.333	4.344	4.341	4.339	0.006	0.1		10.43	
E.9Com.WA	7.319	7.297	7.111	7.2	0.1	1.6		1.51	
E.9Com.DA	2.974	2.992	3.084	3.02	0.06	1.9		1.11	
Valor de la Tabla con 2 grados de libertad								19	
Valor de la Tabla con 8 grados de libertad									3.44

Utilizando los resultados de la muestra rotulada como E.9ComStd.A leída 11 veces (de las cuales 10 veces fueron compactando la muestra) se pudo comparar la precisión entre cada uno de los métodos de NIR desarrollados. Mediante los resultados de la desviación estándar para cada uno de los métodos se determinó que los métodos PLSRAb.1, PLSRAb.2 y PLSRAb.1SG obtuvieron una desviación mucho menor que las desviaciones obtenidas en los otros métodos desarrollados. Se realizó una prueba F la cual estableció diferencia significativa a favor de estos tres métodos ante los demás, pero no fue significativa entre ellos. Por lo que se concluye que los tres tienen básicamente la misma precisión (véase **Tabla 5.8**).

Tabla 5.8: Lecturas de una misma muestra para comparar precisión entre los métodos de NIR desarrollados

Muestra	MLRAb.20mg	PLSRAb.20mgB	MLRAb.3	PLSRAb.2	PLSRAb.1	PLSRAb.1SNV	PLSRAb.SNV1	PLSRAb.1SG
E.9ComStd.A1	4.49	4.37	4.63	4.27	4.25	4.28	4.39	4.31
E.9ComStd.A2	4.59	4.55	4.65	4.29	4.26	4.25	4.40	4.33
E.9ComStd.A3	4.63	4.65	4.66	4.30	4.27	4.24	4.41	4.34
E.9ComStd.A4	4.64	4.66	4.67	4.30	4.27	4.24	4.42	4.34
E.9ComStd.A5	4.68	4.66	4.67	4.30	4.27	4.23	4.42	4.34
E.9ComStd.A6	4.68	4.71	4.68	4.31	4.27	4.23	4.42	4.34
E.9ComStd.A7	4.67	4.71	4.68	4.31	4.27	4.23	4.42	4.34
E.9ComStd.A8	4.69	4.75	4.69	4.31	4.27	4.23	4.42	4.35
E.9ComStd.A9	4.69	4.74	4.68	4.31	4.27	4.23	4.42	4.34
E.9ComStd.A10	4.71	4.76	4.69	4.32	4.28	4.23	4.43	4.35
E.9ComStd.A10*	3.98	4.59	4.19	4.33	4.25	4.10	4.30	4.34
Average	4.6	4.6	4.6	4.31	4.27	4.23	4.41	4.34
St.Dev	0.2	0.1	0.1	0.02	0.01	0.04	0.04	0.01
RSD	4.58	2.44	3.16	0.37	0.23	1.05	0.86	0.23

* muestra sin compactar

Un dato muy curioso observado en la **Tabla 5.8** con relación a la lectura de la muestra sin compactar (E.9ComStd.A10*) fue que el valor de la lectura para esta medida se mantuvo básicamente constante en todos los métodos desarrollados mediante PLS. Esto no fue así en los métodos desarrollados mediante MLR en donde se observó un mayor cambio. Según lo observado se podría inferir que MLR fue más sensitivo que PLS a el cambio en la compactación del granulo o a una muy mala precisión del método.

5.1.6 Rango

Para establecer el rango específico de cada método se evaluó la exactitud y la precisión de cada uno de los métodos en el centro y en los extremos de la curva de calibración. Todas las muestras de validación utilizadas para este propósito contenían un % de humedad dentro del límite de cuantificación y un 8.59% (cantidad máxima de humedad en las muestras de calibración). No se determinó el límite de linealidad (LOL) de cada uno de los métodos debido a que el propósito del método es verificar que las

muestras tengan un contenido de humedad inferior al nivel máximo aceptado (valores que se encuentran en el centro de la curva).

Se reto cada uno de los métodos de calibración desarrollados, en los extremos y en el centro de la curva para evaluar su exactitud y precisión. Se realizaron gráficas de los valores del contenido de humedad predichos mediante cada uno de los métodos desarrollados por NIR vs. los predichos mediante KF para todas las muestras de validación (incluyendo las de otras presentaciones) y otras gráficas utilizando solamente los valores obtenidos para las muestras de 20mg. Según se demuestra en las gráficas ilustradas en el **Apéndice C** tanto para todas las presentaciones como para las de 20mg se observa que los métodos desarrollados mediante PLS específicamente PLSRab.1, PLSRab.2 y PLSRab.1SG tuvieron un mejor rango de predicción que el observado en el resto de los métodos desarrollado. También se observa una mejor capacidad predictiva para las muestras de 20mg que para las otras presentaciones.

En la **Tabla 5.9:** se presentan los valores promedio para cada una de las muestras obtenidos mediante KF y todos los métodos de NIR desarrollados.

Tabla 5.9: Valores reportados para cada muestra mediante KF y los métodos desarrollados

Muestra (20mg) pot.	KF	MLRab.20mg	PLSRab.20mgB	MLRab.3	PLSRab.2
E.8L955(Std.1)A(20mg)	4.47(± 0.02)	4.0(± 0.1)	4.41(± 0.05)	4.17(± 0.08)	4.344(± 0.003)
E.9ComStd.A	4.05(± 0.02)	4.46(± 0.03)	4.40(± 0.03)	4.55(± 0.05)	4.295(± 0.002)
E.9Com.WA	7.1(± 0.1)	7.8(± 0.1)	7.5(± 0.1)	8.2(± 0.1)	7.3(± 0.1)
E.9Com.DA	3.0(± 0.1)	3.1(± 0.1)	2.3(± 0.4)	3.4(± 0.2)	3.0(± 0.1)

Muestra (20mg) pot.	PLSRab.1	PLSRab.1SNV	PLSRab.1SNV	PLSRab.SNV1	PLSRab.1SG
E.8L955(Std.1)A(20mg)	4.39(± 0.02)	4.28(± 0.03)	4.28(± 0.03)	4.34(± 0.03)	4.334(± 0.003)
E.9ComStd.A	4.31(± 0.01)	4.30(± 0.03)	4.30(± 0.03)	4.418(± 0.008)	4.339(± 0.006)
E.9Com.WA	7.37(± 0.06)	7.25(± 0.06)	7.25(± 0.06)	7.46(± 0.06)	7.2(± 0.1)
E.9Com.DA	3.0(± 0.1)	3.0(± 0.1)	3.0(± 0.1)	3.25(± 0.05)	3.02(± 0.06)

5.2 Evaluación quimiométrica

Mediante la evaluación de la capacidad predictiva de cada uno de los métodos desarrollados se determinó el Bias, el PRESS, la Varianza de Predicción, el Error Estándar de Predicción (SEP), el Promedio del Error Estándar de Predicción (MSEP) y el porcentaje del Residual del Error Estándar de Predicción (%RSEP) tanto para todas las muestras de validación (incluyendo todas las presentaciones) como para las de 20mg solamente.

Según se observa en la **Tabla 5.10** los métodos que obtuvieron los valores más bajos para cada uno de estos parámetros fueron PLSRAb.1SG seguido por PLSRAb.2, PLSRAb.1 y PLSRAb.SNV1. Según se observa el método en el que se aplicó la primera derivada y Savitzky-Golay (PLSRAb.1SG) obtuvo valores poco menores para cada uno de los parámetros determinados ante el método en el que se aplicó solamente la segunda derivada (PLSRAb.2) sobre las muestras de todas las presentaciones. Pero PLSRAb.2 tuvo valores poco mejores en cada uno de estos valores que PLSRAb.1SG sobre las muestras de 20mg.

Tabla 5.10: Parámetros de evaluación quimiométrica obtenidas sobre las muestras de validación

	MLRab.20mg	PLSRab.20mgB	MLRab.3	PLSRab.2	PLSRab.1	PLSRab.1SNV	PLSRab.SNV1	PLSRab.1SG
Regiones		760-772 1408-1466 1910-1954		948-990 1324-1448 1850-1950	948-990 1324-1448 1850-1950	948-990 1324-1448 1850-1950	948-990 1324-1448 1850-1950	948-990 1324-1448 1850-1950
Longitud de onda	1876.5		1883.5					
Pre-tratamientos	2da Derivada	2da Derivada	2da Derivada	2da Derivada	1ra Derivada	1ra Derivada SNV	SNV 1ra Derivada	1ra Derivada SG
Factores		4		5	4	5	3	5
SEC	0.11	0.09	0.12	0.09	0.09	0.09	0.10	0.09
SECV		0.10		0.10	0.10	0.10	0.11	0.09
R Squared	0.9841	0.9925	0.9873	0.9931	0.9936	0.9938	0.9910	0.9941
F-Value	1946.1	965.1	2102.2	807.9	1133.9	892.9	1096.0	764.6
PRESS		0.3289		0.3184	0.3229	0.3622	0.4056	0.2801
%RSEC (20mg)	2.1	1.5	3.4	1.7	1.7	1.6	1.9	1.8

Validación con muestras externas

Bias = prom(E) 20mg	0.11	0.02	0.29	0.06	0.11	0.03	0.20	0.06
Bias = prom(E) Todas	0.03	0.01	0.20	0.02	0.06	0.00	0.13	0.02
PRESS (20mg)	3.38	2.43	6.49	0.38	0.49	0.84	1.18	0.43
PRESS (Todas)	3.74	2.51	6.62	0.83	0.97	1.15	1.49	0.80
Var. de Pred. (S²)20mg	0.25	0.19	0.41	0.02	0.03	0.06	0.05	0.03
Var. de Pred. (S²)Todas	0.21	0.15	0.34	0.05	0.05	0.07	0.07	0.05
SEP = (S²)^{1/2} 20mg	0.50	0.43	0.64	0.16	0.16	0.25	0.22	0.17
SEP = (S²)^{1/2} Todas	0.46	0.38	0.58	0.22	0.23	0.26	0.26	0.21
MSEP=PRESS/n 20mg	0.24	0.17	0.46	0.03	0.04	0.06	0.08	0.03
MSEP=PRESS/n Todas	0.21	0.14	0.37	0.05	0.05	0.06	0.08	0.04
RMSEP=(MSEP)^{1/2}20mg	0.49	0.42	0.68	0.16	0.19	0.24	0.29	0.17
RMSEP=(MSEP)^{1/2}Todas	0.46	0.37	0.61	0.22	0.23	0.25	0.29	0.21
%RSEP (20mg)	10.1	9.0	13.8	3.6	4.1	3.8	6.3	3.8
%RSEP (Todas)	9.1	7.5	12.1	4.3	4.6	5.0	5.7	4.2

CAPÍTULO 6

CONCLUSIÓN

Según los datos obtenidos la tecnología de NIR demostró ser una herramienta muy poderosa para la cuantificación del contenido de humedad en el proceso de granulación brindando resultados con una muy buena exactitud con relación a los resultados obtenidos mediante KF. Seis de los métodos creados mediante PLS brindaron resultados entre el 80-120% del valor determinado mediante KF para esas mismas muestras de los cuales tres brindaron resultados entre el 90-110%. Se observó en la mayoría de los métodos creados igual precisión que la técnica de KF y en algunos casos una mayor precisión estadísticamente significativa. Se observó además la sensibilidad a la compactación de la muestra en algunos de los métodos creados mediante NIR.

De todos los métodos creados los que demostraron tener una mejor capacidad predictiva en cuanto a exactitud y precisión se refiere lo fueron el método PLSRAb.2 y PLSRAb.1SG con valores del %RSEP de 4.3 y 4.2 para todas las muestras de validación incluyendo las de otras presentaciones respectivamente. Estadísticamente las diferencias encontradas entre estos dos métodos fue mínima demostrando ambas tener básicamente la misma capacidad predictiva.

Referencias

1. M. Tousey "The Manufacturing Process" *DI Pharma Tech*. **Vol.** (7) 1-12 (2005).
2. E. Scholz. "Karl Fischer Titration. Determination of Water". *Chemical Lab. Practice with Selected Application*. Springer Verlag. Berlin Heidelberg New York **1984**.
3. J. Rivera, and M. Perez "Empleo del Sistema Potenciometrico Karl-Fisher en el Desarrollo y la Certificacion de Materiales de Referencia (MR)". Centro Nacional de Metrologia de Materiales Organicos. Simposio de Metrologia **2006**.
4. R.A. Mattes, R.Schroeder V. Dhopeswarkar, R. Kowal, and W. Randolph "Monitoring Granulation Drying Using Near-Infrared Spectroscopy," *Pharm.Tech.* (2004).
5. D. A. Skoog, F. J. Holler and T. A. Nieman, *Principles of Instrumental Analysis* Chapter 5, 5th ed., Saunders Publishing, Harcourt Brace & Company, FL, 1998.
6. D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, S. N. Deming, Y. Minchotte and L. Kaufmann, *Chemometrics: A textbook*, Elsevier, Amsterdam, 1988.
7. K. Beebe, R. Pell and M. Beth, *Chemometrics: A Practical Guide*, (Wiley & Sons, New York, NY, 1998).
8. ICH Guideline: Q2A Text on Validation of Analytical Procedures 1994, Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology 1996. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use.
9. Note for guidance. The European Agency for the Evaluation of Medical Products. 2003. [http://.emea.eu.int/pdfs/human/qwp/330901en.pdf\(2003\)](http://.emea.eu.int/pdfs/human/qwp/330901en.pdf(2003))
10. Vision User Manual, Foss NIRSystems, Silverspring, Maryland, USA, 2004.
11. Geladi, D. McDougall and H. Martens, *Appl. Spectrosc.*, 1985,, **39**, 491.
12. R.J. Barnes, M.S. Dhanoa and S.J. Lister. Standard Normal Variate transformation and De-trending of Near-Infrared Diffuse Reflectance Spectra. *Appl. Spectrosc.* 1989; **43**,772-777.
13. M. S. Dhanoa, S. J. Lister, R. Sanderson and R. J. Barnes, *J. Near Infrared Spectroscopy.*, 1994, **2**, 43.
14. L.I. Smith, 2002. A tutorial on Principal Components Analysis, 1-20pp.
15. P. Geladi and B. R. Kowalski, *Anal. Chem. Acta*, 1985, **185**, 1.
16. R.D. Maesschalck, D.J. Rimboud, D.L. Massart, "The Mahalanobis Distance Tutorial" *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 50 (2000) 1-18.

17. M. Blanco and M.A. Romero "Near-Infrared Libraries in the Pharmaceutical Industry: a solution for identity confirmation", *The Analyst*, The Royal Society of Chemistry. (2001).
18. R. Kramer, *Chemometrics Techniques for Quantitative Analysis*, (CRC Press, Boca Raton, FL, 1998).
19. D.A. Skoog, D.M. West, F.J. Holler and S.R. Crouch, *Química Analítica Chapter 5 and 7*, 5th edition, Thomson Publishing, Mex., 2005.
20. R.A. Mattes, D.E. Root and A.P. Birkmire "In-line Process Analysis of Residual Moisture in Fluid bed Granulator-Dryer Using NIR Spectroscopy", *Spectroscopy*. (2005).
21. M. Alcalá, M. Blanco, M. Bautista and J.M. Gonzalez "On-Line Monitoring of A Granulation Process by NIR Spectroscopy", *Inter Science*. (2009).
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ips.21818/abstract>
22. G.X. Zhou, Z. Ge, J. Dorwart, B. Izzo, J. Kukura, C. Bicker and J. Wyvratt "Determination and Differentiation of Surface and Bound Water in Drug Substances by Near Infrared Spectroscopy", *Journal of Pharm. Sciences*, Vol. **92** No.5 (2003).
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ips.10375/abstract>

Apéndice A

Tabla A-1a: Primera lectura de los pesos y de datos obtenidos de Karl Fischer para el conjunto de calibración

Muestra	Lectura (mL)	Masa (g)	Blanco (mL)	Factor
Exp.7(52Std.)1	6.7080	0.8000	0.0310	5.3160
Exp.7(53Std.)1	6.7910	0.8083	0.0450	5.3160
Exp.7(54Std.)1	6.7510	0.8021	0.0390	5.3160
Exp.7(56Std)1	6.9230	0.8013	0.0340	5.3616
Exp.7(60Std.)1	6.6470	0.8039	0.0400	5.3616
Exp.7(52D1)1	6.4510	0.8028	0.0470	5.3616
Exp.7(52D2)1	6.8460	0.8099	0.0350	5.3616
Exp.7(53D1)1	6.9590	0.8104	0.0330	5.3616
Exp.7(53D2)1	6.6410	0.8088	0.0310	5.3616
Exp.7(53D3)1	6.4620	0.8048	0.0330	5.3616
Exp.7(53D4)1	4.8100	0.8070	0.0250	5.3616
Exp.7(54D1)1	6.5850	0.8074	0.0380	5.3616
Exp.7(54D2)1	5.9480	0.8089	0.0400	5.3616
Exp.7(56D1)1	6.9310	0.8014	0.0010	5.3410
Exp.7(56D2)1	6.5940	0.8086	0.0250	5.3410
Exp.7(56D3)1	6.4260	0.8039	0.0110	5.3411
Exp.7(60D1)1	6.9310	0.8099	0.0250	5.3411
Exp.7(60D2)1	6.8720	0.8089	0.0190	5.3411
Exp.7(60D3)1	5.4490	0.8117	0.0380	5.3411
Exp.7(52W1)1	6.3380	0.8023	0.0440	5.3411
Exp.7(52W2)1	6.6040	0.8040	0.0580	5.3411
Exp.7(52W3)1	12.9650	0.8039	0.0260	5.3411
Exp.7(52W4)1	12.3440	0.8066	0.0430	5.3411
Exp.7(53W1)1	7.9560	0.8043	0.0330	5.3069
Exp.7(53W2)1	7.7040	0.8003	0.0380	5.3069
Exp.7(53W3)1	6.5910	0.8075	0.0330	5.2807
Exp.7(53W4)1	7.8000	0.8045	0.2300	5.2807
Exp.7(54W1)1	8.3990	0.8024	0.0290	5.2807
Exp.7(54W2)1	7.8980	0.8020	0.0530	5.2807
Exp.7(54W3)1	6.8610	0.8062	0.0180	5.2807
Exp.7(54W4)1	7.1190	0.8021	0.0300	5.2807
Exp.7(56W1)1	7.5200	0.8055	0.0210	5.2807
Exp.7(56W2)1	7.2790	0.8043	0.0120	5.2807
Exp.7(56W3)1	7.2870	0.8085	0.0300	5.2715
Exp.7(60W1)1	7.4180	0.7948	0.0170	5.2715
Exp.7(60W2)1	6.5910	0.8052	0.0450	5.2715

Tabla A-1b: Segunda lectura de los pesos y de datos obtenidos de Karl Fischer para el conjunto de calibración

Muestra	Lectura (mL)	Masa (g)	Blanco (mL)	Factor
Exp.7(52Std.)2	6.6580	0.8036	0.0280	5.3116
Exp.7(53Std.)2	6.6780	0.8045	0.0220	5.3116
Exp.7(54Std.)2	6.6060	0.7995	0.0230	5.3116
Exp.7(56Std.)2	6.6520	0.8047	0.0480	5.3616
Exp.7(60Std.)2	6.7220	0.8048	0.0120	5.3616
Exp.7(52D1)2	6.7480	0.8073	0.0470	5.3616
Exp.7(52D2)2	6.9820	0.8087	0.0550	5.3616
Exp.7(53D1)2	6.9020	0.8048	0.0300	5.3616
Exp.7(53D2)2	6.6940	0.8103	0.0310	5.3616
Exp.7(53D3)2	6.5610	0.8112	0.0600	5.3616
Exp.7(53D4)2	4.8500	0.8043	0.0380	5.3616
Exp.7(54D1)2	6.6300	0.8080	0.0420	5.3616
Exp.7(54D2)2	6.2540	0.8086	0.0650	5.3616
Exp.7(56D1)2	6.9200	0.8027	0.0530	5.3410
Exp.7(56D2)2	6.6950	0.8082	0.0440	5.3410
Exp.7(56D3)2	6.5620	0.8058	0.0240	5.3411
Exp.7(60D1)2	7.0180	0.8052	0.0200	5.3411
Exp.7(60D2)2	6.9050	0.8074	0.0200	5.3411
Exp.7(60D3)2	5.4300	0.8084	0.0400	5.3411
Exp.7(52W1)2	6.3600	0.8025	0.0450	5.3411
Exp.7(52W2)2	6.4520	0.8013	0.0540	5.3411
Exp.7(52W3)2	12.9780	0.8053	0.0470	5.3411
Exp.7(52W4)2	12.0310	0.8083	0.0190	5.3411
Exp.7(53W1)2	8.0020	0.8076	0.0410	5.3069
Exp.7(53W2)2	8.0580	0.8073	0.0440	5.3069
Exp.7(53W3)2	6.6120	0.8100	0.0360	5.2807
Exp.7(53W4)2	7.7360	0.8070	0.0350	5.2807
Exp.7(54W1)2	8.4470	0.8022	0.0500	5.2807
Exp.7(54W2)2	7.7880	0.8019	0.0310	5.2807
Exp.7(54W3)2	6.9110	0.8033	0.0320	5.2807
Exp.7(54W4)2	7.0660	0.8054	0.0320	5.2807
Exp.7(56W1)2	7.4720	0.8044	0.0390	5.2807
Exp.7(56W2)2	7.2230	0.8014	0.0350	5.2807
Exp.7(56W3)2	7.1230	0.8031	0.0000	5.2715
Exp.7(60W1)2	7.5310	0.8075	0.0290	5.2715
Exp.7(60W2)2	6.5230	0.8078	0.0320	5.2715

Tabla A-1c: Tercera lectura de los pesos y de datos obtenidos de Karl Fischer para el conjunto de calibración

Muestra	Lectura (mL)	Masa (g)	Blanco (mL)	Factor
Exp.7(52Std.)3	6.7850	0.8049	0.0020	5.3116
Exp.7(53Std.)3	6.6790	0.8036	0.0450	5.3116
Exp.7(54Std.)3	6.5400	0.8020	0.0320	5.3116
Exp.7(56Std.)3	6.9080	0.8071	0.0440	5.3616
Exp.7(60Std.)3	*	*	*	*
Exp.7(52D1)3	6.4960	0.8021	0.2600	5.3616
Exp.7(52D2)3	6.9300	0.8025	0.0430	5.3616
Exp.7(53D1)3	6.9050	0.8073	0.0580	5.3616
Exp.7(53D2)3	6.4040	0.8039	0.0350	5.3616
Exp.7(53D3)3	6.7010	0.8115	0.0760	5.3616
Exp.7(53D4)3	4.8500	0.8075	0.0510	5.3616
Exp.7(54D1)3	6.7090	0.8114	0.0300	5.3616
Exp.7(54D2)3	6.4830	0.8064	0.0370	5.3616
Exp.7(56D1)3	6.8660	0.8043	0.0200	5.3410
Exp.7(56D2)3	6.5870	0.8034	0.0150	5.3410
Exp.7(56D3)3	6.6840	0.8060	0.0320	5.3411
Exp.7(60D1)3	6.9860	0.8036	0.0180	5.3411
Exp.7(60D2)3	6.8920	0.8044	0.0210	5.3411
Exp.7(60D3)3	5.3600	0.8054	0.0190	5.3411
Exp.7(52W1)3	6.5550	0.8042	0.0380	5.3411
Exp.7(52W2)3	6.8040	0.8066	0.0280	5.3411
Exp.7(52W3)3	12.9800	0.8038	0.0410	5.3411
Exp.7(52W4)3	12.1620	0.8013	0.0390	5.3411
Exp.7(53W1)3	8.1710	0.8092	0.0350	5.3069
Exp.7(53W2)3	7.8490	0.8080	0.0230	5.3069
Exp.7(53W3)3	*	*	*	*
Exp.7(53W4)3	7.8480	0.8029	0.0460	5.2807
Exp.7(54W1)3	8.4940	0.8010	0.0220	5.2807
Exp.7(54W2)3	7.7560	0.8042	0.0360	5.2807
Exp.7(54W3)3	6.7460	0.8066	0.0370	5.2807
Exp.7(54W4)3	*	*	*	*
Exp.7(56W1)3	7.4960	0.8037	0.0500	5.2807
Exp.7(56W2)3	7.3630	0.8025	0.0370	5.2807
Exp.7(56W3)3	7.2310	0.8020	0.0160	5.2715
Exp.7(60W1)3	7.6080	0.8072	0.0410	5.2715
Exp.7(60W2)3	6.7220	0.8051	0.0390	5.2715

* Muestras perdidas

Sec A-1: Determinación del contenido de humedad mediante Karl Fischer:

$$\% \text{ de humedad} = \frac{(V_{\text{muestra}} - V_{\text{blanco}}) \times F \times 100}{M_{\text{muestra}} \times 1000}$$

donde;

V_{muestra} = volumen en mL que se requirió para la titulación de la muestra

V_{blanco} = volumen en mL que se requirió para la titulación del blanco

F = factor determinado diariamente

M_{muestra} = masa de la muestra vertida en la solución

Ejemplo para la muestra **Exp.7(52Std.)**:

Muestra	Lectura en (mL)	Masa (g)	Blanco (mL)	Factor
Exp.7(52Std.)1	6.7080	0.8000	0.0310	5.3160

$$\% \text{ de humedad} = \frac{(6.7080 - 0.0310) \times 5.3160 \times 100}{0.8000 \times 1000}$$

$$n_1 = 4.4369$$

Muestra	Lectura en (mL)	Masa (g)	Blanco (mL)	Factor
Exp.7(52Std.)2	6.6580	0.8036	0.0280	5.3116

$$n_2 = 4.3823$$

Muestra	Lectura en (mL)	Masa (g)	Blanco (mL)	Factor
Exp.7(52Std.)3	6.7850	0.8049	0.0020	5.3116

$$n_3 = 4.4762$$

$$\text{Valor promedio de Karl Fischer} = \frac{\sum_{i=1}^n n_i}{N}$$

$$= \frac{(4.4369 + 4.3823 + 4.4762)}{3}$$

$$= 4.4318 \text{ (valor reportado en la Tabla 4.5 a tres cifras)}$$

Tabla A-2: Valores de humedad y el promedio obtenidos mediante KF para el conjunto de calibración (Tabla 4.5 y 4.6 del texto)

Muestra	% de humedad mediante KF			
	1ra lectura	2da lectura	3ra lectura	Promedio
Exp.7(52Std.)	4.4369	4.3823	4.4762	4.4318
Exp.7(53Std.)	4.44	4.39	4.38	4.41
Exp.7(54Std.)	4.45	4.37	4.31	4.38
Exp.7(56Std)	4.61	4.40	4.56	4.52
Exp.7(60Std.)	4.41	4.47	*	4.44
Exp.7(52D1)	4.28	4.45	4.17	4.30
Exp.7(52D2)	4.51	4.59	4.60	4.57
Exp.7(53D1)	4.58	4.58	4.55	4.57
Exp.7(53D2)	4.38	4.41	4.25	4.35
Exp.7(53D3)	4.28	4.30	4.38	4.32
Exp.7(53D4)	3.18	3.21	3.19	3.19
Exp.7(54D1)	4.35	4.37	4.41	4.38
Exp.7(54D2)	3.92	4.10	4.29	4.10
Exp.7(56D1)	4.62	4.57	4.55	4.58
Exp.7(56D2)	4.34	4.40	4.37	4.37
Exp.7(56D3)	4.26	4.33	4.41	4.33
Exp.7(60D1)	4.55	4.64	4.63	4.61
Exp.7(60D2)	4.52	4.55	4.56	4.55
Exp.7(60D3)	3.56	3.56	3.54	3.55
Exp.7(52W1)	4.19	4.20	4.33	4.24
Exp.7(52W2)	4.35	4.26	4.49	4.37
Exp.7(52W3)	8.60	8.58	8.60	8.59
Exp.7(52W4)	8.15	7.94	8.08	8.05
Exp.7(53W1)	5.23	5.23	5.34	5.26
Exp.7(53W2)	5.08	5.27	5.14	5.16
Exp.7(53W3)	4.29	4.29	*	4.29
Exp.7(53W4)	4.97	5.04	5.13	5.05
Exp.7(54W1)	5.51	5.53	5.59	5.54
Exp.7(54W2)	5.17	5.11	5.07	5.11
Exp.7(54W3)	4.48	4.52	4.39	4.47
Exp.7(54W4)	4.67	4.61	*	4.64
Exp.7(56W1)	4.92	4.88	4.89	4.90
Exp.7(56W2)	4.77	4.74	4.82	4.78
Exp.7(56W3)	4.73	4.68	4.74	4.72
Exp.7(60W1)	4.91	4.90	4.94	4.92
Exp.7(60W2)	4.29	4.24	4.38	4.30

* Muestras perdidas

Tabla A-3: Valores de humedad obtenidos mediante KF para el conjunto de muestras de validación (Tabla 4. del texto)

Muestra	Lectura (mL)	Masa (g)	Blanco (mL)	Factor	KF (%)
E.8L955(Std.1)A(20mg)	6.9640	0.8093	0.0430	5.2544	4.49
E.8L955(Std.2)A(20mg)	6.8720	0.8022	0.0370	5.2544	4.48
E.8L955(Std.3)A(20mg)	6.8420	0.8029	0.0360	5.2544	4.45
E.8L955(H1)A(20mg)	5.8510	0.8042	0.0390	5.2544	3.80
E.8L955(W1)A(20mg)	13.3680	0.8057	0.0450	5.2544	8.69
E.8L017(Std.1)A(2mg)	7.1740	0.8026	0.0330	5.2544	4.68
E.8L266(Std.1)A(5mg)	6.9750	0.8064	0.0190	5.2544	4.53
E.8L251(Std.1)A(15mg)	6.0910	0.8021	0.0260	5.2544	3.97
E.8L006(Std.1)A(10/30)	6.4300	0.8031	0.0230	5.2544	4.19
E.9ComStd.A	6.3110	0.8046	0.0000	5.1862	4.07
E.9ComStd.B	6.3010	0.8072	0.0000	5.1862	4.05
E.9ComStd.C	6.2610	0.8053	0.0000	5.1862	4.03
E.9Com.WA	10.9680	0.8013	0.0190	5.1862	7.09
E.9Com.WB	11.1630	0.8009	0.0010	5.1862	7.23
E.9Com.WC	10.7330	0.8013	0.0000	5.1862	6.95
E.9Com.DA	4.5470	0.8073	0.0000	5.1862	2.92
E.9Com.DB	4.6020	0.8080	0.0000	5.1862	2.95
E.9Com.DC	4.7630	0.8083	0.0240	5.1862	3.04

Apendice B

Tabla B-1a: Valores de los % de humedad de las muestras de calibración determinadas mediante KF y NIR por las distintas regresiones

Muestra (20mg)	KF (%)	MLRAb.20mg (%)	PLSRAb.20mgB (%)	MLRAb.3 (%)	PLSRAb.2 (%)
Exp.7(53D4)	3.19	3.30	3.16	3.42	3.15
Exp.7(60D3)	3.55	3.64	3.62	3.58	3.62
Exp.7(54D2)	4.10	4.16	4.20	4.02	4.29
Exp.7(52W1)	4.24	4.27	4.14	4.10	4.30
Exp.7(53W3)	4.29	4.48	4.41	4.32	4.39
Exp.7(52D1)	4.30	4.47	4.51	4.48	4.44
Exp.7(60W2)	4.30	4.40	4.33	4.23	4.38
Exp.7(53D3)	4.32	4.40	4.37	4.36	4.37
Exp.7(56D3)	4.33	4.25	4.26	4.04	4.30
Exp.7(53D2)	4.35	4.34	4.38	4.60	4.53
Exp.7(52W2)	4.37	4.38	4.33	4.34	4.36
Exp.7(56D2)	4.37	4.29	4.38	4.20	4.32
Exp.7(54Std.)	4.38	4.43	4.45	4.57	4.39
Exp.7(54D1)	4.38	4.36	4.37	4.28	4.38
Exp.7(53Std.)	4.41	4.42	4.43	4.57	4.36
Exp.7(52Std.)	4.43	4.42	4.49	4.63	4.39
Exp.7(60Std.)	4.44	4.28	4.39	4.39	4.40
Exp.7(54W3)	4.47	4.54	4.43	4.37	4.41
Exp.7(56Std)	4.52	4.45	4.42	4.56	4.38
Exp.7(60D2)	4.55	4.36	4.40	4.26	4.43
Exp.7(52D2)	4.57	4.52	4.56	4.49	4.52
Exp.7(53D1)	4.57	4.57	4.61	4.25	4.39
Exp.7(56D1)	4.58	4.50	4.42	4.37	4.43
Exp.7(60D1)	4.61	4.47	4.56	4.36	4.48
Exp.7(54W4)	4.64	4.41	4.59	4.33	4.66
Exp.7(56W3)	4.72	4.66	4.65	4.58	4.65
Exp.7(56W2)	4.78	4.67	4.75	4.59	4.77
Exp.7(56W1)	4.90	4.91	4.87	4.88	4.91
Exp.7(60W1)	4.92	4.98	4.88	4.93	4.92
Exp.7(53W4)	5.05	5.20	5.14	5.14	5.13
Exp.7(54W2)	5.11	5.03	5.10	4.95	5.10
Exp.7(53W2)	5.16	5.18	5.08	5.18	5.12
Exp.7(53W1)	5.26	5.33	5.31	5.30	5.34
Exp.7(54W1)	5.54	5.72	5.56	5.69	5.53
Exp.7(52W4)	8.05	8.08	8.03	8.08	8.08
Exp.7(52W3)	8.59	8.51	8.59	8.53	8.55

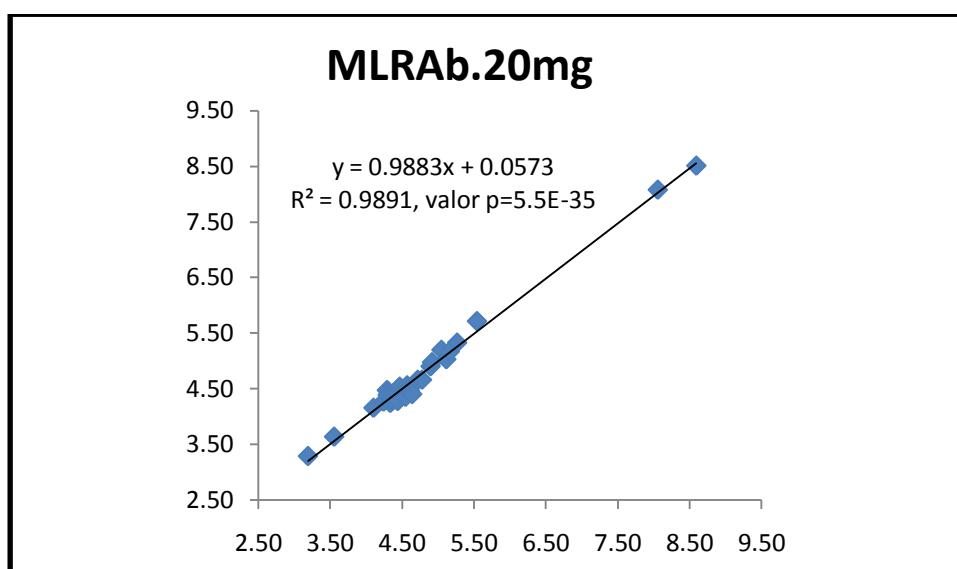
Tabla B-1b: Valores de los % de humedad de las muestras de calibración determinadas mediante KF y NIR por las distintas regresiones

Muestra (20mg)	KF (%)	PLSRAb.1 (%)	PLSRAb.1SNV (%)	PLSRAb.SNV1 (%)	PLSRAb.1SG (%)
Exp.7(53D4)	3.19	3.14	3.17	3.18	3.15
Exp.7(60D3)	3.55	3.62	3.59	3.60	3.62
Exp.7(54D2)	4.10	4.27	4.20	4.29	4.32
Exp.7(52W1)	4.24	4.29	4.25	4.30	4.33
Exp.7(53W3)	4.29	4.36	4.41	4.35	4.42
Exp.7(52D1)	4.30	4.46	4.48	4.45	4.46
Exp.7(60W2)	4.30	4.35	4.37	4.33	4.41
Exp.7(53D3)	4.32	4.38	4.39	4.39	4.40
Exp.7(56D3)	4.33	4.30	4.27	4.27	4.33
Exp.7(53D2)	4.35	4.55	4.57	4.54	4.55
Exp.7(52W2)	4.37	4.33	4.35	4.36	4.40
Exp.7(56D2)	4.37	4.29	4.26	4.33	4.36
Exp.7(54Std.)	4.38	4.39	4.41	4.47	4.43
Exp.7(54D1)	4.38	4.39	4.37	4.39	4.41
Exp.7(53Std.)	4.41	4.37	4.37	4.47	4.40
Exp.7(52Std.)	4.43	4.44	4.42	4.50	4.40
Exp.7(60Std.)	4.44	4.41	4.38	4.47	4.44
Exp.7(54W3)	4.47	4.39	4.46	4.37	4.45
Exp.7(56Std)	4.52	4.39	4.40	4.48	4.42
Exp.7(60D2)	4.55	4.46	4.44	4.41	4.45
Exp.7(52D2)	4.57	4.58	4.57	4.52	4.52
Exp.7(53D1)	4.57	4.45	4.43	4.40	4.41
Exp.7(56D1)	4.58	4.45	4.50	4.42	4.46
Exp.7(60D1)	4.61	4.48	4.49	4.46	4.51
Exp.7(54W4)	4.64	4.64	4.61	4.56	4.68
Exp.7(56W3)	4.72	4.65	4.71	4.61	4.67
Exp.7(56W2)	4.78	4.75	4.76	4.71	4.79
Exp.7(56W1)	4.90	4.86	4.87	4.88	4.92
Exp.7(60W1)	4.92	4.91	4.93	4.91	4.93
Exp.7(53W4)	5.05	5.10	5.11	5.12	5.13
Exp.7(54W2)	5.11	5.09	5.07	5.07	5.09
Exp.7(53W2)	5.16	5.10	5.11	5.11	5.11
Exp.7(53W1)	5.26	5.36	5.33	5.38	5.32
Exp.7(54W1)	5.54	5.53	5.49	5.59	5.51
Exp.7(52W4)	8.05	8.10	8.08	8.13	8.08
Exp.7(52W3)	8.59	8.55	8.57	8.49	8.56

Sec. B-1: Regresiones:

A continuación se ilustraran todas las curvas de calibración realizadas con distintas regiones y pre-tratamientos aplicados. También se mostrara el análisis de la regresión para cada una de las regresiones, así como las ecuaciones de las regresiones corregidas, Límite de Detección (LD) y el Límite de Cuantificación (LQ) calculados de la curva de calibración.

Figura B-1.1: Regresión de calibración MLRAb.20mg



Sec. B-1.1: Análisis de la Varianza (ANOVA) para la regresión de calibración MLRAb.20mg:

SUMMARY OUTPUT

Regression Statistics	
Multiple R	0.99455842
R Square	0.989146451
Adjusted R Square	0.988827229
Standard Error	0.103959975
Observations	36

ANOVA					Significance F
	df	SS	MS	F	
Regression	1	33.48883805	33.48883805	3098.62	5.49497E-35
Residual	34	0.367460995	0.010807676		
Total	35	33.85629904			

	<i>Coefficients</i>	<i>Standard Error</i>	<i>t Stat</i>	<i>P-value</i>	<i>Lower 95%</i>	<i>Upper 95%</i>	<i>Lower 95.0%</i>	<i>Upper 95.0%</i>
Intercept	-0.00595823	0.086843587	-0.06860875	0.9457	-0.18244563	0.1705292	0.18244563	0.170529172
X Variable 1	1.000844927	0.01797972	55.66521297	5.5E-35	0.964305741	1.0373841	0.96430574	1.037384114

RESIDUAL OUTPUT

<i>Observation</i>	<i>Predicted Y</i>	<i>Residuals</i>	<i>Standard Residuals</i>
1	3.29282665	-0.101737387	-0.99290793
2	3.641220769	-0.086676915	0.845924971
3	4.160559202	-0.058708721	0.572968858
4	4.269751384	-0.029307847	0.286030483
5	4.47662603	-0.188729117	1.841905338
6	4.469520031	-0.17091446	1.668042867
7	4.393555901	-0.094490521	-0.922182
8	4.40266359	-0.083668288	0.816562216
9	4.24783288	0.086759227	0.846728297
10	4.333305036	0.012827403	0.125189275
11	4.375340523	-0.008633337	0.084257215
12	4.29126955	0.076520234	0.74680065
13	4.424582094	-0.047190695	0.460558467
14	4.36122861	0.016278533	0.158870648
15	4.420078292	-0.014701448	0.143479054
16	4.420678799	0.01108493	0.108183578
17	4.282061776	0.156313346	1.525543018
18	4.539078753	-0.073594094	0.718242938
19	4.447301274	0.075849381	0.740253451
20	4.356924977	0.190334645	1.85757452
21	4.519262024	0.048322687	0.471606165
22	4.562998947	0.006249838	0.060995406
23	4.495642084	0.082305936	0.803266318
24	4.466917834	0.142267674	1.388464015
25	4.406366716	0.233150338	2.275435071
26	4.662883271	0.053619461	0.523300132
27	4.664884961	0.111176528	1.085029395
28	4.905888419	-0.009892123	0.096542359
29	4.978850014	-0.062902217	-0.61389536
30	5.201337842	-0.1548846	1.511599141
31	5.032895641	0.081340853	0.793847571
32	5.173614437	-0.00974099	0.095067372
33	5.330647006	-0.065710539	0.641303232
34	5.71767374	-0.177330646	1.730661746
35	8.078566839	-0.024113614	0.235337265
36	8.511732523	0.078526547	0.766381303

Sec. B-1.1.1: Ejemplo de la corrección de la ecuación de la curva de calibración MLRAb.20mg:

La ecuación de la curva corregida se determino utilizando los valores de el coeficiente de la pendiente y el intercepto con sus respectivos errores para determinar el número de cifras significativas obtenidos del análisis de la regresión.

$$y = 1.00(\pm 0.02)x - 0.01(\pm 0.09)$$

Sec. B-1.1.2: Determinación del Límite de Detección (LD) y Límite de Cuantificación (LQ) para la regresión de calibración MLRAb.20mg:

Tanto el LD y el LQ fueron determinados utilizando los valores de el coeficiente de la pendiente y el intercepto obtenidos del análisis de la regresión.

Ejemplo:

$$\begin{aligned} \text{LD} &= \frac{3.3 S_b}{M} \\ &= 3.3 \frac{(0.086843587)}{1.000844927} \\ &= 0.29 \end{aligned}$$

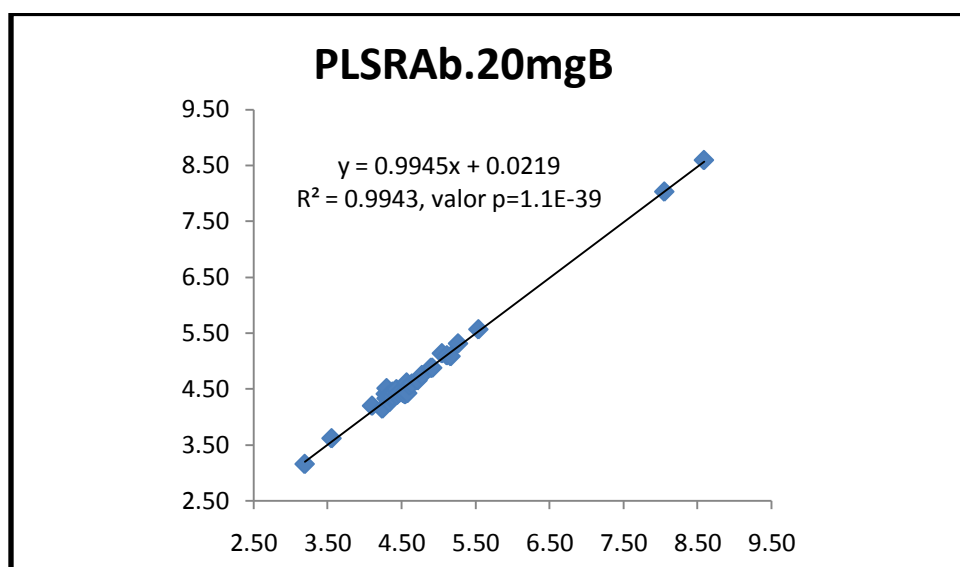
$$\begin{aligned} \text{LQ} &= \frac{10 S_b}{M} \\ &= 10 \frac{(0.086843587)}{1.000844927} \\ &= 0.87 \end{aligned}$$

Donde:

S_b = desviación estándar del blanco

M = pendiente de la curva de calibración

Figura B.1.2: Regresión de calibración *PLSRAb.20mgB*



Sec. B-1.2: Análisis de la regresión de calibración *PLSRAb.20mgB*:

SUMMARY OUTPUT

<i>Regression Statistics</i>	
Multiple R	0.997123171
R Square	0.994254617
Adjusted R Square	0.994085635
Standard Error	0.075637953
Observations	36

ANOVA					
	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>Significance F</i>
Regression	1	33.66178164	33.66178164	5883.7955	1.1031E-39
Residual	34	0.194517396	0.0057211		
Total	35	33.85629904			

	<i>Coefficients</i>	<i>Standard Error</i>	<i>t Stat</i>	<i>P-value</i>	<i>Lower 95%</i>	<i>Upper 95%</i>	<i>Lower 95.0%</i>	<i>Upper 95.0%</i>
Intercept	0.005253811	0.062885365	0.083545848	0.9339075	0.12254463	0.13305225	0.1225446	0.133052247
X Variable 1	0.999759246	0.013033668	76.70590262	1.103E-39	0.97327165	1.02624685	0.9732716	1.026246845

RESIDUAL OUTPUT

<i>Observation</i>	<i>Predicted Y</i>	<i>Residuals</i>	<i>Standard Residuals</i>
1	3.160094087	0.030995176	0.415765939
2	3.61948346	0.064939606	-0.871092848
3	4.201343341	-0.09949286	-1.33458646
4	4.148855981	0.091587556	1.228545562
5	4.414492012	0.126595099	-1.698132962
6	4.51536772	-0.21676215	-2.907624022
7	4.334211345	0.035145964	-0.471444164
8	4.373701835	0.054706533	-0.733827513
9	4.265827812	0.068764294	0.922396806
10	4.385898898	0.039766459	-0.533422975
11	4.333311561	0.033395625	0.447965298
12	4.38020027	0.012410487	-0.166472928
13	4.452382888	0.074991489	-1.005927715
14	4.373601859	0.003905284	0.052385057
15	4.429788329	0.024411485	-0.327453016
16	4.496772198	-0.06500847	-0.872016582
17	4.3941969	0.044178223	0.592601899
18	4.430888064	0.034596595	0.464074985
19	4.427688834	0.09546182	1.280514532
20	4.406094035	0.141165587	1.893579913
21	4.561456621	0.00612809	0.08220153
22	4.616943259	0.047694475	-0.639768524
23	4.426589099	0.15135892	2.030312183
24	4.565555634	0.043629873	0.585246403
25	4.596748123	0.042768931	0.573697813
26	4.655234039	0.061268694	0.821851627
27	4.750011215	0.026050273	0.349435547
28	4.877780447	0.01821585	0.244345436
29	4.880379821	0.035567977	0.477104994
30	5.139817345	0.093364103	-1.252375973
31	5.102826253	0.01141024	0.153055731
32	5.087329985	0.076543463	1.026745731
33	5.315475044	0.050538577	-0.677919005
34	5.568414134	0.028071039	-0.376541886
35	8.031720939	0.022732286	0.304928421
36	8.596085033	0.005825963	-0.078148836

PROBABILITY OUTPUT

<i>Percentile</i>	<i>Y</i>
1.38888889	3.19108926
4.16666667	3.55454385
6.94444444	4.10185048
9.72222222	4.24044354
12.5	4.28789691
15.2777778	4.29860557
18.0555556	4.29906538
20.8333333	4.3189953
23.6111111	4.33459211
26.3888889	4.34613244
29.1666667	4.36670719
31.9444444	4.36778978
34.7222222	4.3773914
37.5	4.37750714
40.2777778	4.40537684
43.0555556	4.43176373
45.8333333	4.43837512
48.6111111	4.46548466
51.3888889	4.52315065
54.1666667	4.54725962
56.9444444	4.56758471
59.7222222	4.56924878
62.5	4.57794802
65.2777778	4.60918551
68.0555556	4.63951705
70.8333333	4.71650273
73.6111111	4.77606149
76.3888889	4.8959963
79.1666667	4.9159478
81.9444444	5.04645324
84.7222222	5.11423649
87.5	5.16387345
90.2777778	5.26493647
93.0555556	5.54034309
95.8333333	8.05445322
98.6111111	8.59025907

Sec. B-1.2.1: Ecuación de la curva de calibración de calibración PLSRAb.20mgB
Corregida:

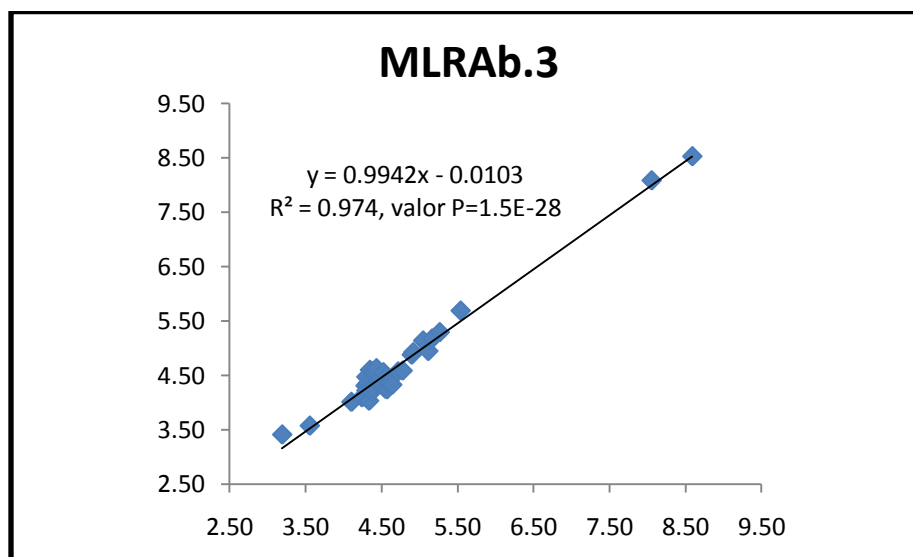
$$Y = 1.00(\pm 0.01)x + 0.01(\pm 0.06)$$

Sec. B-1.2.2: Límite de Detección (LD) y Límite de Cuantificación (LQ) para la regresión PLSRAb.20mgB:

$$LD = 0.21$$

$$LQ = 0.63$$

Figura B-1.3: Regresión MLRAb.3



Sec. B-1.3: Análisis de la regresión MLRAb.3

SUMMARY OUTPUT

Regression Statistics	
Multiple R	0.986930138
R Square	0.974031098
Adjusted R Square	0.973267307
Standard Error	0.160807787
Observations	36

ANOVA					
	df	SS	MS	F	Significance F
Regression	1	32.97708813	32.97708813	1275.2583	1.52796E-28
Residual	34	0.879210913	0.025859145		
Total	35	33.85629904			

	<i>Coefficients</i>	<i>Standard Error</i>	<i>t Stat</i>	<i>P-value</i>	<i>Lower 95%</i>	<i>Upper 95%</i>	<i>Lower 95.0%</i>	<i>Upper 95.0%</i>
Intercept	0.132929079	0.131518922	1.01072209	0.3192886	-0.13434953	0.4002077	0.13434953	0.40020768
X Variable 1	0.979704815	0.027434444	35.71075859	1.528E-28	0.923951317	1.0354583	0.92395132	1.03545831

RESIDUAL OUTPUT				PROBABILITY OUTPUT	
<i>Observation</i>	<i>Predicted Y</i>	<i>Residuals</i>	<i>Standard Residuals</i>	<i>Percentile</i>	<i>Y</i>
1	3.482245932	0.291156669	-1.837021459	1.388888889	3.1910893
2	3.640860142	0.086316287	-0.544603264	4.166666667	3.5545439
3	4.069089116	0.032761365	0.20670428	6.944444444	4.1018505
4	4.15128635	0.089157186	0.562527604	9.722222222	4.2404435
5	4.36074724	0.072850327	-0.459641244	12.5	4.2878969
6	4.518675656	0.220070086	-1.388508362	15.277777778	4.2986056
7	4.274337275	0.024728105	0.1560193	18.055555556	4.2990654
8	4.408164953	0.089169651	-0.562606252	20.833333333	4.3189953
9	4.090054799	0.244537307	1.542881646	23.611111111	4.3345921
10	4.643783961	0.297651522	-1.87800003	26.388888889	4.3461324
11	4.384847978	0.018140792	-0.114457363	29.166666667	4.3667072
12	4.246415688	0.121374095	0.765796704	31.944444444	4.3677898
13	4.612825289	-0.23543389	-1.485444621	34.722222222	4.3773914
14	4.323714398	0.053792745	0.339399497	37.5	4.3775071
15	4.608024735	0.202647892	-1.278584916	40.277777778	4.4053768
16	4.673762929	-0.2419992	-1.526867735	43.055555556	4.4317637
17	4.434421042	0.00395408	0.02494784	45.833333333	4.4383751
18	4.410124363	0.055360296	0.349289792	48.611111111	4.4654847
19	4.601166802	0.078016147	-0.492234427	51.388888889	4.5231507
20	4.307647239	0.239612383	1.511808368	54.166666667	4.5472596
21	4.531901671	0.03568304	0.225138272	56.944444444	4.5675847
22	4.293245578	0.276003207	1.741412328	59.722222222	4.5692488
23	4.411397979	0.166550041	1.050829436	62.5	4.577948
24	4.401698901	0.207486606	1.309114263	65.277777778	4.6091855
25	4.378283956	0.261233098	1.648221926	68.055555556	4.6395171
26	4.615274551	0.101228181	0.638688241	70.833333333	4.7165027
27	4.63134171	0.144719778	0.913093762	73.611111111	4.7760615
28	4.917415516	-0.02141922	-0.135142247	76.388888889	4.8959963
29	4.960228617	0.044280819	-0.27938503	79.166666667	4.9159478
30	5.171746886	0.125293644	-0.790526672	81.944444444	5.0464532
31	4.983447621	0.130788873	0.825198221	84.722222222	5.1142365
32	5.207408142	0.043534694	-0.274677435	87.5	5.1638734
33	5.322817369	0.057880901	-0.365193276	90.277777778	5.2649365
34	5.709800771	0.169457677	-1.069174852	93.055555556	5.5403431
35	8.052079044	0.002374181	0.014979637	95.833333333	8.0544532
36	8.486284218	0.103974852	0.656018065	98.611111111	8.5902591

Sec. B-1.3.1: Ecuación de la curva de calibración MLRAb.3 corregida:

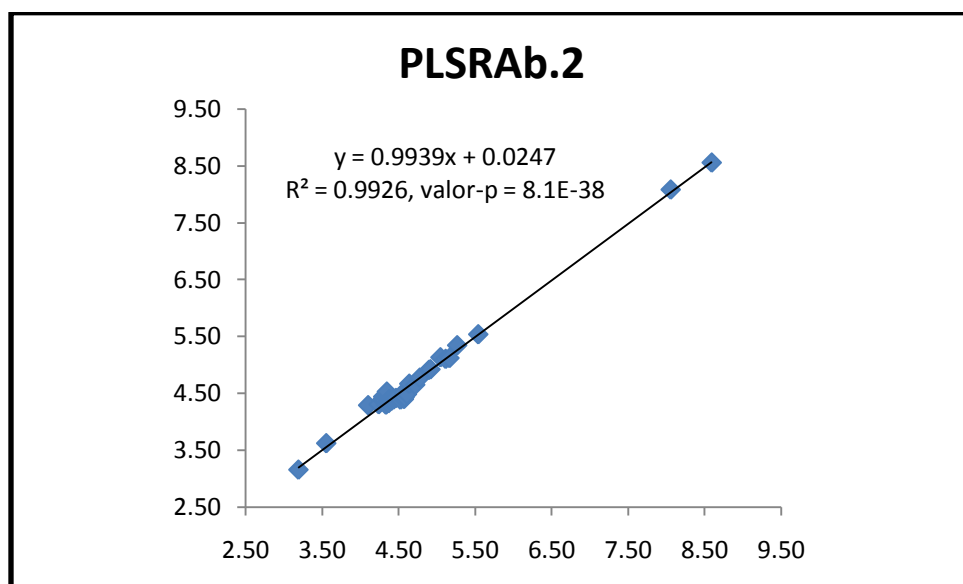
$$Y = 0.98(\pm 0.03)x + 0.1(\pm 0.1)$$

Sec. B-1.3.2: Límite de Detección (LD) y Límite de Cuantificación (LQ) para la regresión de calibración MLRAb.3:

$$LD = 0.44$$

$$LQ = 1.34$$

Figura B-1.4: Regresión de calibración PLSRAb.2



Sec. B-1.4: Análisis de la regresión de calibración PLSRAb.2

SUMMARY OUTPUT

Regression Statistics	
Multiple R	0.996295492
R Square	0.992604707
Adjusted R Square	0.992387198
Standard Error	0.085813967
Observations	36

ANOVA					
	df	SS	MS	F	Significance F
Regression	1	33.60592178	33.60592178	4563.518861	8.0681E-38
Residual	34	0.250377258	0.007364037		
Total	35	33.85629904			

	<i>Coefficients</i>	<i>Standard Error</i>	<i>t Stat</i>	<i>P-value</i>	<i>Lower 95%</i>	<i>Upper 95%</i>	<i>Lower 95.0%</i>	<i>Upper 95.0%</i>
Intercept	0.010354851	0.071328611	0.145171079	0.885432999	0.134602325	0.155312	-0.134602	0.155312028
X Variable 1	0.998735851	0.014784298	67.55382196	8.0681E-38	0.968690542	1.0287812	0.9686905	1.02878116

RESIDUAL OUTPUT

<i>Observation</i>	<i>Predicted Y</i>	<i>Residuals</i>	<i>Standard Residuals</i>
1	3.158969495	0.032119768	0.379759795
2	3.623581413	0.069037558	-0.816247766
3	4.291036582	0.189186101	-2.236793069
4	4.30771547	0.067271934	-0.795372363
5	4.390610546	0.102713633	-1.214408147
6	4.441246454	0.142640883	-1.686477693
7	4.38182167	-0.08275629	-0.978447653
8	4.374231278	0.055235976	-0.653068315
9	4.299925331	0.034666776	0.409873686
10	4.530133944	0.184001505	-2.175494343
11	4.367739495	0.001032309	-0.012205236
12	4.326891199	0.040898585	0.483553867
13	4.392508144	0.015116745	-0.178728936
14	4.385916487	0.008409344	-0.099425714
15	4.36953722	0.035839624	0.423740556
16	4.39101004	0.040753688	0.481840719
17	4.403693986	0.034681137	0.410043474
18	4.417376667	0.048107992	0.568792439
19	4.388912695	0.13423796	1.587127897
20	4.435953154	0.111306468	1.316003319
21	4.520346333	0.047238378	0.558510778
22	4.399699042	0.169549743	2.004627654
23	4.434854544	0.143093475	1.691828802
24	4.48628944	0.122896067	1.453029956
25	4.668558733	-0.02904168	-0.343366808
26	4.651380477	0.065122256	0.769956193
27	4.774224986	0.001836502	0.021713408
28	4.91055243	0.014556134	-0.172100692
29	4.921538524	0.005590727	-0.066100515
30	5.132671283	0.086218041	-1.019376771
31	5.104706679	0.009529814	0.112673298
32	5.120087211	0.043786236	0.51769527
33	5.343903916	0.078967448	-0.933651258
34	5.537159303	0.003183791	0.037642737
35	8.07884217	0.024388945	-0.2883564
36	8.552942078	0.037316992	0.441207834

PROBABILITY OUTPUT

<i>Percentile</i>	<i>Y</i>
1.388888889	3.1910893
4.166666667	3.5545439
6.944444444	4.1018505
9.722222222	4.2404435
12.5	4.2878969
15.277777778	4.2986056
18.055555556	4.2990654
20.833333333	4.3189953
23.611111111	4.3345921
26.388888889	4.3461324
29.166666667	4.3667072
31.944444444	4.3677898
34.722222222	4.3773914
37.5	4.3775071
40.277777778	4.4053768
43.055555556	4.4317637
45.833333333	4.4383751
48.611111111	4.4654847
51.388888889	4.5231507
54.166666667	4.5472596
56.944444444	4.5675847
59.722222222	4.5692488
62.5	4.577948
65.277777778	4.6091855
68.055555556	4.6395171
70.833333333	4.7165027
73.611111111	4.7760615
76.388888889	4.8959963
79.166666667	4.9159478
81.944444444	5.0464532
84.722222222	5.1142365
87.5	5.1638734
90.277777778	5.2649365
93.055555556	5.5403431
95.833333333	8.0544532
98.611111111	8.5902591

Sec. B-1.4.1: Ecuación de la curva de calibración PLSRab.2 corregida:

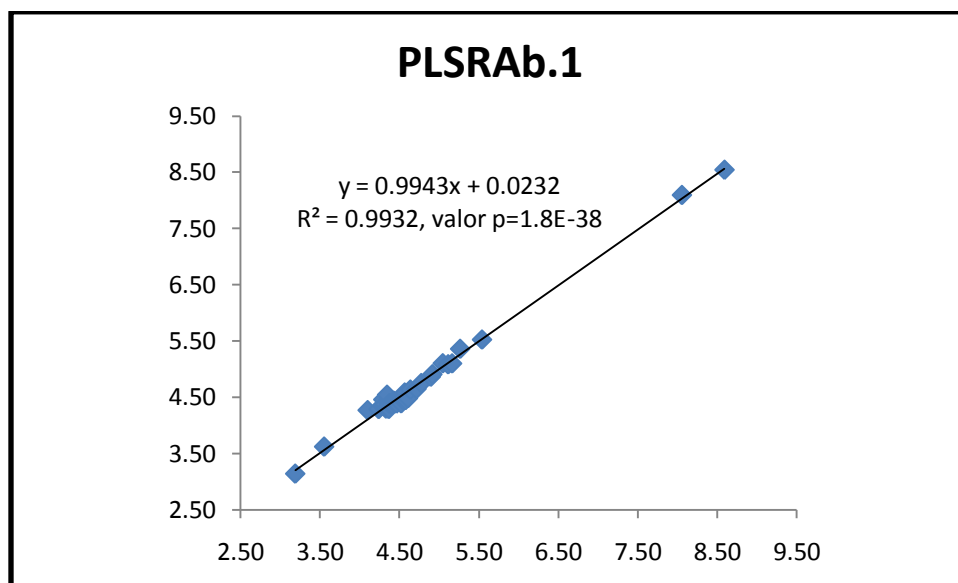
$$Y = 1.00(\pm 0.01)x + 0.01(\pm 0.07)$$

Sec. B-1.4.2: Límite de Detección (LD) y Límite de Cuantificación (LQ) para la regresión de calibración PLSRab.2:

$$LD = 0.24$$

$$LQ = 0.71$$

Figura B-1.5: Regresión de calibración PLSRab.1



Sec. B-1.5: Análisis de la regresión de calibración PLSRab.1

SUMMARY OUTPUT

<i>Regression Statistics</i>	
Multiple R	0.996610534
R Square	0.993232556
Adjusted R Square	0.993033513
Standard Error	0.082090447
Observations	36

ANOVA					
	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>Significance F</i>
Regression	1	33.62717843	33.62717843	4990.0533	1.78492E-38
Residual	34	0.229120611	0.006738841		
Total	35	33.85629904			

	<i>Coefficients</i>	<i>Standard Error</i>	<i>t Stat</i>	<i>P-value</i>	<i>Lower 95%</i>	<i>Upper 95%</i>	<i>Lower 95.0%</i>	<i>Upper 95.0%</i>
Intercept	0.008868079	0.068233536	0.12996657	0.8973588	-0.12979915	0.14753531	-0.129799	0.14753531
X Variable 1	0.998959406	0.014141492	70.64030949	1.785E-38	0.970220436	1.02769838	0.9702204	1.02769838

RESIDUAL OUTPUT

<i>Observation</i>	<i>Predicted Y</i>	<i>Residuals</i>	<i>Standard Residuals</i>
1	3.147998117	0.043091146	0.532586295
2	3.627998112	-0.073454257	-0.907860071
3	4.275523599	-0.173673118	-2.146518044
4	4.295302995	-0.054859459	-0.678037106
5	4.361534004	-0.07363709	-0.910119801
6	4.46472651	-0.16612094	-2.053176676
7	4.349746283	-0.050680902	-0.626392113
8	4.379615169	-0.060619867	-0.74923304
9	4.301396647	0.033195459	0.410280264
10	4.549338372	-0.203205933	-2.511529749
11	4.332164597	0.034542589	0.426930154
12	4.296501746	0.071288037	0.881086605
13	4.39459956	-0.017208161	-0.212684775
14	4.396597479	-0.019090336	-0.23594757
15	4.376418499	0.028958345	0.357911524
16	4.442150028	-0.010386299	-0.128369776
17	4.41158187	0.026793252	0.331151995
18	4.393001225	0.072483434	0.895861151
19	4.396597479	0.126553176	1.564137727
20	4.459731713	0.087527908	1.081803777
21	4.588797269	-0.021212558	-0.262177236
22	4.456035563	0.113213221	1.399262162
23	4.455735876	0.122212144	1.510484613
24	4.488701536	0.120483972	1.489125217
25	4.64094295	-0.001425896	-0.017623402
26	4.654129214	0.062373518	0.770907348
27	4.756522553	0.019538935	0.241492051
28	4.868705694	0.027290602	0.337299005
29	4.913159388	0.00278841	0.034463433
30	5.108356056	-0.061902814	-0.765089659
31	5.090075099	0.024161395	0.298623473
32	5.105858657	0.05801479	0.717035519
33	5.364888831	-0.099952364	-1.235364204
34	5.529417446	0.010925649	0.135035878
35	8.097442391	-0.042989167	-0.531325879
36	8.545275893	0.044983177	0.55597091

PROBABILITY OUTPUT

<i>Percentile</i>	<i>Y</i>
1.388888889	3.19108926
4.166666667	3.55454385
6.944444444	4.10185048
9.722222222	4.24044354
12.5	4.28789691
15.277777778	4.29860557
18.055555556	4.29906538
20.833333333	4.3189953
23.611111111	4.33459211
26.388888889	4.34613244
29.166666667	4.36670719
31.944444444	4.36778978
34.722222222	4.3773914
37.5	4.37750714
40.277777778	4.40537684
43.055555556	4.43176373
45.833333333	4.43837512
48.611111111	4.46548466
51.388888889	4.52315065
54.166666667	4.54725962
56.944444444	4.56758471
59.722222222	4.56924878
62.5	4.57794802
65.277777778	4.60918551
68.055555556	4.63951705
70.833333333	4.71650273
73.611111111	4.77606149
76.388888889	4.8959963
79.166666667	4.9159478
81.944444444	5.04645324
84.722222222	5.11423649
87.5	5.16387345
90.277777778	5.26493647
93.055555556	5.54034309
95.833333333	8.05445322
98.611111111	8.59025907

Sec. B-1.5.1: Ecuación de la curva de calibración PLSRAb.1 corregida:

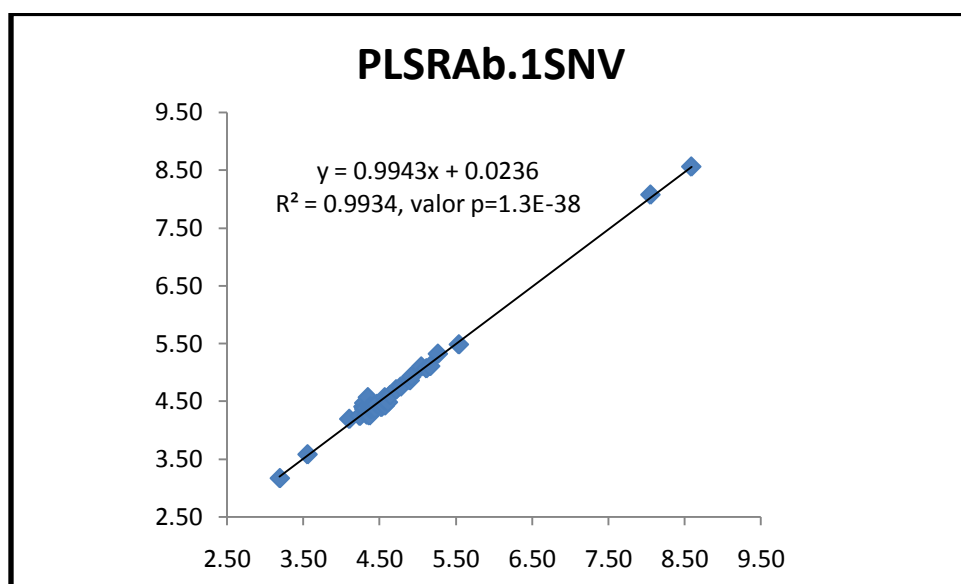
$$Y = 1.00(\pm 0.01)x + 0.01(\pm 0.07)$$

Sec. B-1.5.2: Límite de Detección (LD) y Límite de Cuantificación (LQ) para la regresión de calibración PLSRAb.1:

$$LD = 0.24$$

$$LQ = 0.68$$

Figura B-1.6: Regresión de calibración PLSRAb.1SNV



Sec. B-1.6: Análisis de la regresión de calibración PLSRAb.1SNV

SUMMARY OUTPUT

Regression Statistics	
Multiple R	0.996673113
R Square	0.993357293
Adjusted R Square	0.99316192
Standard Error	0.081330384
Observations	36

ANOVA					
	df	SS	MS	F	Significance F
Regression	1	33.63140157	33.63140157	5084.3954	1.30089E-38
Residual	34	0.224897467	0.006614631		
Total	35	33.85629904			

	<i>Coefficients</i>	<i>Standard Error</i>	<i>t Stat</i>	<i>P-value</i>	<i>Lower 95%</i>	<i>Upper 95%</i>	<i>Lower 95.0%</i>	<i>Upper 95.0%</i>
Intercept	0.007871931	0.067611385	0.11642907	0.9079975	-0.129530934	0.1452748	-0.12953093	0.1452748
X Variable 1	0.999078553	0.01401135	71.30494676	1.301E-38	0.970604064	1.02755304	0.970604064	1.02755304

RESIDUAL OUTPUT

<i>Observation</i>	<i>Predicted Y</i>	<i>Residuals</i>	<i>Standard Residuals</i>
1	3.17834781	0.012741452	0.158950054
2	3.589968174	-0.03542432	-0.441919599
3	4.203002774	-0.101152293	-1.261878303
4	4.254155596	-0.01371206	-0.171058414
5	4.415406875	-0.127509961	-1.590691112
6	4.478748455	-0.180142884	-2.247288617
7	4.376143087	-0.077077707	-0.961547021
8	4.389131109	-0.070135806	-0.874946575
9	4.274137167	0.06045494	0.754177432
10	4.577357508	-0.231225069	-2.884540612
11	4.353963544	0.012743643	0.158977377
12	4.262048317	0.105741467	1.319128398
13	4.417604847	-0.040213448	-0.501664138
14	4.376742535	0.000764609	0.009538518
15	4.377941429	0.027435415	0.342257738
16	4.426896278	0.00486745	0.060721609
17	4.378940507	0.059434615	0.741448844
18	4.461464396	0.004020263	0.050152921
19	4.408513233	0.114637422	1.430105748
20	4.442781627	0.104477995	1.303366544
21	4.576258522	-0.008673811	-0.108206084
22	4.43378992	0.135458865	1.689853954
23	4.502126893	0.075821127	0.945871138
24	4.492136107	0.1170494	1.460195257
25	4.616321572	0.023195482	0.289364431
26	4.71423127	0.002271462	0.028336571
27	4.760588515	0.015472974	0.193025875
28	4.869687893	0.026308404	0.328198233
29	4.93502763	-0.019079832	-0.238021558
30	5.108667482	-0.06221424	-0.776124766
31	5.077995771	0.036240723	0.452104248
32	5.116160572	0.047712876	0.595219753
33	5.329763566	-0.064827099	-0.808720266
34	5.491814107	0.048528987	0.605400763
35	8.081825348	-0.027372123	-0.341468171
36	8.566877985	0.023381085	0.29167983

PROBABILITY OUTPUT

<i>Percentile</i>	<i>Y</i>
1.388888889	3.19108926
4.166666667	3.55454385
6.944444444	4.10185048
9.722222222	4.24044354
12.5	4.28789691
15.277777778	4.29860557
18.055555556	4.29906538
20.833333333	4.3189953
23.611111111	4.33459211
26.388888889	4.34613244
29.166666667	4.36670719
31.944444444	4.36778978
34.722222222	4.3773914
37.5	4.37750714
40.277777778	4.40537684
43.055555556	4.43176373
45.833333333	4.43837512
48.611111111	4.46548466
51.388888889	4.52315065
54.166666667	4.54725962
56.944444444	4.56758471
59.722222222	4.56924878
62.5	4.57794802
65.277777778	4.60918551
68.055555556	4.63951705
70.833333333	4.71650273
73.611111111	4.77606149
76.388888889	4.8959963
79.166666667	4.9159478
81.944444444	5.04645324
84.722222222	5.11423649
87.5	5.16387345
90.277777778	5.26493647
93.055555556	5.54034309
95.833333333	8.05445322
98.611111111	8.59025907

Sec. B-1.6.1: Ecuación de la curva de calibración PLSRab.1SNV corregida:

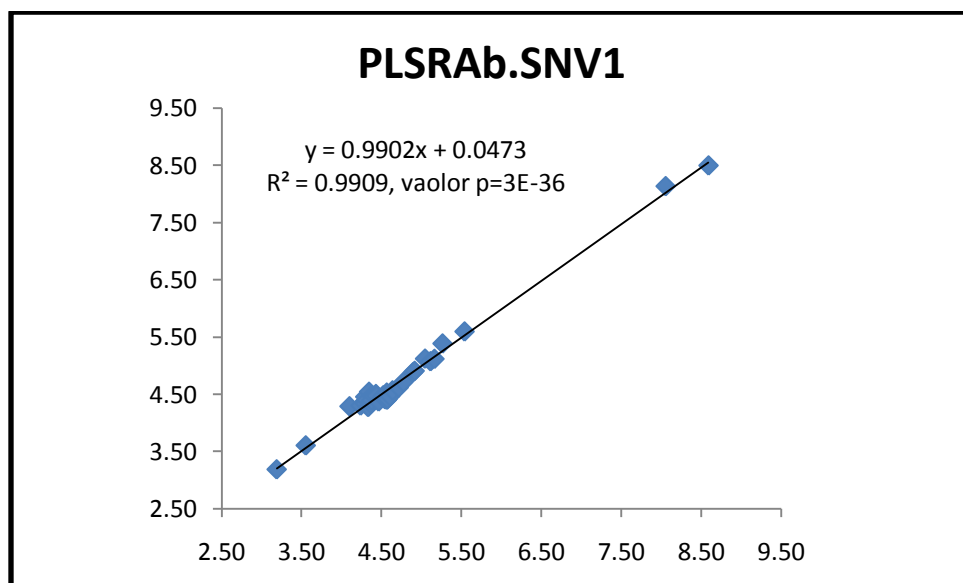
$$Y = 1.00(\pm 0.01)x + 0.01(\pm 0.07)$$

Sec. B-1.6.2: Límite de Detección (LD) y Límite de Cuantificación (LQ) para la regresión de calibración PLSRab.1SNV:

$$LD = 0.22$$

$$LQ = 0.68$$

Figura B-1.7: Regresión de calibración PLSRab.SNV1



Sec. B-1.7: Análisis de la regresión de calibración PLSRab.SNV1

SUMMARY OUTPUT

Regression Statistics					
Multiple R	0.995460923				
R Square	0.99094245				
Adjusted R Square	0.990676051				
Standard Error	0.09496983				
Observations	36				

ANOVA					
	df	SS	MS	F	Significance F
Regression	1	33.5496439	33.5496439	3719.7743	2.53546E-36
Residual	34	0.306655135	0.009019269		
Total	35	33.85629904			

	<i>Coefficients</i>	<i>Standard Error</i>	<i>t Stat</i>	<i>P-value</i>	<i>Lower 95%</i>	<i>Upper 95%</i>	<i>Lower 95.0%</i>	<i>Upper 95.0%</i>
Intercept	0.004522344	0.079241487	-0.057070408	0.95482319	0.165560419	0.15651573	-0.16556042	0.15651573
X Variable 1	1.000746529	0.016408383	60.98995248	2.5355E-36	0.967400682	1.03409238	0.96740068	1.03409237

RESIDUAL OUTPUT

<i>Observation</i>	<i>Predicted Y</i>	<i>Residuals</i>	<i>Standard Residuals</i>
1	3.181854603	0.00923466	0.098657428
2	3.600867175	-0.046323321	-0.494889894
3	4.284877427	-0.183026946	-1.955347429
4	4.297286684	-0.056843148	-0.607277264
5	4.353028266	-0.065131353	-0.69582335
6	4.450801202	-0.152195631	-1.625964603
7	4.332613037	-0.033547656	-0.358402545
8	4.392958052	-0.07396275	-0.790172575
9	4.272368096	0.062224011	0.664763101
10	4.538666747	-0.192534308	-2.056918239
11	4.359733268	0.006973919	0.074505062
12	4.328710125	0.039079658	0.417503054
13	4.469214938	-0.091823539	-0.980986266
14	4.389855738	-0.012348595	-0.131924801
15	4.464211205	-0.058834361	-0.628550164
16	4.499537558	-0.067773829	-0.724053948
17	4.470215684	-0.031840562	-0.340165001
18	4.368840061	0.096644598	1.032491501
19	4.474919193	0.048231462	0.515275301
20	4.407268728	0.139990894	1.495576692
21	4.523555474	0.044029237	0.470381309
22	4.397961785	0.171287	1.829925056
23	4.415775073	0.162172946	1.73255611
24	4.460408368	0.148777139	1.589443539
25	4.562684664	0.07683239	0.820830045
26	4.613622662	0.10288007	1.099107455
27	4.710194702	0.065866786	0.703680273
28	4.879521015	0.016475282	0.176011787
29	4.904239454	0.011708344	0.12508475
30	5.117698688	-0.071245446	-0.761142569
31	5.072064647	0.042171847	0.450538097
32	5.113995926	0.049877521	0.53286079
33	5.383196742	-0.118260275	-1.263420112
34	5.592753066	-0.052409971	-0.55991593
35	8.134649248	-0.080196024	-0.85676504
36	8.496419118	0.093839952	1.002528383

PROBABILITY OUTPUT

<i>Percentile</i>	<i>Y</i>
1.388888889	3.19108926
4.166666667	3.55454385
6.944444444	4.10185048
9.722222222	4.24044354
12.5	4.28789691
15.277777778	4.29860557
18.055555556	4.29906538
20.833333333	4.3189953
23.611111111	4.33459211
26.388888889	4.34613244
29.166666667	4.36670719
31.944444444	4.36778978
34.722222222	4.3773914
37.5	4.37750714
40.277777778	4.40537684
43.055555556	4.43176373
45.833333333	4.43837512
48.611111111	4.46548466
51.388888889	4.52315065
54.166666667	4.54725962
56.944444444	4.56758471
59.722222222	4.56924878
62.5	4.57794802
65.277777778	4.60918551
68.055555556	4.63951705
70.833333333	4.71650273
73.611111111	4.77606149
76.388888889	4.8959963
79.166666667	4.9159478
81.944444444	5.04645324
84.722222222	5.11423649
87.5	5.16387345
90.277777778	5.26493647
93.055555556	5.54034309
95.833333333	8.05445322
98.611111111	8.59025907

Sec. B-1.7.1: Ecuación de la curva de calibración PLSRab.SNV1 corregida:

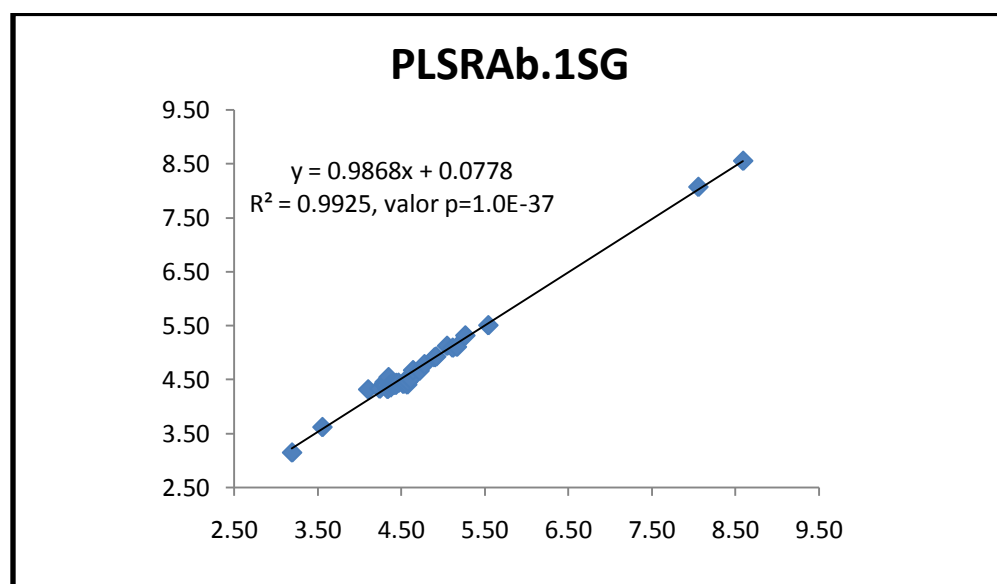
$$Y = 1.00(\pm 0.02)x - 0.00(\pm 0.08)$$

Sec. B-1.7.2: Límite de Detección (LD) y Límite de Cuantificación (LQ) para la regresión de calibración PLSRab.SNV1:

$$LD = 0.26$$

$$LQ = 0.79$$

Figura B-1.8: Regresión de calibración PLSRab.1SG



Sec. B-1.8: Análisis de la regresión de calibración PLSRab.1SG

SUMMARY OUTPUT

Regression Statistics	
Multiple R	0.996243877
R Square	0.992501862
Adjusted R Square	0.992281328
Standard Error	0.086408607
Observations	36

ANOVA					
	df	SS	MS	F	Significance F
Regression	1	33.60243983	33.60243983	4500.458896	1.02037E-37
Residual	34	0.253859213	0.007466447		
Total	35	33.85629904			

	<i>Coefficients</i>	<i>Standard Error</i>	<i>t Stat</i>	<i>P-value</i>	<i>Lower 95%</i>	<i>Upper 95%</i>	<i>Lower 95.0%</i>	<i>Upper 95.0%</i>
Intercept	0.042793448	0.072602781	0.589418852	0.559476906	-0.19034005	0.10475315	0.19034005	0.10475315
X Variable 1	1.005783572	0.014992572	67.08545965	1.02037E-37	0.975315	1.03625214	0.975315	1.03625214

RESIDUAL OUTPUT

<i>Observation</i>	<i>Predicted Y</i>	<i>Residuals</i>	<i>Standard Residuals</i>
1	3.126933479	0.064155784	0.753309381
2	3.601763903	0.047220049	0.554452042
3	4.304605463	0.202754982	2.380724224
4	4.316473709	0.076030173	0.892736998
5	4.404077458	0.116180545	1.364177762
6	4.440989715	0.142384144	1.671857228
7	4.394220779	0.095155398	1.117303064
8	4.385671619	0.066676316	0.782905162
9	4.310338429	0.024253678	0.284783722
10	4.533018912	0.186886473	2.194398131
11	4.383861208	0.017154022	0.201420429
12	4.337896899	0.029892884	0.350998596
13	4.412023148	0.034631749	0.406641767
14	4.393416152	0.015909009	0.186801639
15	4.386476245	0.018900599	0.221928519
16	4.386878559	0.044885169	0.527036176
17	4.425601226	0.012773896	0.149989524
18	4.428316842	0.037167817	0.436419967
19	4.405887868	0.117262786	1.376885312
20	4.433446338	0.113813284	1.33638167
21	4.501336729	0.066247982	0.777875706
22	4.394120201	0.175128584	2.056338441
23	4.447929622	0.130018398	1.526660144
24	4.496508968	0.11267654	1.323034162
25	4.663066728	0.023549674	0.276517394
26	4.652606578	0.063896154	0.750260831
27	4.774708704	0.001352784	0.015884228
28	4.901035121	0.005038824	-0.05916526
29	4.916725344	0.000777547	-0.00912986
30	5.116976853	0.070523611	0.828079628
31	5.081372115	0.032864378	0.385889515
32	5.097967544	0.065905904	0.773859068
33	5.310690769	0.045754302	0.537241425
34	5.501186178	0.039156916	0.459775727
35	8.081021039	0.026567815	0.311956033
36	8.567417974	0.022841096	0.268197356

PROBABILITY OUTPUT

<i>Percentile</i>	<i>Y</i>
1.388888889	3.19108926
4.166666667	3.55454385
6.944444444	4.10185048
9.722222222	4.24044354
12.5	4.28789691
15.277777778	4.29860557
18.055555556	4.29906538
20.833333333	4.3189953
23.611111111	4.33459211
26.388888889	4.34613244
29.166666667	4.36670719
31.944444444	4.36778978
34.722222222	4.3773914
37.5	4.37750714
40.277777778	4.40537684
43.055555556	4.43176373
45.833333333	4.43837512
48.611111111	4.46548466
51.388888889	4.52315065
54.166666667	4.54725962
56.944444444	4.56758471
59.722222222	4.56924878
62.5	4.57794802
65.277777778	4.60918551
68.055555556	4.63951705
70.833333333	4.71650273
73.611111111	4.77606149
76.388888889	4.8959963
79.166666667	4.9159478
81.944444444	5.04645324
84.722222222	5.11423649
87.5	5.16387345
90.277777778	5.26493647
93.055555556	5.54034309
95.833333333	8.05445322
98.611111111	8.59025907

Sec. B-1.8.1: Ecuación de la curva de calibración PLSRAb.1SG corregida:

$$Y = 1.00(\pm 0.01)x - 0.04(\pm 0.07)$$

Sec. B-1.8.2: Límite de Detección (LD) y Límite de Cuantificación (LQ) para la regresión de calibración PLSRAb.1SG:

$$LD = 0.26$$

$$LQ = 0.79$$

Tabla B-2: Tabla de ecuaciones, LD, LQ para las distintas regresiones de calibración

Regresión	Ecuación de la gráfica	Ecuación corregida	LD	LQ
MLRAb.20mg	$y = 0.9883x + 0.0573$	$y = 1.00 (\pm 0.02)x - 0.01 (\pm 0.09)$	0.29	0.87
PLSRAb.20mg	$y = 0.9945x + 0.0219$	$y = 1.00 (\pm 0.01)x + 0.01 (\pm 0.06)$	0.21	0.63
MLRAb.3	$y = 0.9942x - 0.0103$	$y = 0.98 (\pm 0.03)x + 0.1 (\pm 0.1)$	0.44	1.34
PLSRAb.2	$y = 0.9939x + 0.0247$	$y = 1.00 (\pm 0.01)x + 0.01 (\pm 0.07)$	0.24	0.71
PLSRAb.1	$y = 0.9943x + 0.0232$	$y = 1.00 (\pm 0.01)x + 0.01 (\pm 0.07)$	0.23	0.68
PLSRAb.1SNV	$y = 0.9943x + 0.0236$	$y = 1.00 (\pm 0.01)x + 0.01 (\pm 0.07)$	0.22	0.68
PLSRAb.SNV1	$y = 0.9902x + 0.0473$	$y = 1.00 (\pm 0.02)x - 0.00 (\pm 0.08)$	0.26	0.79
PLSRAb.1SG	$y = 0.9868x + 0.0778$	$y = 1.00 (\pm 0.01)x - 0.04 (\pm 0.07)$	0.24	0.72

Tabla B-3: Presentación de los valores de R cuadrado, SS, MS y F obtenidos de los análisis de ANOVA de las regresiones de calibración

Regression	R Square	Adjusted R Square	SSreg.	SSres.	MSreg.	MSres.	F	Significance F
MLRAb.20mg	0.9891	0.9888	33.4888	0.3675	33.4888	0.0108	3098.6	5.49497E-35
PLSRAb.20mgB	0.9943	0.9941	33.6618	0.1945	33.6618	0.0057	5883.8	1.10309E-39
MLRAb.3	0.9740	0.9733	32.9771	0.8792	32.9771	0.0259	1275.3	1.52796E-28
PLSRAb.2	0.9926	0.9924	33.6059	0.2504	33.6059	0.0074	4563.5	8.0681E-38
PLSRAb.1	0.9932	0.9930	33.6272	0.2291	33.6272	0.0067	4990.1	1.78492E-38
PLSRAb.1SNV	0.9934	0.9932	33.6314	0.2249	33.6314	0.0066	5084.4	1.30089E-38
PLSRAb.SNV1	0.9909	0.9907	33.5496	0.3067	33.5496	0.0090	3719.8	2.53546E-36
PLSRAb.1SG	0.9925	0.9923	33.6024	0.2539	33.6024	0.0075	4500.5	1.02037E-37

Tabla B-4: Pre-tratamientos aplicados y valores de calibración quimiométricos obtenidos para todas las curvas de calibración

	MLRAb.20mg	PLSRAb.20mgB	MLRAb.3	PLSRAb.2	PLSRAb.1	PLSRAb.1SNV	PLSRAb.SNV1	PLSRAb.1SG
Regiones		760-772 1408-1466 1910-1954		948-990 1324-1448 1850-1950	948-990 1324-1448 1850-1950	948-990 1324-1448 1850-1950	948-990 1324-1448 1850-1950	948-990 1324-1448 1850-1950
Longitud de onda	1876.5		1883.5					
Pre-tratamientos	2da Derivada	2da Derivada	2da Derivada	2da Derivada	1ra Derivada	1ra Derivada SNV	SNV 1ra Derivada	1ra Derivada SG
Factores		4		5	4	5	3	5
SEC	0.11	0.09	0.12	0.09	0.09	0.09	0.10	0.09
SECV		0.10		0.10	0.10	0.10	0.11	0.09
R Squared	0.9841	0.9925	0.9873	0.9931	0.9936	0.9938	0.9910	0.9941
F-Value	1946.1	965.1	2102.2	807.9	1133.9	892.9	1096.0	764.6
PRESS		0.3289		0.3184	0.3229	0.3622	0.4056	0.2801
%RSEC (20mg)	2.1	1.5	3.4	1.7	1.7	1.6	1.9	1.8

Apéndice C

Sec. C-1: Validación

Para validar cada una de las regresiones realizadas se utilizaron muestras de la misma presentación que las del conjunto de calibración (20mg) y de otras presentaciones (2mg, 5mg, 15mg y de 10/30mg) para verificar la capacidad predictiva en cada una de las presentaciones. Se tomo una de las muestras de predicción de una presentación de 20mg (E.9ComStd.A) y se leyó un total de diez veces consecutivas para verificar la precisión del instrumento. En todas las corridas se sacaba la muestra del instrumento y se colocaba nuevamente y en una de las lecturas se compacto la muestra para verificar que efecto tenia esto en la lectura (E.9Com.Std.A10*).

Tabla C-1a: Valores del % de humedad por KF y predichos por NIR para las muestras de validación

Muestra (20mg)	KF	MLRAb.20mg	PLSRAb.20mgB	MLRAb.3	PLSRAb.2
E.8L955(Std.1)A(20mg)	4.493	3.875	4.455	4.072	4.346
E.8L955(Std.2)A(20mg)	4.477	4.034	4.350	4.200	4.340
E.8L955(Std.3)A(20mg)	4.454	4.088	4.432	4.228	4.345
E.8L955(H1)A(20mg)	3.797	3.208	3.600	2.769	3.699
E.8L955(W1)A(20mg)	8.689	8.379	8.982	8.640	8.630
E.8L017(Std.1)A(2mg)	4.675	4.116	4.557	4.343	4.191
E.8L266(Std.1)A(5mg)	4.532	4.375	4.356	4.495	4.180
E.8L251(Std.1)A(15mg)	3.973	3.845	4.145	3.831	4.273
E.8L006(Std.1)A(10/30)	4.192	4.095	4.119	4.205	4.242
E.9ComStd.A	4.068	4.436	4.437	4.517	4.297
E.9ComStd.B	4.048	4.458	4.400	4.536	4.295
E.9ComStd.C	4.032	4.491	4.368	4.607	4.294
E.9Com.WA	7.086	7.886	7.562	8.297	7.353
E.9Com.WB	7.228	7.879	7.607	8.245	7.337
E.9Com.WC	6.947	7.700	7.359	8.105	7.160
E.9Com.DA	2.921	2.991	1.966	3.131	2.975
E.9Com.DB	2.954	3.182	2.378	3.456	2.986
E.9Com.DC	3.041	3.177	2.675	3.504	3.075
E.9ComStd.A1	4.068	4.487	4.373	4.633	4.271
E.9ComStd.A2	Same	4.593	4.549	4.651	4.288
E.9ComStd.A3	Same	4.632	4.646	4.658	4.303
E.9ComStd.A4	Same	4.644	4.655	4.670	4.304
E.9ComStd.A5	Same	4.679	4.663	4.674	4.304
E.9ComStd.A6	Same	4.677	4.710	4.675	4.311
E.9ComStd.A7	Same	4.668	4.711	4.678	4.312
E.9ComStd.A8	Same	4.691	4.746	4.688	4.314
E.9ComStd.A9	Same	4.691	4.739	4.683	4.313
E.9ComStd.A10	Same	4.706	4.763	4.689	4.319
E.9ComStd.A10*	Same	3.981	4.586	4.188	4.332

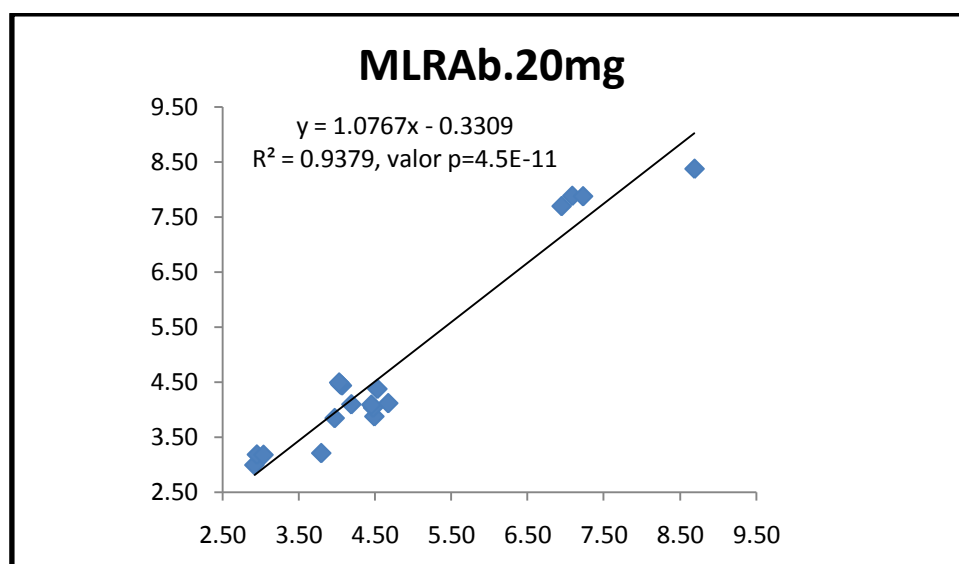
Tabla C-1b: Valores del % de humedad por KF y predichos por NIR para las muestras de validación

Muestra (20mg)	KF	PLSRAb.1	PLSRAb.1SNV	PLSRAb.SNV1	PLSRAb.1SG
E.8L955(Std.1)A(20mg)	4.493	4.373	4.246	4.299	4.331
E.8L955(Std.2)A(20mg)	4.477	4.395	4.292	4.352	4.333
E.8L955(Std.3)A(20mg)	4.454	4.401	4.300	4.361	4.337
E.8L955(H1)A(20mg)	3.797	3.765	3.291	3.759	3.698
E.8L955(W1)A(20mg)	8.689	8.789	9.103	8.849	8.586
E.8L017(Std.1)A(2mg)	4.675	4.182	4.225	4.262	4.222
E.8L266(Std.1)A(5mg)	4.532	4.221	4.293	4.256	4.227
E.8L251(Std.1)A(15mg)	3.973	4.332	4.202	4.225	4.244
E.8L006(Std.1)A(10/30)	4.192	4.259	4.246	4.257	4.267
E.9ComStd.A	4.068	4.301	4.268	4.409	4.333
E.9ComStd.B	4.048	4.313	4.301	4.420	4.344
E.9ComStd.C	4.032	4.305	4.324	4.424	4.341
E.9Com.WA	7.086	7.406	7.264	7.496	7.319
E.9Com.WB	7.228	7.409	7.296	7.507	7.297
E.9Com.WC	6.947	7.296	7.180	7.390	7.111
E.9Com.DA	2.921	2.953	2.831	3.204	2.974
E.9Com.DB	2.954	2.968	2.977	3.257	2.992
E.9Com.DC	3.041	3.078	3.050	3.302	3.084
E.9ComStd.A1	4.068	4.251	4.277	4.393	4.315
E.9ComStd.A2	Same	4.259	4.250	4.405	4.326
E.9ComStd.A3	Same	4.265	4.243	4.413	4.339
E.9ComStd.A4	Same	4.268	4.237	4.417	4.338
E.9ComStd.A5	Same	4.268	4.232	4.418	4.336
E.9ComStd.A6	Same	4.271	4.234	4.421	4.344
E.9ComStd.A7	Same	4.273	4.233	4.423	4.343
E.9ComStd.A8	Same	4.273	4.231	4.423	4.346
E.9ComStd.A9	Same	4.274	4.229	4.425	4.343
E.9ComStd.A10	Same	4.276	4.229	4.427	4.350
E.9ComStd.A10*	Same	4.247	4.100	4.296	4.339

Sec. C-2: Gráficas del contenido de humedad para todas las muestras de validación:

A continuación se ilustraran toda las graficas de los valores del % de humedad determinadas mediante KF vs. los predichos con las distintas regresiones para las muestras de validación de 20mg y de las otras presentaciones. También se mostrará el análisis de la regresión para cada una de las regresiones.

Figura C-2.1: Curva de valores predichos del % de humedad mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de todas las presentaciones utilizando la regresión (MLRAb.20mg)



Sec. C-2.1: Análisis de la regresión para la curva de valores predichos del % de humedad mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de todas las presentaciones utilizando la regresión (MLRAb.20mg)

MLRAb.20mg.Pred.Todas

SUMMARY OUTPUT

Regression Statistics	
Multiple R	0.968460536
R Square	0.937915809
Adjusted R Square	0.934035548
Standard Error	0.417894904
Observations	18

ANOVA							
	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>Significance F</i>		
Regression	1	42.21210077	42.21210077	241.7145623	4.45944E-11		
Residual	16	2.794178414	0.174636151				
Total	17	45.00627918					

	<i>Coefficients</i>	<i>Standard Error</i>	<i>t Stat</i>	<i>P-value</i>	<i>Lower 95%</i>	<i>Upper 95%</i>	<i>Lower 95.0%</i>	<i>Upper 95.0%</i>
Intercept	0.583508212	0.285879822	2.041096174	0.058093731	-0.022529935	1.189546358	0.022529935	1.189546358
X Variable 1	0.871134117	0.056031676	15.54717216	4.45944E-11	0.75235227	0.989915963	0.75235227	0.989915963

RESIDUAL OUTPUT

<i>Observation</i>	<i>Predicted Y</i>	<i>Residuals</i>	<i>Standard Residuals</i>
1	3.959414254	0.534061886	1.317313005
2	4.097576125	0.379340355	0.935678048
3	4.144878707	0.309156216	0.762562383
4	3.378106458	0.419278869	1.034190085
5	7.882479634	0.806160207	1.988468663
6	4.168922009	0.506092993	1.248325144
7	4.394981312	0.137459958	0.339057691
8	3.93275755	0.040305161	0.099416404
9	4.150802419	0.041071669	0.101307067
10	4.448207606	0.380334353	-0.938129835
11	4.466849877	0.418504213	-1.032279322
12	4.495945756	0.463808888	-1.144027491
13	7.453097628	-0.36665013	-0.904376435
14	7.447086803	0.219172656	-0.540609614
15	7.290892456	0.344245182	-0.849112561
16	3.189418808	0.268366981	-0.661951963
17	3.355456971	0.401633654	-0.99066653
18	3.35083996	0.310211258	-0.765164739

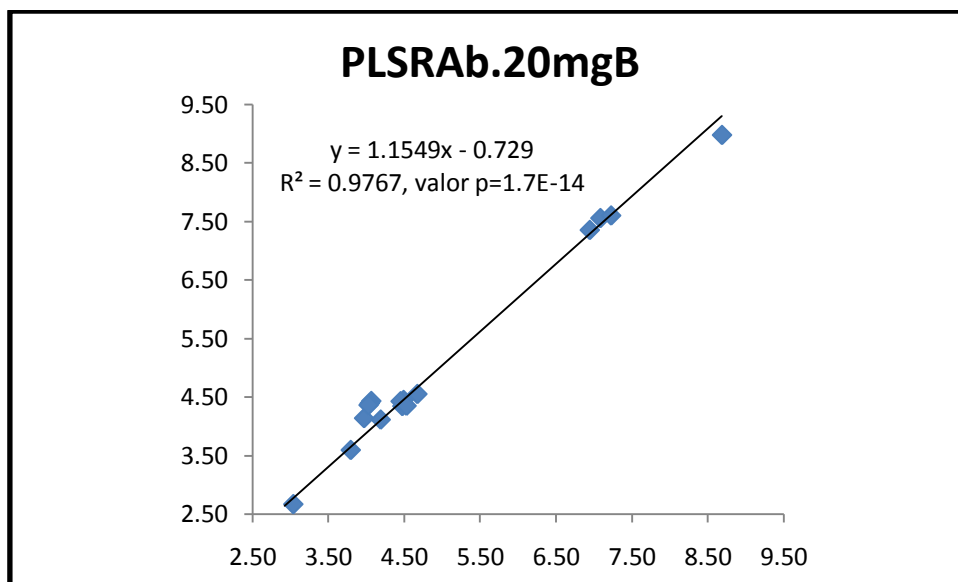
PROBABILITY OUTPUT

<i>Percentile</i>	<i>Y</i>
2.777777778	2.921051827
8.333333333	2.953823317
13.88888889	3.040628702
19.44444444	3.797385327
25	3.97306271
30.55555556	4.032136868
36.11111111	4.048345664
41.66666667	4.067873254
47.22222222	4.191874088
52.77777778	4.454034923
58.33333333	4.47691648
63.88888889	4.49347614
69.44444444	4.53244127
75	4.675015001
80.55555556	6.946647273
86.11111111	7.086447498
91.66666667	7.227914147
97.22222222	8.688639841

Sec. C-2.1.1: Ecuación de la curva corregida para la curva de valores predichos del % de humedad mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de todas las presentaciones utilizando la regresión (MLRAb.20mg):

$$Y = 0.87(\pm 0.06)x + 0.6(\pm 0.3)$$

Figura C-2.2: Curva de valores predichos del % de humedad mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de todas las presentaciones utilizando la regresión (PLSRAb.20mgB)



Sec. C-2.2: Análisis de la regresión para curva de valores predichos del % de humedad mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de todas las presentaciones utilizando la regresión (PLSRAb.20mgB)

PLSRAb.20mgB.Pred.Todas

SUMMARY OUTPUT

Regression Statistics					
Multiple R	0.988284909				
R Square	0.976707062				
Adjusted R Square	0.975251254				
Standard Error	0.255969781				
Observations	18				

ANOVA					
	df	SS	MS	F	Significance F
Regression	1	43.95795072	43.95795072	670.9034791	1.71964E-14
Residual	16	1.048328461	0.065520529		
Total	17	45.00627918			

	<i>Coefficients</i>	<i>Standard Error</i>	<i>t Stat</i>	<i>P-value</i>	<i>Lower 95%</i>	<i>Upper 95%</i>	<i>Lower 95.0%</i>	<i>Upper 95.0%</i>
Intercept	0.727303422	0.16682832	4.35959207	0.000486415	0.373643184	1.08096366	0.373643184	1.08096366
X Variable 1	0.84569031	0.032649861	25.90180455	1.71964E-14	0.776475698	0.914904923	0.776475698	0.914904923

RESIDUAL OUTPUT

<i>Observation</i>	<i>Predicted Y</i>	<i>Residuals</i>	<i>Standard Residuals</i>
1	4.494515479	0.001039339	0.004185361
2	4.406309979	0.0706065	0.284328543
3	4.475741154	-0.02170623	0.087409811
4	3.771788539	0.025596788	0.103076874
5	8.323632066	0.365007775	1.469866488
6	4.581114166	0.093900835	0.378133562
7	4.410961276	0.121479994	0.489193338
8	4.232436051	0.259373341	1.044482358
9	4.210617241	0.018743154	0.075477661
10	4.479715898	0.411842644	1.658467962
11	4.448087081	0.399741417	1.609736974
12	4.421447836	0.389310968	1.567734123
13	7.122582687	0.036135189	0.145514444
14	7.160131337	0.06778281	0.272957694
15	6.950907554	0.004260281	0.017155919
16	2.390268848	0.530782979	2.137434228
17	2.738101273	0.215722044	0.868700954
18	2.989355864	0.051272838	0.206472934

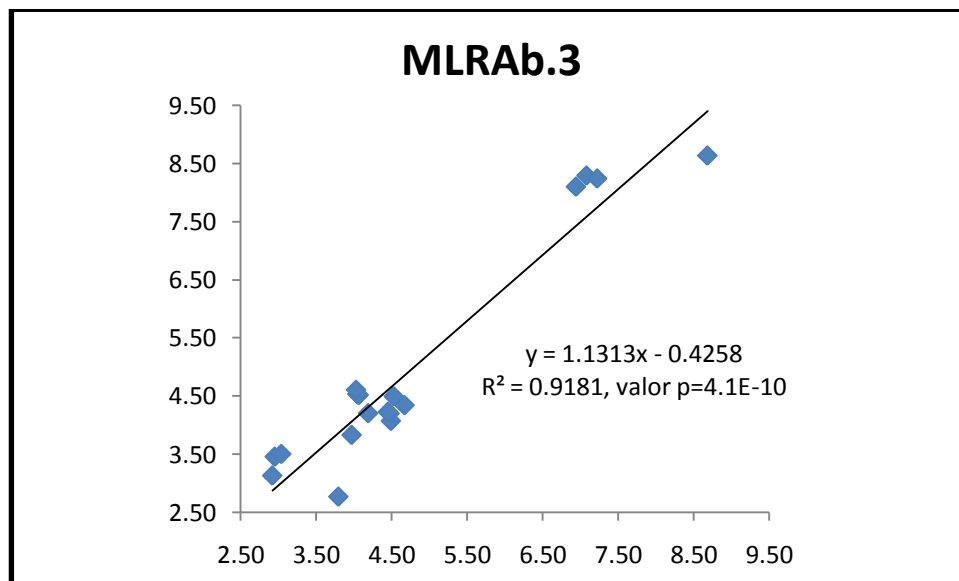
PROBABILITY OUTPUT

<i>Percentile</i>	<i>Y</i>
2.777777778	2.921051827
8.333333333	2.953823317
13.88888889	3.040628702
19.44444444	3.797385327
25	3.97306271
30.55555556	4.032136868
36.11111111	4.048345664
41.66666667	4.067873254
47.22222222	4.191874088
52.77777778	4.454034923
58.33333333	4.47691648
63.88888889	4.49347614
69.44444444	4.53244127
75	4.675015001
80.55555556	6.946647273
86.11111111	7.086447498
91.66666667	7.227914147
97.22222222	8.688639841

Sec. C-2.2.1: Ecuación de la curva corregida para la curva de valores predichos del % de humedad mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de todas las presentaciones utilizando la regresión (PLSRAb.20mgB):

$$Y = 0.85(\pm 0.03)x + 0.7(\pm 0.2)$$

Figura C-2.3: Curva de valores predichos del % de humedad mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de todas las presentaciones utilizando la regresión (MLRAb.3)



Sec. C-2.3: Análisis de la regresión para curva de valores predichos del % de humedad mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de todas las presentaciones utilizando la regresión (MLRAb.3)

MLRAb.3Pred.Todas

SUMMARY OUTPUT

Regression Statistics	
Multiple R	0.958198998
R Square	0.918145319
Adjusted R Square	0.913029401
Standard Error	0.479842072
Observations	18

ANOVA					
	df	SS	MS	F	Significance F
Regression	1	41.32230455	41.32230455	179.4683566	4.1102E-10
Residual	16	3.683974632	0.230248414		
Total	17	45.00627918			

	Coefficients	Standard Error	t Stat	P-value	Lower 95%	Upper 95%	Lower 95.0%	Upper 95.0%
Intercept	0.734849402	0.320762183	2.290947753	0.035877995	0.054863955	1.414834848	0.054863955	1.414834848
X Variable 1	0.81160443	0.060582957	13.39658003	4.1102E-10	0.683174299	0.94003456	0.683174299	0.94003456

RESIDUAL OUTPUT

Observation	Predicted Y	Residuals	Standard Residuals
1	4.040027282	0.453448858	0.974079622
2	4.143831488	0.333084991	0.715519064
3	4.166312931	0.287721992	0.618072192
4	2.982100907	0.81528442	1.751359442
5	7.747355157	0.941284684	2.022027872
6	4.259241638	0.415773363	0.89314672
7	4.383011314	0.149429956	0.3209991
8	3.843862491	0.129200219	0.277542436
9	4.147970671	0.043903417	0.09431146
10	4.401191253	0.333317999	0.716019601
11	4.416043614	-0.36769795	0.789873155
12	4.474073331	0.441936463	0.949349181
13	7.468406714	0.381959216	0.820508603
14	7.426852567	0.198938421	0.427351085
15	7.312903305	0.366256032	0.786775688
16	3.276145192	0.355093365	-0.76279652
17	3.540078953	0.586255636	1.259369514
18	3.578305522	0.537676819	1.155014559

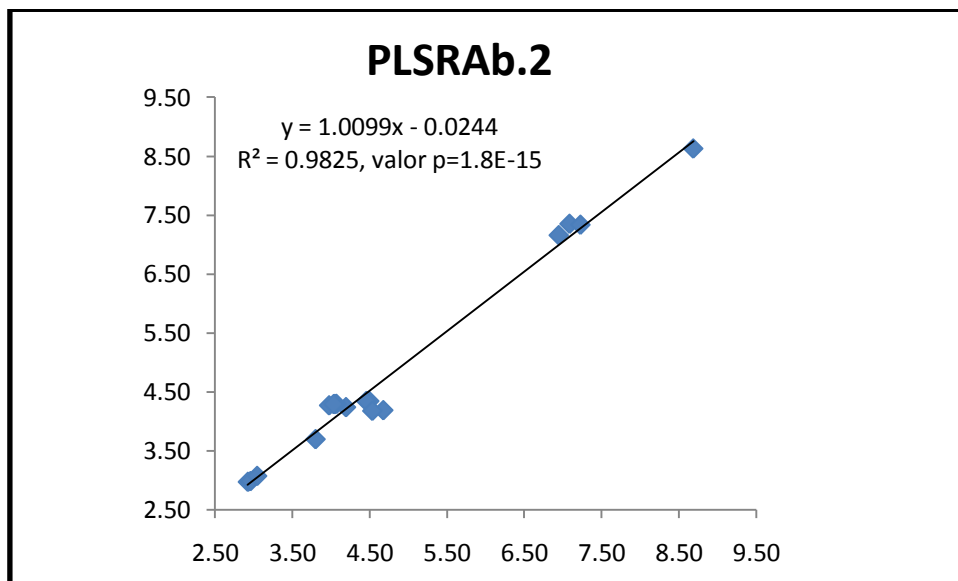
PROBABILITY OUTPUT

Percentile	Y
2.777777778	2.921051827
8.333333333	2.953823317
13.88888889	3.040628702
19.44444444	3.797385327
25	3.97306271
30.55555556	4.032136868
36.11111111	4.048345664
41.66666667	4.067873254
47.22222222	4.191874088
52.77777778	4.454034923
58.33333333	4.47691648
63.88888889	4.49347614
69.44444444	4.53244127
75	4.675015001
80.55555556	6.946647273
86.11111111	7.086447498
91.66666667	7.227914147
97.22222222	8.688639841

Sec. C-2.3.1: Ecuación de la curva corregida para la curva de valores predichos del % de humedad mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de todas las presentaciones utilizando la regresión (MLRAb.3):

$$Y = 0.81(\pm 0.06)x + 0.7(\pm 0.3)$$

Figura C-2.4: Curva de valores predichos del % de humedad mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de todas las presentaciones utilizando la regresión (PLSRAb.2)



Sec. C-2.4: Análisis de la regresión para curva de valores predichos del % de humedad mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de todas las presentaciones utilizando la regresión (PLSRAb.2)

PLSRAb.2Pred.Todas

SUMMARY OUTPUT

Regression Statistics	
Multiple R	0.99120351
R Square	0.982484399
Adjusted R Square	0.981389673
Standard Error	0.221967347
Observations	18

ANOVA					
	df	SS	MS	F	Significance F
Regression	1	44.21796713	44.21796713	897.4713455	1.75351E-15
Residual	16	0.788312048	0.049269503		
Total	17	45.00627918			

	Coefficients	Standard Error	t Stat	P-value	Lower 95%	Upper 95%	Lower 95.0%	Upper 95.0%
Intercept	0.107018021	0.163765605	0.653482891	0.522726119	-0.24014955	0.454185593	-0.24014955	0.454185593
X Variable 1	0.972835801	0.032473511	29.95782611	1.75351E-15	0.903995033	1.041676569	0.903995033	1.041676569

RESIDUAL OUTPUT

Observation	Predicted Y	Residuals	Standard Residuals
1	4.335059697	0.158416443	0.735657448
2	4.329028115	0.147888365	0.686766948
3	4.333892294	0.12014263	0.557920747
4	3.705829501	0.091555826	0.425168779
5	8.502493702	0.186146139	0.864429165
6	4.183978297	0.491036704	2.280286074
7	4.17317982	0.35926145	1.668345513
8	4.263750833	-0.290688122	-1.349903319
9	4.234079341	-0.042205253	-0.195993597
10	4.28758531	-0.219712056	-1.020303242
11	4.285639638	-0.237293974	-1.101950506
12	4.283888534	-0.251751665	-1.169089422
13	7.260182384	-0.173734886	-0.806793541
14	7.244714295	-0.016800148	-0.078016864
15	7.072230507	-0.125583234	-0.583185935
16	3.00120453	-0.080152703	-0.372214725
17	3.012197574	-0.058374257	-0.271079545
18	3.098779961	-0.058151258	-0.270043977

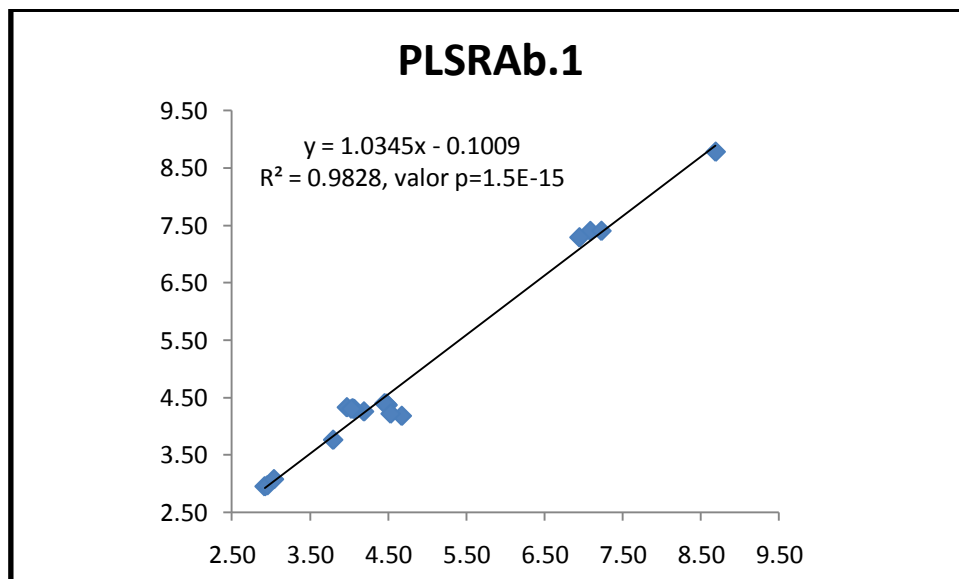
PROBABILITY OUTPUT

Percentile	Y
2.777777778	2.921051827
8.333333333	2.953823317
13.88888889	3.040628702
19.44444444	3.797385327
25	3.97306271
30.55555556	4.032136868
36.11111111	4.048345664
41.66666667	4.067873254
47.22222222	4.191874088
52.77777778	4.454034923
58.33333333	4.47691648
63.88888889	4.49347614
69.44444444	4.53244127
75	4.675015001
80.55555556	6.946647273
86.11111111	7.086447498
91.66666667	7.227914147
97.22222222	8.688639841

Sec. C-2.4.1: Ecuación de la curva corregida para la curva de valores predichos del % de humedad mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de todas las presentaciones utilizando la regresión (PLSRAb.2):

$$Y = 0.97(\pm 0.03)x + 0.1(\pm 0.2)$$

Figura C-2.5: Curva de valores predichos del % de humedad mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de todas las presentaciones utilizando la regresión (PLSRAb.1)



Sec. C-2.5: Análisis de la regresión para curva de valores predichos del % de humedad mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de todas las presentaciones utilizando la regresión (PLSRAb.1)

PLSRAb.1Pred.Todas

SUMMARY OUTPUT

Regression Statistics	
Multiple R	0.991374626
R Square	0.982823648
Adjusted R Square	0.981750126
Standard Error	0.219807257
Observations	18

ANOVA					
	df	SS	MS	F	Significance F
Regression	1	44.2332355	44.2332355	915.5132949	1.4993E-15
Residual	16	0.773043682	0.04831523		
Total	17	45.00627918			

	Coefficients	Standard Error	t Stat	P-value	Lower 95%	Upper 95%	Lower 95.0%	Upper 95.0%
Intercept	0.177585892	0.15993852	1.110338471	0.283261936	-0.161468622	0.516640406	0.161468622	0.516640406
X Variable 1	0.95004313	0.031398651	30.25745024	1.4993E-15	0.883480963	1.016605297	0.883480963	1.016605297

RESIDUAL OUTPUT

Observation	Predicted Y	Residuals	Standard Residuals
1	4.331649477	0.161826663	0.758878978
2	4.352835439	0.124081041	0.581872553
3	4.35882071	0.095214213	0.44650284
4	3.754460274	0.042925053	0.201295139
5	8.527514959	0.161124882	0.755588005
6	4.151046278	0.523968723	2.457128149
7	4.187242921	0.345198349	1.618792386
8	4.29317273	-0.32011002	-1.501141776
9	4.223629573	-0.031755485	-0.148915942
10	4.26410141	-0.196228156	-0.920203259
11	4.275026906	-0.226681242	-1.063011657
12	4.267521565	-0.235384697	-1.103826125
13	7.21379532	-0.127347822	-0.597191976
14	7.21645544	0.011458706	0.053735096
15	7.109005562	-0.162358289	-0.761372014
16	2.982873245	-0.061821418	-0.289908807
17	2.996933884	-0.043110567	-0.202165096
18	3.101628637	-0.060999934	-0.286056494

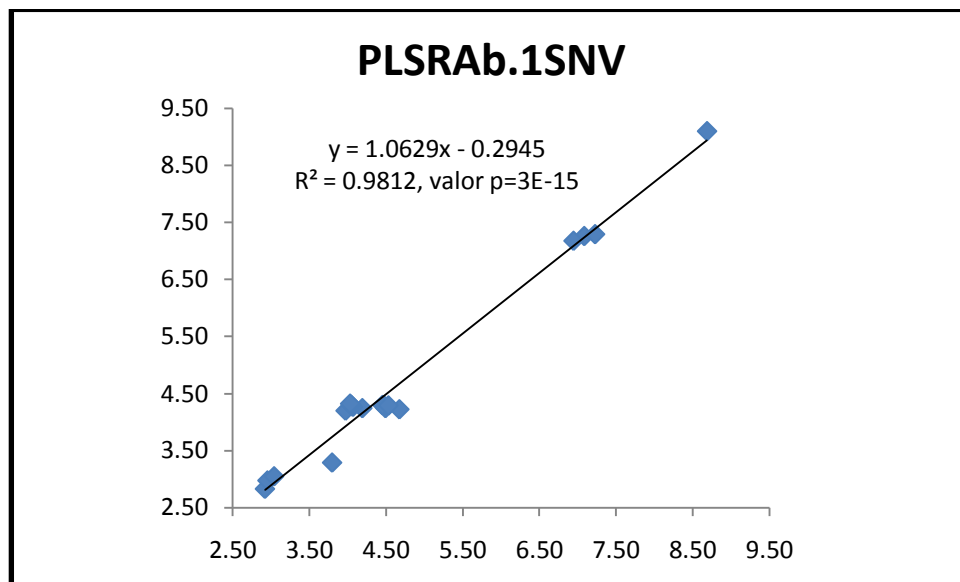
PROBABILITY OUTPUT

Percentile	Y
2.777777778	2.921051827
8.333333333	2.953823317
13.88888889	3.040628702
19.44444444	3.797385327
25	3.97306271
30.55555556	4.032136868
36.11111111	4.048345664
41.66666667	4.067873254
47.22222222	4.191874088
52.77777778	4.454034923
58.33333333	4.47691648
63.88888889	4.49347614
69.44444444	4.53244127
75	4.675015001
80.55555556	6.946647273
86.11111111	7.086447498
91.66666667	7.227914147
97.22222222	8.688639841

Sec. C-2.5.1: Ecuación de la curva corregida para la curva de valores predichos del % de humedad mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de todas las presentaciones utilizando la regresión (PLSRAb.1):

$$Y = 0.95(\pm 0.03)x + 0.2(\pm 0.2)$$

Figura C-2.6: Curva de valores predichos del % de humedad mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de todas las presentaciones utilizando la regresión (PLSRAb.1SNV)



Sec. C-2.6: Análisis de la regresión para curva de valores predichos del % de humedad mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de todas las presentaciones utilizando la regresión (PLSRAb.1SNV)

PLSRAb.1SNV.Pred.Todas

SUMMARY OUTPUT

Regression Statistics	
Multiple R	0.990579618
R Square	0.981247979
Adjusted R Square	0.980075978
Standard Error	0.229668061
Observations	18

ANOVA					
	df	SS	MS	F	Significance F
Regression	1	44.16232049	44.16232049	837.2413663	3.02785E-15
Residual	16	0.843958691	0.052747418		
Total	17	45.00627918			

	Coefficients	Standard Error	t Stat	P-value	Lower 95%	Upper 95%	Lower 95.0%	Upper 95.0%
Intercept	0.361079261	0.161246546	2.2392992	0.03969387	0.019251856	0.702906666	0.019251856	0.702906666
X Variable 1	0.923210986	0.03190624	28.9351234	3.02785E-15	0.85557278	0.990849193	0.85557278	0.990849193

RESIDUAL OUTPUT

Observation	Predicted Y	Residuals	Standard Residuals
1	4.281217751	0.212258389	0.952639817
2	4.323408493	0.153507987	0.688961322
3	4.330609539	0.123425385	0.55394718
4	3.399551259	0.397834068	1.785524593
5	8.764699584	0.076059743	-0.341364788
6	4.262014962	0.413000039	1.853591197
7	4.324147062	0.208294208	0.934848122
8	4.23995022	0.266887509	-1.197821529
9	4.280571503	0.088697415	-0.398084098
10	4.301436071	0.233562818	-1.048256518
11	4.331717392	0.283371728	-1.271804578
12	4.353043566	0.320906697	-1.440265795
13	7.066914581	0.019532917	0.087665956
14	7.09710358	0.130810567	0.587092716
15	6.989826463	-0.04317919	-0.193793122
16	2.974689563	0.053637736	-0.240732266
17	3.109847651	0.156024335	-0.700254978
18	3.17696509	0.136336388	-0.611893232

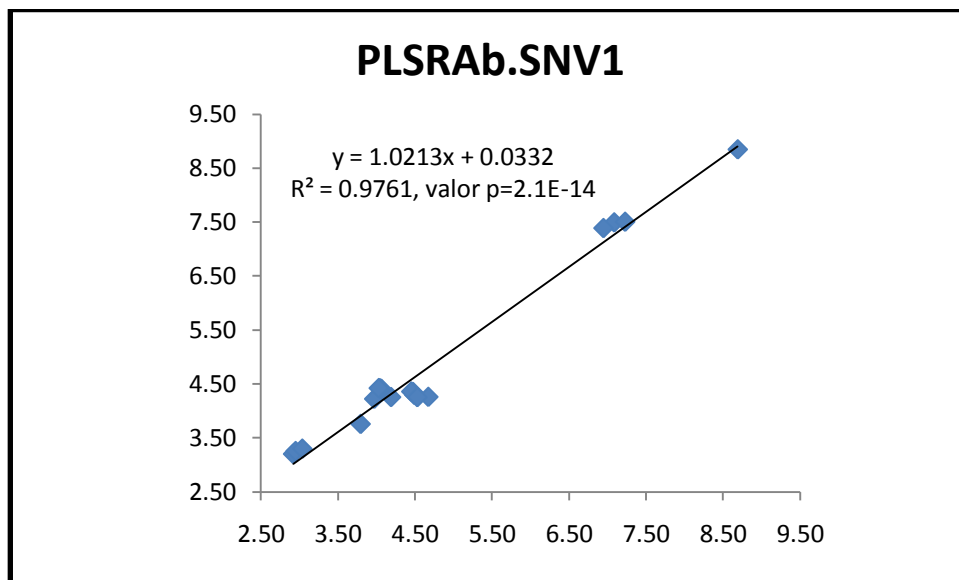
PROBABILITY OUTPUT

Percentile	Y
2.777777778	2.921051827
8.333333333	2.953823317
13.88888889	3.040628702
19.44444444	3.797385327
25	3.97306271
30.55555556	4.032136868
36.11111111	4.048345664
41.66666667	4.067873254
47.22222222	4.191874088
52.77777778	4.454034923
58.33333333	4.47691648
63.88888889	4.49347614
69.44444444	4.53244127
75	4.675015001
80.55555556	6.946647273
86.11111111	7.086447498
91.66666667	7.227914147
97.22222222	8.688639841

Sec. C-2.6.1: Ecuación de la curva corregida para la curva de valores predichos del % de humedad mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de todas las presentaciones utilizando la regresión (PLSRAb.1SNV):

$$Y = 0.92(\pm 0.03)x + 0.4(\pm 0.2)$$

Figura C-2.7: Curva de valores predichos del % de humedad mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de todas las presentaciones utilizando la regresión (PLSRAb.SNV1)



Sec. C-2.7: Análisis de la regresión para curva de valores predichos del % de humedad mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de todas las presentaciones utilizando la regresión (PLSRAb.SNV1)

PLSRAb.SNV1.Pred.Todas

SUMMARY OUTPUT

Regression Statistics	
Multiple R	0.987984279
R Square	0.976112935
Adjusted R Square	0.974619994
Standard Error	0.259213703
Observations	18

ANOVA					
	df	SS	MS	F	Significance F
Regression	1	43.93121128	43.93121128	653.8185931	2.10408E-14
Residual	16	1.075067898	0.067191744		
Total	17	45.00627918			

	Coefficients	Standard Error	t Stat	P-value	Lower 95%	Upper 95%	Lower 95.0%	Upper 95.0%
Intercept	0.081859213	0.192738218	0.424717077	0.676699201	-0.326727554	0.490445979	0.326727554	0.490445979
X Variable 1	0.955760384	0.037378373	25.56987667	2.10408E-14	0.876521773	1.034998994	0.876521773	1.034998994

RESIDUAL OUTPUT

Observation	Predicted Y	Residuals	Standard Residuals
1	4.190768678	0.302707462	1.203731542
2	4.241041674	0.235874806	0.937968102
3	4.249547941	0.204486982	0.813152833
4	3.674944799	0.122440528	0.486890957
5	8.539000543	0.149639298	0.595048242
6	4.154927663	0.520087338	2.068153619
7	4.149670981	0.382770289	1.522105423
8	4.119946833	0.146884123	-0.584092148
9	4.15091347	0.040960618	0.162881971
10	4.29542444	0.227551186	-0.904868806
11	4.30651126	0.258165596	-1.026608558
12	4.310429878	0.278293009	-1.106646236
13	7.245856744	0.159409246	-0.633898934
14	7.256656836	-0.02874269	-0.11429676
15	7.144832871	0.198185598	-0.788095061
16	3.144497786	0.223445959	-0.888544163
17	3.19505751	0.241234193	-0.959279978
18	3.237684423	0.197055721	-0.783602047

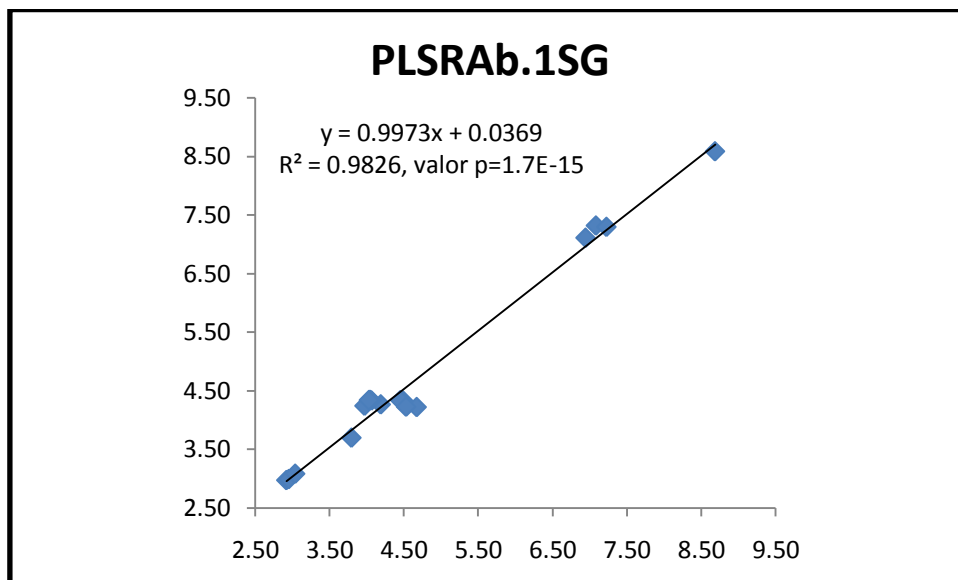
PROBABILITY OUTPUT

Percentile	Y
2.777777778	2.921051827
8.333333333	2.953823317
13.88888889	3.040628702
19.44444444	3.797385327
25	3.97306271
30.55555556	4.032136868
36.11111111	4.048345664
41.66666667	4.067873254
47.22222222	4.191874088
52.77777778	4.454034923
58.33333333	4.47691648
63.88888889	4.49347614
69.44444444	4.53244127
75	4.675015001
80.55555556	6.946647273
86.11111111	7.086447498
91.66666667	7.227914147
97.22222222	8.688639841

Sec. C-2.7.1: Ecuación de la curva corregida para la curva de valores predichos del % de humedad mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de todas las presentaciones utilizando la regresión (PLSRAb.SNV1):

$$Y = 0.96(\pm 0.04)x + 0.1(\pm 0.2)$$

Figura C-2.8: Curva de valores predichos del % de humedad mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de todas las presentaciones utilizando la regresión (PLSRAb.1SG)



Sec. C-2.8: Análisis de la regresión para curva de valores predichos del % de humedad mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de todas las presentaciones utilizando la regresión (PLSRAb.1SG)

PLSRAb.1SG.Pred.Todas

SUMMARY OUTPUT

Regression Statistics	
Multiple R	0.991260016
R Square	0.982596419
Adjusted R Square	0.981508696
Standard Error	0.221256413
Observations	18

ANOVA					
	df	SS	MS	F	Significance F
Regression	1	44.22300878	44.22300878	903.3510457	1.66569E-15
Residual	16	0.783270406	0.0489544		
Total	17	45.00627918			

	Coefficients	Standard Error	t Stat	P-value	Lower 95%	Upper 95%	Lower 95.0%	Upper 95.0%
Intercept	0.046445632	0.165143693	0.281243752	0.782128111	0.303643356	0.39653462	0.303643356	0.39653462
X Variable 1	0.985255665	0.032780884	30.05579887	1.66569E-15	0.915763295	1.054748034	0.915763295	1.054748034

RESIDUAL OUTPUT

Observation	Predicted Y	Residuals	Standard Residuals
1	4.31348939	0.17998675	0.83851172
2	4.315361375	0.161555104	0.752643449
3	4.319499449	0.134535474	0.62676598
4	3.690315182	0.107070145	0.498812116
5	8.506146345	0.182493497	0.850190003
6	4.205997997	0.469017005	2.185028925
7	4.211318377	0.321122893	1.496028506
8	4.22747657	-0.25441386	-1.185248374
9	4.250827129	0.058953041	-0.274646973
10	4.315459901	0.247586647	-1.153442157
11	4.325903611	0.277557947	-1.293070691
12	4.323440472	0.291303604	-1.35710815
13	7.257827418	-0.17137992	-0.798414723
14	7.235659165	0.007745019	-0.036082038
15	7.052697188	0.106049915	-0.494059127
16	2.976990081	0.055938254	-0.260601856
17	2.994429106	0.040605789	-0.189171869
18	3.084875576	0.044246874	-0.206134741

PROBABILITY OUTPUT

Percentile	Y
2.777777778	2.921051827
8.333333333	2.953823317
13.88888889	3.040628702
19.44444444	3.797385327
25	3.97306271
30.55555556	4.032136868
36.11111111	4.048345664
41.66666667	4.067873254
47.22222222	4.191874088
52.77777778	4.454034923
58.33333333	4.47691648
63.88888889	4.49347614
69.44444444	4.53244127
75	4.675015001
80.55555556	6.946647273
86.11111111	7.086447498
91.66666667	7.227914147
97.22222222	8.688639841

Sec. C-2.8.1: Ecuación de la curva corregida para la curva de valores predichos del % de humedad mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de todas las presentaciones utilizando la regresión (PLSRAb.1SG):

$$Y = 1.01(\pm 0.01)x - 0.04(\pm 0.07)$$

Tabla C-2a: Resumen de los parámetros de linealidad obtenida de los análisis de varianza para todas las regresiones de valores predichos del % de humedad mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de todas las presentaciones

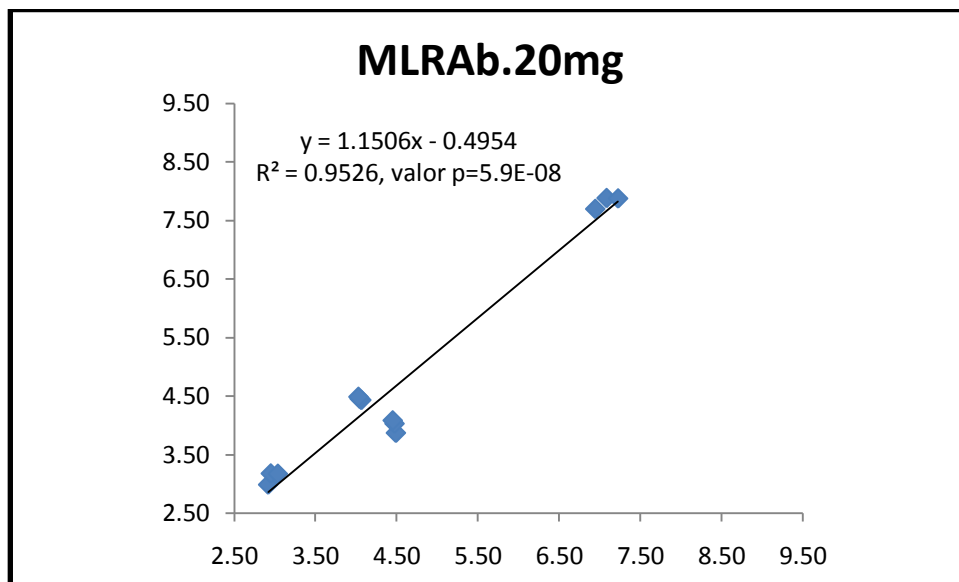
Regression	R Square	Adjusted R Square	SSreg.	SSres.	MSreg.	MSres.	F	Significance F
MLRAb.20mg	0.9379	0.9340	42.2121	2.7942	42.2121	0.1746	241.7	4.45944E-11
PLSRAb.20mgB	0.9767	0.9753	43.9580	1.0483	43.9580	0.0655	670.9	1.71964E-14
MLRAb.3	0.9181	0.9130	41.3223	3.6840	41.3223	0.2302	179.5	4.1102E-10
PLSRAb.2	0.9825	0.9814	44.2180	0.7883	44.2180	0.0493	897.5	1.75351E-15
PLSRAb.1	0.9828	0.9818	44.2332	0.7730	44.2332	0.0483	915.5	1.4993E-15
PLSRAb.1SNV	0.9812	0.9801	44.1623	0.8440	44.1623	0.0527	837.2	3.02785E-15
PLSRAb.SNV1	0.9761	0.9746	43.9312	1.0751	43.9312	0.0672	653.8	2.10408E-14
PLSRAb.1SG	0.9826	0.9815	44.2230	0.7833	44.2230	0.0490	903.4	1.66569E-15

Tabla C-2b: Resumen de todas las ecuaciones de las curvas de valores predichos del % de humedad mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de todas las presentaciones

Regresión	Ecuación de la grafica	Ecuación corregida
MLRAb.20mg	$y = 1.0767x - 0.3309$	$y = 0.87(\pm 0.06)x + 0.6(\pm 0.3)$
PLSRAb.20mgB	$y = 1.1549x - 0.729$	$y = 0.85(\pm 0.03)x + 0.7(\pm 0.2)$
MLRAb.3	$y = 1.1313x - 0.4258$	$y = 0.81(\pm 0.06)x + 0.7(\pm 0.3)$
PLSRAb.2	$y = 1.0099x - 0.0244$	$y = 0.97(\pm 0.03)x + 0.1(\pm 0.2)$
PLSRAb.1	$y = 1.0345x - 0.1009$	$y = 0.95(\pm 0.03)x + 0.2(\pm 0.2)$
PLSRAb.1SNV	$y = 1.0629x - 0.2945$	$y = 0.92(\pm 0.03)x + 0.4(\pm 0.2)$
PLSRAb.SNV1	$y = 1.0213x + 0.0332$	$y = 0.96(\pm 0.04)x + 0.1(\pm 0.2)$
PLSRAb.1SG	$y = 0.9868x + 0.0778$	$y = 1.01(\pm 0.01)x - 0.04(\pm 0.07)$

Sec. C-3: Análisis de regresiones para las muestras de validación de 20mg

Figura C-3.1: Curva de valores del % de humedad predichos mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de 20mg utilizando la regresión (MLRAb.20mg)



Sec. C-3.1: Análisis de la regresión para curva de valores del % de humedad predichos mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de 20mg utilizando la regresión (MLRAb.20mg)

MLRAb.20mg.Pred.20mg

SUMMARY OUTPUT

Regression Statistics	
Multiple R	0.976029275
R Square	0.952633145
Adjusted R Square	0.947896459
Standard Error	0.360835943
Observations	12

ANOVA

	df	SS	MS	F	Significance F
Regression	1	26.18609381	26.18609381	201.1180907	5.98723E-08
Residual	10	1.302025776	0.130202578		
Total	11	27.48811959			

	Coefficients	Standard Error	t Stat	P-value	Lower 95%	Upper 95%	Lower 95.0%	Upper 95.0%
Intercept	0.630262407	0.301701347	2.089027492	0.063232231	0.041970082	1.302494896	0.041970082	1.302494896
X Variable 1	0.827980508	0.058384094	14.181611	5.98723E-08	0.69789264	0.958068375	0.69789264	0.958068375

RESIDUAL OUTPUT

Observation	Predicted Y	Residuals	Standard Residuals
1	3.838935269	0.654540871	1.902494113
2	3.970252977	0.506663502	1.472672484
3	4.015212319	0.438822604	1.275485548
4	4.303515132	0.235641878	-0.684918705
5	4.321233915	0.272888251	-0.793179332
6	4.348888464	0.316751595	-0.920672906
7	7.159551095	0.073103597	-0.212483544
8	7.15383803	0.074076117	0.215310277
9	7.005381125	0.058733852	-0.170716317
10	3.107083298	0.186031471	-0.54072067
11	3.264896383	0.311073066	-0.904167644
12	3.260508086	0.219879384	-0.639103305

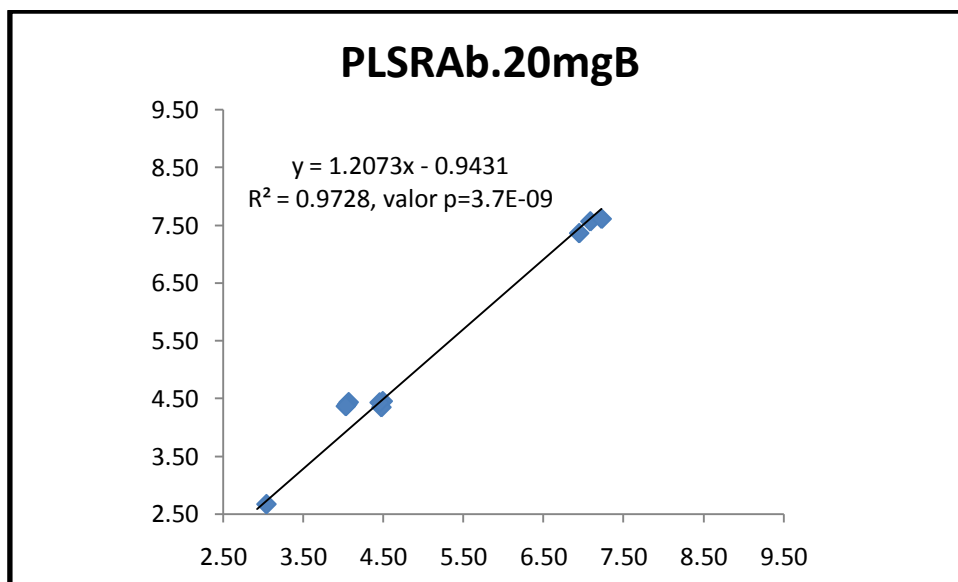
PROBABILITY OUTPUT

Percentile	Y
4.166666667	2.921051827
12.5	2.953823317
20.83333333	3.040628702
29.16666667	4.032136868
37.5	4.048345664
45.83333333	4.067873254
54.16666667	4.454034923
62.5	4.47691648
70.83333333	4.49347614
79.16666667	6.946647273
87.5	7.086447498
95.83333333	7.227914147

Sec. C-3.1.1: Ecuación de la curva corregida para la curva de valores predichos del % de humedad mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de 20mg utilizando la regresión (MLRAb.20mg):

$$Y = 0.83(\pm 0.06)x + 0.6(\pm 0.03)$$

Figura C-3.2: Curva de valores del % de humedad predichos mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de 20mg utilizando la regresión (PLSRAb.20mgB)



Sec. C-3.2: Análisis de la regresión para curva de valores del % de humedad predichos mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de 20mg utilizando la regresión (PLSRAb.20mgB)

PLSRAb.20mgB.Pred.20mg

SUMMARY OUTPUT

Regression Statistics	
Multiple R	0.986290754
R Square	0.972769451
Adjusted R Square	0.970046396
Standard Error	0.273590313
Observations	12

ANOVA					
	df	SS	MS	F	Significance F
Regression	1	26.73960299	26.73960299	357.2346065	3.72709E-09
Residual	10	0.748516591	0.074851659		
Total	11	27.48811959			

	Coefficients	Standard Error	t Stat	P-value	Lower 95%	Upper 95%	Lower 95.0%	Upper 95.0%
Intercept	0.886421593	0.214007324	4.142015222	0.002005381	0.409583562	1.363259624	0.409583562	1.363259624
X Variable 1	0.805731051	0.042629804	18.90065095	3.72709E-09	0.710745929	0.900716174	0.710745929	0.900716174

RESIDUAL OUTPUT

Observation	Predicted Y	Residuals	Standard Residuals
1	4.475631134	0.017845006	0.068408855
2	4.391593385	0.085323094	0.327086202
3	4.457743905	0.003708981	-0.014218385
4	4.461530841	0.393657587	-1.509086913
5	4.431396499	0.383050835	-1.468425916
6	4.406015971	0.373879103	-1.433266067
7	6.979520949	0.106926549	0.409903075
8	7.015295408	0.212618739	0.815074234
9	6.815957546	0.130689727	0.500999254
10	2.470811132	0.450240695	1.725998337
11	2.802208314	0.151615003	0.581216328
12	3.041591009	0.000962307	-0.003689004

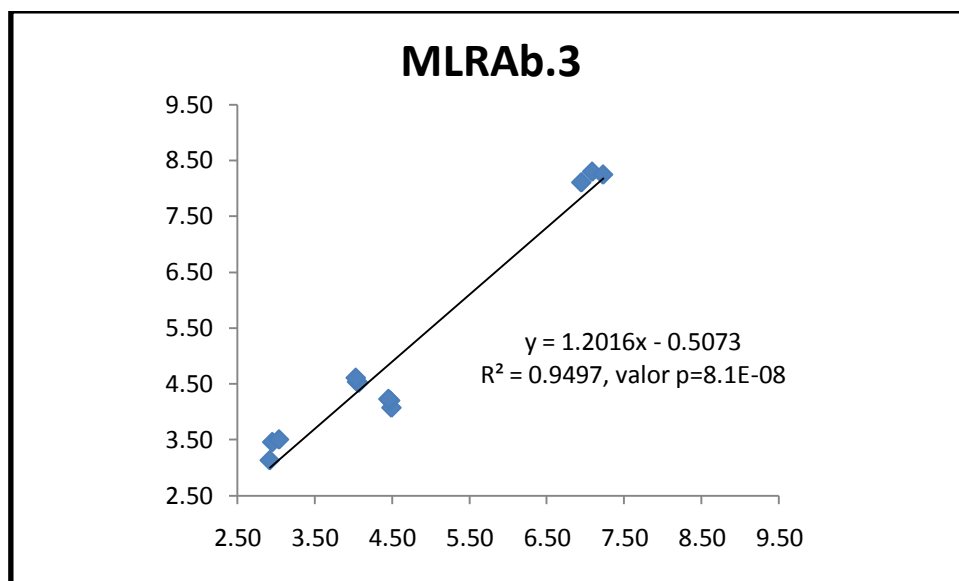
PROBABILITY OUTPUT

Percentile	Y
4.166666667	2.921051827
12.5	2.953823317
20.83333333	3.040628702
29.16666667	4.032136868
37.5	4.048345664
45.83333333	4.067873254
54.16666667	4.454034923
62.5	4.47691648
70.83333333	4.49347614
79.16666667	6.946647273
87.5	7.086447498
95.83333333	7.227914147

Sec. C-3.2.1: Ecuación de la curva corregida para la curva de valores predichos del % de humedad mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de 20mg utilizando la regresión (PLSRAb.20mgB):

$$Y = 0.81(\pm 0.04)x + 0.9(\pm 0.02)$$

Figura C-3.3: Curva de valores del % de humedad predichos mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de 20mg utilizando la regresión (MLRAb.3)



Sec. C-3.3: Análisis de la regresión para curva de valores del % de humedad predichos mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de 20mg utilizando la regresión (MLRAb.3)

MLRAb.3.Pred.20mg

SUMMARY OUTPUT

Regression Statistics	
Multiple R	0.974538224
R Square	0.949724751
Adjusted R Square	0.944697226
Standard Error	0.371748848
Observations	12

ANOVA					Significance F
	df	SS	MS	F	
Regression	1	26.10614753	26.10614753	188.9050312	8.07559E-08
Residual	10	1.381972061	0.138197206		
Total	11	27.48811959			

	Coefficients	Standard Error	t Stat	P-value	Lower 95%	Upper 95%	Lower 95.0%	Upper 95.0%
Intercept	0.634527572	0.310953461	2.040586943	0.068579998	0.058319912	1.327375056	0.058319912	1.327375056
X Variable 1	0.790405199	0.057507968	13.74427267	8.07559E-08	0.66226946	0.918540937	0.66226946	0.918540937

RESIDUAL OUTPUT

Observation	Predicted Y	Residuals	Standard Residuals
1	3.853373703	0.640102437	1.80591037
2	3.954466528	0.522449952	1.473979369
3	3.976360752	0.477674172	1.347654204
4	4.205104016	-0.137230762	-0.387166869
5	4.219568431	-0.171222767	-0.483067948
6	4.276082403	-0.243945535	-0.688239483
7	7.192203343	-0.105755845	-0.298367208
8	7.151734596	0.07617955	0.214924099
9	7.040761707	-0.094114433	-0.265523487
10	3.10944433	-0.188392503	-0.531508637
11	3.3664841	-0.412660784	-1.164233012
12	3.403712185	-0.363083483	-1.024361397

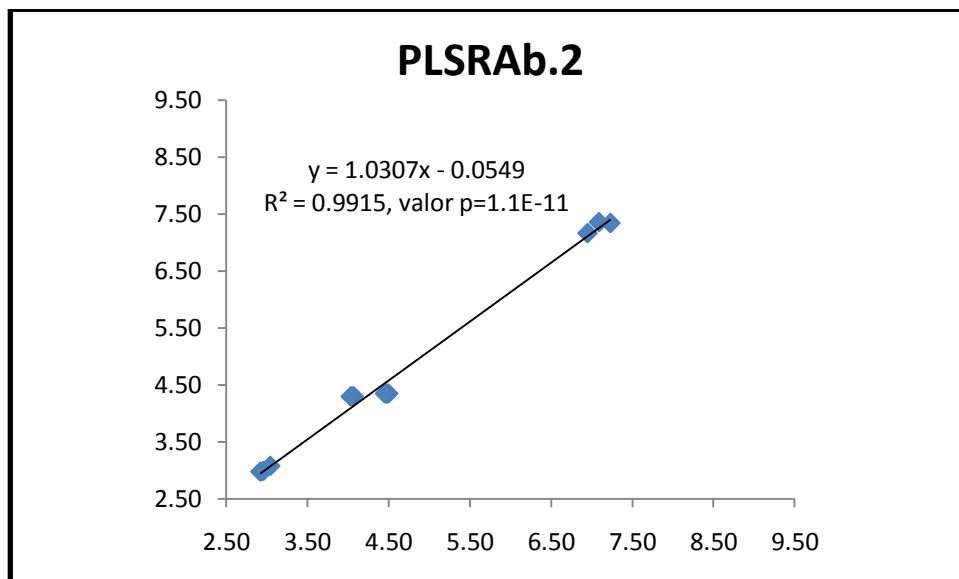
PROBABILITY OUTPUT

Percentile	Y
4.166666667	2.921051827
12.5	2.953823317
20.83333333	3.040628702
29.16666667	4.032136868
37.5	4.048345664
45.83333333	4.067873254
54.16666667	4.454034923
62.5	4.47691648
70.83333333	4.49347614
79.16666667	6.946647273
87.5	7.086447498
95.83333333	7.227914147

Sec. C-3.3.1: Ecuación de la curva corregida para la curva de valores predichos del % de humedad mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de 20mg utilizando la regresión (MLRAb.3):

$$Y = 0.79(\pm 0.06)x + 0.6(\pm 0.03)$$

Figura C-3.4: Curva de valores del % de humedad predichos mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de 20mg utilizando la regresión (PLSRAb.2)



Sec. C-3.4: Análisis de la regresión para curva de valores del % de humedad predichos mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de 20mg utilizando la regresión (PLRAb.2)

PLSRAb.2.Pred.20mg

SUMMARY OUTPUT

Regression Statistics	
Multiple R	0.995759025
R Square	0.991536036
Adjusted R Square	0.990689639
Standard Error	0.152531458
Observations	12

ANOVA					
	df	SS	MS	F	Significance F
Regression	1	27.25546113	27.25546113	1171.479488	1.07277E-11
Residual	10	0.232658458	0.023265846		
Total	11	27.48811959			

	<i>Coefficients</i>	<i>Standard Error</i>	<i>t Stat</i>	<i>P-value</i>	<i>Lower 95%</i>	<i>Upper 95%</i>	<i>Lower 95.0%</i>	<i>Upper 95.0%</i>
Intercept	0.092147708	0.140139586	0.657542319	0.525677559	0.220102746	0.404398163	0.220102746	0.404398163
X Variable 1	0.96197967	0.028105968	34.22688254	1.07277E-11	0.899355671	1.024603669	0.899355671	1.024603669

RESIDUAL OUTPUT

<i>Observation</i>	<i>Predicted Y</i>	<i>Residuals</i>	<i>Standard Residuals</i>
1	4.273007552	0.220468588	1.51594568
2	4.267043278	0.209873201	1.443091628
3	4.271853177	0.182181747	1.252684725
4	4.226062944	-0.158189691	-1.087714947
5	4.224138985	-0.175793321	-1.208757803
6	4.222407422	-0.190270553	-1.308303494
7	7.165488024	-0.079040526	-0.543483975
8	7.150192547	0.077721599	0.534415011
9	6.979633552	-0.032986279	-0.226814201
10	2.954037227	-0.0329854	-0.226808157
11	2.964907597	-0.01108428	-0.076215695
12	3.050523788	-0.009895085	-0.068038772

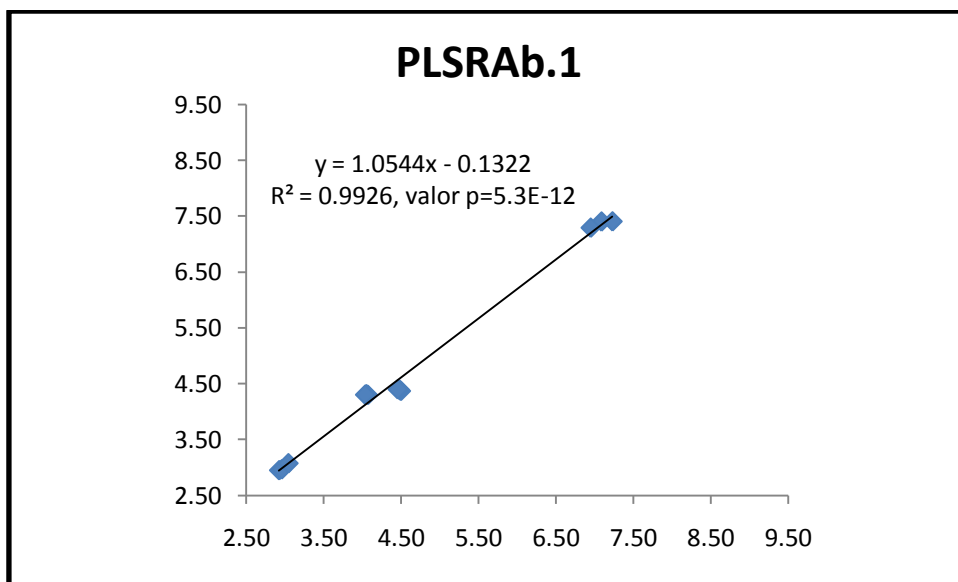
PROBABILITY OUTPUT

<i>Percentile</i>	<i>Y</i>
4.166666667	2.921051827
12.5	2.953823317
20.83333333	3.040628702
29.16666667	4.032136868
37.5	4.048345664
45.83333333	4.067873254
54.16666667	4.454034923
62.5	4.47691648
70.83333333	4.49347614
79.16666667	6.946647273
87.5	7.086447498
95.83333333	7.227914147

Sec. C-3.4.1: Ecuación de la curva corregida para la curva de valores predichos del % de humedad mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de 20mg utilizando la regresión (PLSRAb.2):

$$Y = 0.96(\pm 0.03)x + 0.1(\pm 0.1)$$

Figura C-3.5: Curva de valores del % de humedad predichos mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de 20mg utilizando la regresión (PLSRAb.1)



Sec. C-3.5: Análisis de la regresión para curva de valores del % de humedad predichos mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de 20mg utilizando la regresión (PLSRAb.1)

PLSRAb.1.Pred.20mg

SUMMARY OUTPUT

Regression Statistics	
Multiple R	0.996311652
R Square	0.992636907
Adjusted R Square	0.991900598
Standard Error	0.142266503
Observations	12

ANOVA					
	df	SS	MS	F	Significance F
Regression	1	27.28572201	27.28572201	1348.124914	5.34243E-12
Residual	10	0.20239758	0.020239758		
Total	11	27.48811959			

	Coefficients	Standard Error	t Stat	P-value	Lower 95%	Upper 95%	Lower 95.0%	Upper 95.0%
Intercept	0.158634652	0.128925482	1.230436756	0.24669166	0.128629223	0.445898527	0.128629223	0.445898527
X Variable 1	0.941407421	0.025639677	36.71682059	5.34243E-12	0.884278661	0.998536181	0.884278661	0.998536181

RESIDUAL OUTPUT

<i>Observation</i>	<i>Predicted Y</i>	<i>Residuals</i>	<i>Standard Residuals</i>
1	4.274938601	0.218537539	1.611089743
2	4.295931987	0.180984493	1.334243362
3	4.301862853	0.15217207	1.121834091
4	4.208004533	-0.14013128	-1.033067676
5	4.218830719	-0.170485055	-1.256840013
6	4.2113936	-0.179256732	-1.321506061
7	7.130886295	-0.044438797	-0.327609114
8	7.133522235	0.094391911	0.695870563
9	7.027049056	-0.080401783	-0.59273335
10	2.938422485	-0.017370658	-0.128058957
11	2.952355315	0.001468002	0.010822316
12	3.056098413	-0.015469711	-0.114044903

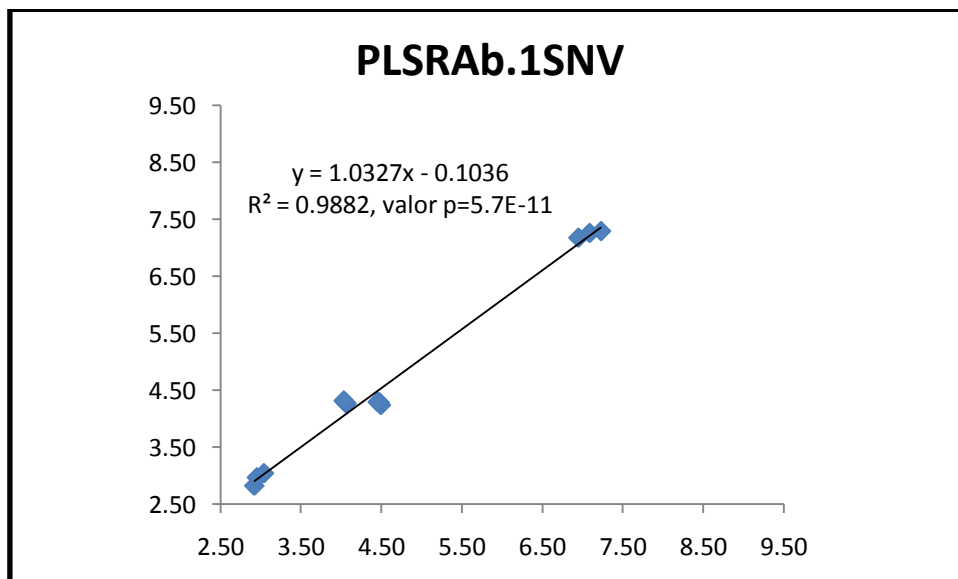
PROBABILITY OUTPUT

<i>Percentile</i>	<i>Y</i>
4.166666667	2.921051827
12.5	2.953823317
20.83333333	3.040628702
29.16666667	4.032136868
37.5	4.048345664
45.83333333	4.067873254
54.16666667	4.454034923
62.5	4.47691648
70.83333333	4.49347614
79.16666667	6.946647273
87.5	7.086447498
95.83333333	7.227914147

Sec. C-3.5.1: Ecuación de la curva corregida para la curva de valores predichos del % de humedad mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de 20mg utilizando la regresión (PLSRAb.1):

$$Y = 0.94(\pm 0.03)x + 0.2(\pm 0.1)$$

Figura C-3.6: Curva de valores del % de humedad predichos mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de 20mg utilizando la regresión (PLSRAb.1SNV)



Sec. C-3.6: Análisis de la regresión para curva de valores del % de humedad predichos mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de 20mg utilizando la regresión (PLSRAb.1SNV)

PLSRAb.1SNV.Pred.20ng

SUMMARY OUTPUT

Regression Statistics	
Multiple R	0.994081336
R Square	0.988197702
Adjusted R Square	0.987017472
Standard Error	0.180117454
Observations	12

ANOVA					
	df	SS	MS	F	Significance F
Regression	1	27.16369661	27.16369661	837.2926381	5.66344E-11
Residual	10	0.324422972	0.032442297		
Total	11	27.48811959			

	<i>Coefficients</i>	<i>Standard Error</i>	<i>t Stat</i>	<i>P-value</i>	<i>Lower 95%</i>	<i>Upper 95%</i>	<i>Lower 95.0%</i>	<i>Upper 95.0%</i>
Intercept	0.153991124	0.163708216	0.940643837	0.36905399	-0.21077351	0.518755759	-0.21077351	0.518755759
X Variable 1	0.956898144	0.033069458	28.93600937	5.66344E-11	0.8832148	1.030581487	0.8832148	1.030581487

RESIDUAL OUTPUT

<i>Observation</i>	<i>Predicted Y</i>	<i>Residuals</i>	<i>Standard Residuals</i>
1	4.217172022	0.276304118	1.608895738
2	4.260902267	0.216014213	1.257832669
3	4.268366072	0.185668851	1.081134168
4	4.238128091	0.170254837	-0.991379658
5	4.26951435	0.221168686	-1.287846735
6	4.291618697	0.259481829	-1.510940957
7	7.10451648	0.018068982	-0.105214171
8	7.13580705	0.092107097	0.536331911
9	7.024615485	0.077968212	-0.454002369
10	2.862969769	0.058082058	0.33820696
11	3.003059657	-0.04923634	-0.286699086
12	3.072626152	-0.03199745	-0.186318471

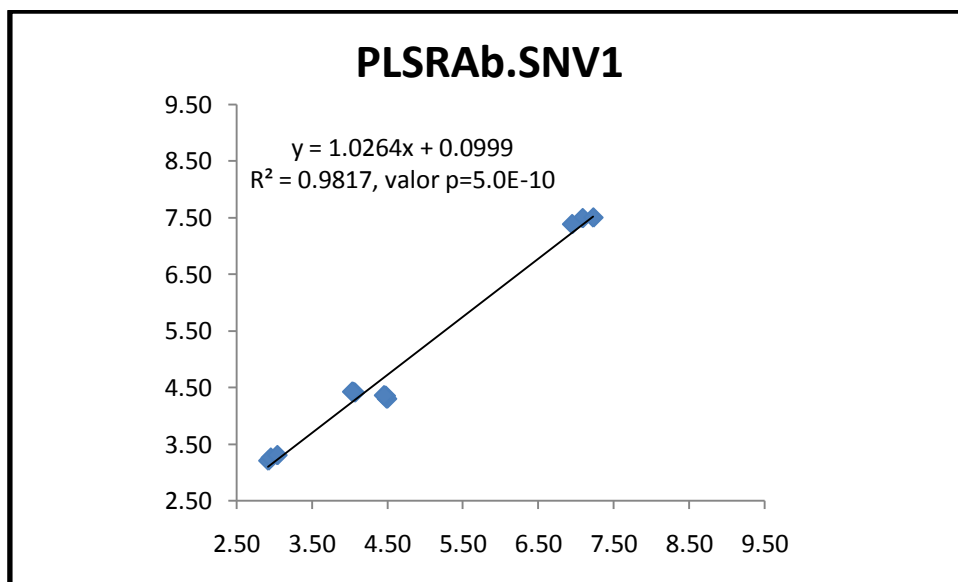
PROBABILITY OUTPUT

<i>Percentile</i>	<i>Y</i>
4.166666667	2.921051827
12.5	2.953823317
20.83333333	3.040628702
29.16666667	4.032136868
37.5	4.048345664
45.83333333	4.067873254
54.16666667	4.454034923
62.5	4.47691648
70.83333333	4.49347614
79.16666667	6.946647273
87.5	7.086447498
95.83333333	7.227914147

Sec. C-3.6.1: Ecuación de la curva corregida para la curva de valores predichos del % de humedad mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de 20mg utilizando la regresión (PLSRAb.1SNV):

$$Y = 0.96(\pm 0.03)x + 0.1(\pm 0.2)$$

Figura C-3.7: Curva de valores del % de humedad predichos mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de 20mg utilizando la regresión (PLSRAb.SNV1)



Sec. C-3.7: Análisis de la regresión para curva de valores del % de humedad predichos mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de 20mg utilizando la regresión (PLSRAb.SNV1)

PLSRAb.SNV1.Pred.20mg

SUMMARY OUTPUT

Regression Statistics	
Multiple R	0.990823392
R Square	0.981730994
Adjusted R Square	0.979904093
Standard Error	0.22409387
Observations	12

ANOVA					
	df	SS	MS	F	Significance F
Regression	1	26.98593896	26.98593896	537.3751511	5.0467E-10
Residual	10	0.502180626	0.050218063		
Total	11	27.48811959			

	Coefficients	Standard Error	t Stat	P-value	Lower 95%	Upper 95%	Lower 95.0%	Upper 95.0%
Intercept	0.010632699	0.211028568	-0.050385119	0.960807696	0.480833648	0.459568249	0.480833648	0.459568249
X Variable 1	0.956460292	0.041259898	23.18135352	5.0467E-10	0.86452751	1.048393074	0.86452751	1.048393074

RESIDUAL OUTPUT

Observation	Predicted Y	Residuals	Standard Residuals
1	4.101285742	0.392190398	1.835537758
2	4.151595553	0.325320927	1.52257385
3	4.16010805	0.293926874	1.375642743
4	4.206018144	-0.13814489	-0.646548622
5	4.217113083	0.168767419	-0.789868828
6	4.22103457	0.188897702	-0.884083002
7	7.158611065	0.072163567	-0.337741446
8	7.169419066	0.05849508	0.273769907
9	7.057513212	0.110865939	-0.518877101
10	3.05424866	0.133196833	-0.623390622
11	3.10484541	0.151022093	-0.706816778
12	3.147503539	0.106874836	-0.500197859

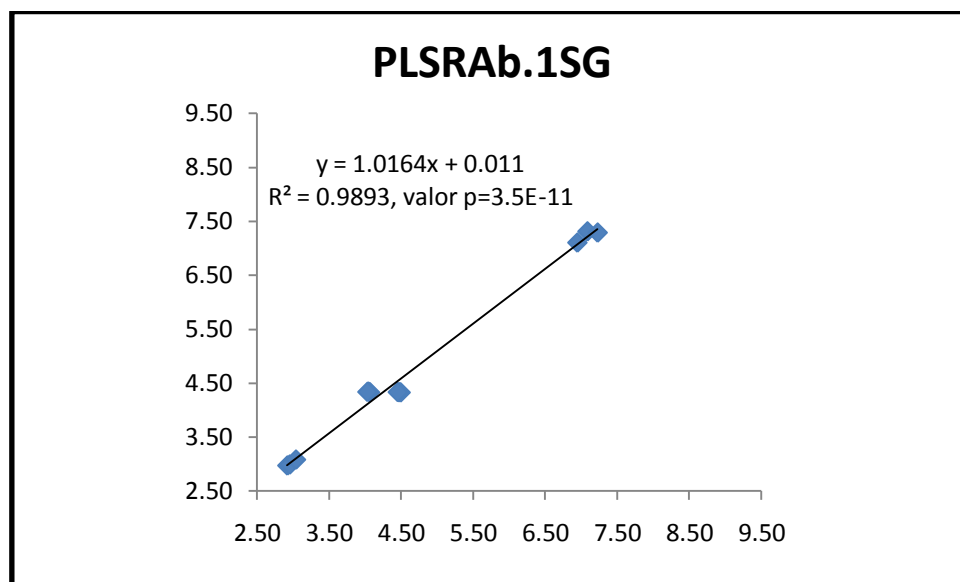
PROBABILITY OUTPUT

Percentile	Y
4.166666667	2.921051827
12.5	2.953823317
20.83333333	3.040628702
29.16666667	4.032136868
37.5	4.048345664
45.83333333	4.067873254
54.16666667	4.454034923
62.5	4.47691648
70.83333333	4.49347614
79.16666667	6.946647273
87.5	7.086447498
95.83333333	7.227914147

Sec. C-3.7.1: Ecuación de la curva corregida para la curva de valores predichos del % de humedad mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de 20mg utilizando la regresión (PLSRAb.SNV1):

$$Y = 0.96(\pm 0.04)x - 0.0(\pm 0.2)$$

Figura C-3.8: Curva de valores del % de humedad predichos mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de 20mg utilizando la regresión (PLSRAb.1SG)



Sec. C-3.8: Análisis de la regresión para curva de valores del % de humedad predichos mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de 20mg utilizando la regresión (PLSRAb.1SG)

PLSRAb.1SG.Pred.20mg

SUMMARY OUTPUT

Regression Statistics					
Multiple R	0.994634488				
R Square	0.989297765				
Adjusted R Square	0.988227542				
Standard Error	0.171518018				
Observations	12				

ANOVA					
	df	SS	MS	F	Significance F
Regression	1	27.19393528	27.19393528	924.384297	3.47071E-11
Residual	10	0.294184306	0.029418431		
Total	11	27.48811959			

	<i>Coefficients</i>	<i>Standard Error</i>	<i>t Stat</i>	<i>P-value</i>	<i>Lower 95%</i>	<i>Upper 95%</i>	<i>Lower 95.0%</i>	<i>Upper 95.0%</i>
Intercept	0.039012667	0.159404508	0.244740048	0.811606517	0.316162709	0.394188043	0.316162709	0.394188043
X Variable 1	0.973333264	0.032013657	30.40368887	3.47071E-11	0.902002392	1.044664137	0.902002392	1.044664137

RESIDUAL OUTPUT

<i>Observation</i>	<i>Predicted Y</i>	<i>Residuals</i>	<i>Standard Residuals</i>
1	4.254421702	0.239054438	1.461784669
2	4.256271035	0.220645444	1.349216232
3	4.260359035	0.193675888	1.184301145
4	4.256368369	-0.188495115	-1.152621434
5	4.266685701	-0.218340037	-1.335118988
6	4.264252368	-0.2321155	-1.419354027
7	7.16313083	-0.076683332	-0.468907919
8	7.141230831	0.086683315	0.530056428
9	6.960482844	-0.013835571	-0.084602593
10	2.934095129	-0.013043302	-0.079757978
11	2.951323128	0.002500189	0.01528831
12	3.040675121	-4.6419E-05	-0.000283846

PROBABILITY OUTPUT

<i>Percentile</i>	<i>Y</i>
4.166666667	2.921051827
12.5	2.953823317
20.83333333	3.040628702
29.16666667	4.032136868
37.5	4.048345664
45.83333333	4.067873254
54.16666667	4.454034923
62.5	4.47691648
70.83333333	4.49347614
79.16666667	6.946647273
87.5	7.086447498
95.83333333	7.227914147

Sec. C-3.8.1: Ecuación de la curva corregida para la curva de valores predichos del % de humedad mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de 20mg utilizando la regresión (PLSRab.1SG):

$$Y = 0.97(\pm 0.03)x + 0.0(\pm 0.2)$$

Tabla C-3a: Resumen de los parámetros de linealidad obtenida de los análisis de varianza para todas las regresiones de valores predichos del % de humedad mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de 20mg

Regresión	R Square	Adjusted R Square	SSreg.	SSres.	MSreg.	MSres.	F	Significance F
MLRAb.20mg	0.9526	0.9479	26.1861	1.3020	26.1861	0.1302	201.1	5.98723E-08
PLSRAb.20mgB	0.9728	0.9700	26.7396	0.7485	26.7396	0.0749	357.2	3.72709E-09
MLRAb.3	0.9497	0.9447	26.1061	1.3820	26.1061	0.1382	188.9	8.07559E-08
PLSRAb.2	0.9915	0.9907	27.2555	0.2327	27.2555	0.0233	1171.5	1.07277E-11
PLSRAb.1	0.9926	0.9919	27.2857	0.2024	27.2857	0.0202	1348.1	5.34243E-12
PLSRAb.1SNV	0.9882	0.9870	27.1637	0.3244	27.1637	0.0324	837.3	5.66344E-11
PLSRAb.SNV1	0.9817	0.9799	26.9859	0.5022	26.9859	0.0502	537.4	5.0467E-10
PLSRAb.1SG	0.9893	0.9882	27.1939	0.2942	27.1939	0.0294	924.4	3.47071E-11

Tabla C-3b: Resumen de todas las ecuaciones de las curvas de valores predichos del % de humedad mediante KF vs. NIR para las muestras de validación de 20mg

Regresión	Ecuación de la gráfica	Ecuación corregida
MLRAb.20mg	$y = 1.1506x - 0.4954$	$y = 0.83(\pm 0.06)x + 0.6(\pm 0.3)$
PLSRAb.20mgB	$y = 1.2073x - 0.9431$	$y = 0.81(\pm 0.04)x + 0.9(\pm 0.2)$
MLRAb.3	$y = 1.2016x - 0.5073$	$y = 0.79(\pm 0.06)x + 0.6(\pm 0.3)$
PLSRAb.2	$y = 1.0307x - 0.0549$	$y = 0.96(\pm 0.03)x + 0.1(\pm 0.1)$
PLSRAb.1	$y = 1.0544x - 0.1322$	$y = 0.94(\pm 0.03)x + 0.2(\pm 0.1)$
PLSRAb.1SNV	$y = 1.0327x - 0.1036$	$y = 0.96(\pm 0.03)x + 0.1(\pm 0.2)$
PLSRAb.SNV1	$y = 1.0264x + 0.0999$	$y = 0.96(\pm 0.04)x - 0.0(\pm 0.2)$
PLSRAb.1SG	$y = 1.0164x + 0.011$	$y = 0.97(\pm 0.03)x + 0.0(\pm 0.2)$

Tabla C-4.1: Medidas de exactitud para MLRAb.20mg

Muestra	KF	MLRAb.20mg	Error Absoluto EA = $ \bar{y} - y $	Error Relativo ER=(AE/y) x 100	Rango=(\bar{y}/y)*100 80-120%
E.8L955(Std.1)A(20mg)	4.49	3.88	-0.62	-13.76	86.24
E.8L955(Std.2)A(20mg)	4.48	4.03	-0.44	-9.90	90.10
E.8L955(Std.3)A(20mg)	4.45	4.09	-0.37	-8.21	91.79
E.8L955(H1)A(20mg)	3.80	3.21	-0.59	-15.52	84.48
E.8L955(W1)A(20mg)	8.69	8.38	-0.31	-3.57	96.43
E.8L017(Std.1)A(2mg)	4.68	4.12	-0.56	-11.96	88.04
E.8L266(Std.1)A(5mg)	4.53	4.38	-0.16	-3.47	96.53
E.8L251(Std.1)A(15mg)	3.97	3.84	-0.13	-3.23	96.77
E.8L006(Std.1)A(10/30)	4.19	4.10	-0.10	-2.31	97.69
E.9ComStd.A	4.07	4.44	0.37	9.06	109.06
E.9ComStd.B	4.05	4.46	0.41	10.11	110.11
E.9ComStd.C	4.03	4.49	0.46	11.39	111.39
E.9Com.WA	7.09	7.89	0.80	11.28	111.28
E.9Com.WB	7.23	7.88	0.65	9.01	109.01
E.9Com.WC	6.95	7.70	0.75	10.84	110.84
E.9Com.DA	2.92	2.99	0.07	2.41	102.41
E.9Com.DB	2.95	3.18	0.23	7.72	107.72
E.9Com.DC	3.04	3.18	0.14	4.48	104.48

Tabla C-4.2: Medidas de exactitud para PLSRAb.20mgB

Muestra	KF	PLSRAb.20mgB	Error Absoluto EA = $ \bar{y} - y $	Error Relativo ER=(AE/y) x 100	Rango=(\bar{y}/y)*100 80-120%
E.8L955(Std.1)A(20mg)	4.49	4.45	-0.04	-0.87	99.13
E.8L955(Std.2)A(20mg)	4.48	4.35	-0.13	-2.83	97.17
E.8L955(Std.3)A(20mg)	4.45	4.43	-0.02	-0.49	99.51
E.8L955(H1)A(20mg)	3.80	3.60	-0.20	-5.20	94.80
E.8L955(W1)A(20mg)	8.69	8.98	0.29	3.38	103.38
E.8L017(Std.1)A(2mg)	4.68	4.56	-0.12	-2.52	97.48
E.8L266(Std.1)A(5mg)	4.53	4.36	-0.18	-3.90	96.10
E.8L251(Std.1)A(15mg)	3.97	4.14	0.17	4.32	104.32
E.8L006(Std.1)A(10/30)	4.19	4.12	-0.07	-1.74	98.26
E.9ComStd.A	4.07	4.44	0.37	9.08	109.08
E.9ComStd.B	4.05	4.40	0.35	8.68	108.68
E.9ComStd.C	4.03	4.37	0.34	8.33	108.33
E.9Com.WA	7.09	7.56	0.48	6.71	106.71
E.9Com.WB	7.23	7.61	0.38	5.24	105.24
E.9Com.WC	6.95	7.36	0.41	5.94	105.94
E.9Com.DA	2.92	1.97	-0.95	-32.68	67.32
E.9Com.DB	2.95	2.38	-0.58	-19.50	80.50
E.9Com.DC	3.04	2.67	-0.37	-12.03	87.97

Tabla C-4.3: Medidas de exactitud para MLRAb.3

Muestra	KF	MLRAb.3	Error Absoluto EA = $ \hat{y} - y $	Error Relativo ER=(AE/y) x 100	Rango=(\hat{y}/y)*100 80-120%
E.8L955(Std.1)A(20mg)	4.49	4.07	-0.42	-9.37	90.63
E.8L955(Std.2)A(20mg)	4.48	4.20	-0.28	-6.18	93.82
E.8L955(Std.3)A(20mg)	4.45	4.23	-0.23	-5.07	94.93
E.8L955(H1)A(20mg)	3.8	2.77	-1.03	-27.08	72.92
E.8L955(W1)A(20mg)	8.69	8.64	-0.05	-0.56	99.44
E.8L017(Std.1)A(2mg)	4.68	4.34	-0.33	-7.11	92.89
E.8L266(Std.1)A(5mg)	4.53	4.50	-0.04	-0.83	99.17
E.8L251(Std.1)A(15mg)	3.97	3.83	-0.14	-3.58	96.42
E.8L006(Std.1)A(10/30)	4.19	4.21	0.01	0.32	100.32
E.9ComStd.A	4.07	4.52	0.45	11.05	111.05
E.9ComStd.B	4.05	4.54	0.49	12.04	112.04
E.9ComStd.C	4.03	4.61	0.58	14.26	114.26
E.9Com.WA	7.09	8.30	1.21	17.08	117.08
E.9Com.WB	7.23	8.25	1.02	14.08	114.08
E.9Com.WC	6.95	8.11	1.16	16.67	116.67
E.9Com.DA	2.92	3.13	0.21	7.19	107.19
E.9Com.DB	2.95	3.46	0.50	17.01	117.01
E.9Com.DC	3.04	3.50	0.46	15.22	115.22

Tabla C-4.4: Medidas de exactitud para PLSRAb.2

Muestra	KF	PLSRAb.2	Error Absoluto EA = $ \hat{y} - y $	Error Relativo ER=(AE/y) x 100	Rango=(\hat{y}/y)*100 80-120%
E.8L955(Std.1)A(20mg)	4.49	4.35	-0.15	-3.28	96.72
E.8L955(Std.2)A(20mg)	4.48	4.34	-0.14	-3.06	96.94
E.8L955(Std.3)A(20mg)	4.45	4.34	-0.11	-2.45	97.55
E.8L955(H1)A(20mg)	3.80	3.70	-0.10	-2.58	97.42
E.8L955(W1)A(20mg)	8.69	8.63	-0.06	-0.68	99.32
E.8L017(Std.1)A(2mg)	4.68	4.19	-0.48	-10.36	89.64
E.8L266(Std.1)A(5mg)	4.53	4.18	-0.35	-7.78	92.22
E.8L251(Std.1)A(15mg)	3.97	4.27	0.30	7.54	107.54
E.8L006(Std.1)A(10/30)	4.19	4.24	0.05	1.20	101.20
E.9ComStd.A	4.07	4.30	0.23	5.64	105.64
E.9ComStd.B	4.05	4.30	0.25	6.10	106.10
E.9ComStd.C	4.03	4.29	0.26	6.48	106.48
E.9Com.WA	7.09	7.35	0.27	3.76	103.76
E.9Com.WB	7.23	7.34	0.11	1.51	101.51
E.9Com.WC	6.95	7.16	0.21	3.07	103.07
E.9Com.DA	2.92	2.98	0.05	1.85	101.85
E.9Com.DB	2.95	2.99	0.03	1.10	101.10
E.9Com.DC	3.04	3.08	0.03	1.14	101.14

Tabla C-4.5: Medidas de exactitud para PLSRab.1

Muestra	KF	PLSRab.1	Error Absoluto EA = $ \hat{y} - y $	Error Relativo ER=(AE/y) x 100	Range=(\hat{y}/y)*100 80-120%
E.8L955(Std.1)A(20mg)	4.49	4.37	-0.12	-2.69	97.31
E.8L955(Std.2)A(20mg)	4.48	4.39	-0.08	-1.83	98.17
E.8L955(Std.3)A(20mg)	4.45	4.40	-0.05	-1.19	98.81
E.8L955(H1)A(20mg)	3.80	3.76	-0.03	-0.85	99.15
E.8L955(W1)A(20mg)	8.69	8.79	0.10	1.16	101.16
E.8L017(Std.1)A(2mg)	4.68	4.18	-0.49	-10.54	89.46
E.8L266(Std.1)A(5mg)	4.53	4.22	-0.31	-6.88	93.12
E.8L251(Std.1)A(15mg)	3.97	4.33	0.36	9.03	109.03
E.8L006(Std.1)A(10/30)	4.19	4.26	0.07	1.60	101.60
E.9ComStd.A	4.07	4.30	0.23	5.74	105.74
E.9ComStd.B	4.05	4.31	0.26	6.53	106.53
E.9ComStd.C	4.03	4.31	0.27	6.77	106.77
E.9Com.WA	7.09	7.41	0.32	4.51	104.51
E.9Com.WB	7.23	7.41	0.18	2.51	102.51
E.9Com.WC	6.95	7.30	0.35	5.03	105.03
E.9Com.DA	2.92	2.95	0.03	1.09	101.09
E.9Com.DB	2.95	2.97	0.01	0.47	100.47
E.9Com.DC	3.04	3.08	0.04	1.22	101.22

Tabla C-4.6: Medidas de exactitud para PLSRab.1SNV

Muestra	KF	PLSRab.1SNV	Error Absoluto EA = $ \hat{y} - y $	Error Relativo ER=(AE/y) x 100	Range=(\hat{y}/y)*100 80-120%
E.8L955(Std.1)A(20mg)	4.49	4.25	-0.25	-5.50	94.50
E.8L955(Std.2)A(20mg)	4.48	4.29	-0.19	-4.13	95.87
E.8L955(Std.3)A(20mg)	4.45	4.30	-0.15	-3.47	96.53
E.8L955(H1)A(20mg)	3.80	3.29	-0.51	-13.33	86.67
E.8L955(W1)A(20mg)	8.69	9.10	0.41	4.76	104.76
E.8L017(Std.1)A(2mg)	4.68	4.23	-0.45	-9.62	90.38
E.8L266(Std.1)A(5mg)	4.53	4.29	-0.24	-5.29	94.71
E.8L251(Std.1)A(15mg)	3.97	4.20	0.23	5.75	105.75
E.8L006(Std.1)A(10/30)	4.19	4.25	0.05	1.28	101.28
E.9ComStd.A	4.07	4.27	0.20	4.92	104.92
E.9ComStd.B	4.05	4.30	0.25	6.24	106.24
E.9ComStd.C	4.03	4.32	0.29	7.24	107.24
E.9Com.WA	7.09	7.26	0.18	2.50	102.50
E.9Com.WB	7.23	7.30	0.07	0.95	100.95
E.9Com.WC	6.95	7.18	0.23	3.36	103.36
E.9Com.DA	2.92	2.83	-0.09	-3.08	96.92
E.9Com.DB	2.95	2.98	0.02	0.80	100.80
E.9Com.DC	3.04	3.05	0.01	0.31	100.31

Tabla C-4.7: Medidas de exactitud para PLSRab.SNV1

Muestra	KF	PLSRab.SNV1	Error Absoluto EA = $ \hat{y} - y $	Error Relativo ER=(AE/y) x 100	Range=(\hat{y}/y)*100 80-120%
E.8L955(Std.1)A(20mg)	4.49	4.30	-0.19	-4.33	95.67
E.8L955(Std.2)A(20mg)	4.48	4.35	-0.13	-2.80	97.20
E.8L955(Std.3)A(20mg)	4.45	4.36	-0.09	-2.10	97.90
E.8L955(H1)A(20mg)	3.80	3.76	-0.04	-1.00	99.00
E.8L955(W1)A(20mg)	8.69	8.85	0.16	1.84	101.84
E.8L017(Std.1)A(2mg)	4.68	4.26	-0.41	-8.84	91.16
E.8L266(Std.1)A(5mg)	4.53	4.26	-0.28	-6.10	93.90
E.8L251(Std.1)A(15mg)	3.97	4.23	0.25	6.34	106.34
E.8L006(Std.1)A(10/30)	4.19	4.26	0.07	1.56	101.56
E.9ComStd.A	4.07	4.41	0.34	8.38	108.38
E.9ComStd.B	4.05	4.42	0.37	9.19	109.19
E.9ComStd.C	4.03	4.42	0.39	9.73	109.73
E.9Com.WA	7.09	7.50	0.41	5.77	105.77
E.9Com.WB	7.23	7.51	0.28	3.86	103.86
E.9Com.WC	6.95	7.39	0.44	6.38	106.38
E.9Com.DA	2.92	3.20	0.28	9.70	109.70
E.9Com.DB	2.95	3.26	0.30	10.27	110.27
E.9Com.DC	3.04	3.30	0.26	8.59	108.59

Tabla C-4.8: Medidas de exactitud para PLSRab.1SG

Muestra	KF	PLSRab.1SG	Error Absoluto EA = $ \hat{y} - y $	Error Relativo ER=(AE/y) x 100	Range=(X/y)*100 80-120%
E.8L955(Std.1)A(20mg)	4.49	4.33	-0.16	-3.62	96.38
E.8L955(Std.2)A(20mg)	4.48	4.33	-0.14	-3.22	96.78
E.8L955(Std.3)A(20mg)	4.45	4.34	-0.12	-2.63	97.37
E.8L955(H1)A(20mg)	3.80	3.70	-0.10	-2.61	97.39
E.8L955(W1)A(20mg)	8.69	8.59	-0.10	-1.18	98.82
E.8L017(Std.1)A(2mg)	4.68	4.22	-0.45	-9.69	90.31
E.8L266(Std.1)A(5mg)	4.53	4.23	-0.31	-6.73	93.27
E.8L251(Std.1)A(15mg)	3.97	4.24	0.27	6.81	106.81
E.8L006(Std.1)A(10/30)	4.19	4.27	0.08	1.80	101.80
E.9ComStd.A	4.07	4.33	0.27	6.52	106.52
E.9ComStd.B	4.05	4.34	0.30	7.29	107.29
E.9ComStd.C	4.03	4.34	0.31	7.66	107.66
E.9Com.WA	7.09	7.32	0.23	3.29	103.29
E.9Com.WB	7.23	7.30	0.07	0.95	100.95
E.9Com.WC	6.95	7.11	0.16	2.37	102.37
E.9Com.DA	2.92	2.97	0.05	1.83	101.83
E.9Com.DB	2.95	2.99	0.04	1.30	101.30
E.9Com.DC	3.04	3.08	0.04	1.42	101.42

Tabla C-4.9: Valores de evaluación quimiométricos para cada uno de los métodos obtenidos de los valores predichos para las muestras de validación.

	MLRAb.20mg	PLSRAb.20mgB	MLRAb.3	PLSRAb.2	PLSRAb.1	PLSRAb.1SNV	PLSRAb.SNV1	PLSRAb.1SG
Regiones		760-772 1408-1466 1910-1954		948-990 1324-1448 1850-1950	948-990 1324-1448 1850-1950	948-990 1324-1448 1850-1950	948-990 1324-1448 1850-1950	948-990 1324-1448 1850-1950
Longitud de onda	1876.5		1883.5					
Pre-tratamientos	2da Derivada	2da Derivada	2da Derivada	2da Derivada	1ra Derivada	1ra Derivada SNV	SNV 1ra Derivada	1ra Derivada SG
Factores		4		5	4	5	3	5
SEC	0.11	0.09	0.12	0.09	0.09	0.09	0.10	0.09
SECV		0.10		0.10	0.10	0.10	0.11	0.09
R Squared	0.9841	0.9925	0.9873	0.9931	0.9936	0.9938	0.9910	0.9941
F-Value	1946.1	965.1	2102.2	807.9	1133.9	892.9	1096.0	764.6
PRESS		0.3289		0.3184	0.3229	0.3622	0.4056	0.2801
%RSEC (20mg)	2.1	1.5	3.4	1.7	1.7	1.6	1.9	1.8

Validacion con muestras externas

Bias = prom(E) 20mg	0.11	0.02	0.29	0.06	0.11	0.03	0.20	0.06
Bias = prom(E) Todas	0.03	0.01	0.20	0.02	0.06	0.00	0.13	0.02
PRESS (20mg)	3.38	2.43	6.49	0.38	0.49	0.84	1.18	0.43
PRESS (Todas)	3.74	2.51	6.62	0.83	0.97	1.15	1.49	0.80
Var. de Pred. (S^2)20mg	0.25	0.19	0.41	0.02	0.03	0.06	0.05	0.03
Var. de Pred. (S^2)Todas	0.21	0.15	0.34	0.05	0.05	0.07	0.07	0.05
SEP = (S^2)^1/2 20mg	0.50	0.43	0.64	0.16	0.16	0.25	0.22	0.17
SEP = (S^2)^1/2 Todas	0.46	0.38	0.58	0.22	0.23	0.26	0.26	0.21
MSEP=PRESS/n 20mg	0.24	0.17	0.46	0.03	0.04	0.06	0.08	0.03
MSEP=PRESS/n Todas	0.21	0.14	0.37	0.05	0.05	0.06	0.08	0.04
RMSEP=(MSEP)^1/2 20mg	0.49	0.42	0.68	0.16	0.19	0.24	0.29	0.17
RMSEP=(MSEP)^1/2 Todas	0.46	0.37	0.61	0.22	0.23	0.25	0.29	0.21
%RSEP (20mg)	10.1	9.0	13.8	3.6	4.1	3.8	6.3	3.8
%RSEP (Todas)	9.1	7.5	12.1	4.3	4.6	5.0	5.7	4.2

Tabla C-5.1: Medidas de precisión para el método KF

KF							
Muestra (20mg) pot.	1 ^{ra} Lectura	2 ^{da} Lectura	3 ^{ra} Lectura	Promedio	Stdev	%RSD	Pooled Stdev (Sp)
E.8L955(Std.1)A(20mg)	4.493	4.477	4.454	4.47	0.02	0.4	0.08
E.9ComStd.A	4.068	4.048	4.032	4.05	0.02	0.4	
E.9Com.WA	7.086	7.228	6.947	7.10	0.10	2.0	
E.9Com.DA	2.921	2.954	3.041	2.97	0.06	2.1	

Tabla C-5.2: Medidas de precisión para el método MLRAb.20mg

MLRAb.20mg							
Muestra (20mg) pot.	1 ^{ra} Lectura	2 ^{da} Lectura	3 ^{ra} Lectura	Promedio	Stdev	%RSD	Pooled Stdev (Sp)
E.8L955(Std.1)A(20mg)	3.875	4.034	4.088	4.0	0.1	2.8	0.09
E.9ComStd.A	4.436	4.458	4.491	4.46	0.03	0.6	
E.9Com.WA	7.886	7.879	7.700	7.8	0.1	1.3	
E.9Com.DA	2.991	3.182	3.177	3.1	0.1	3.5	

Tabla C-5.3: Medidas de precisión para el método PLSRAb.20mgB

PLSRAb.20mgB							
Muestra (20mg) pot.	1 ^{ra} Lectura	2 ^{da} Lectura	3 ^{ra} Lectura	Promedio	Stdev	%RSD	Pooled Stdev (Sp)
E.8L955(Std.1)A(20mg)	4.455	4.350	4.432	4.41	0.05	1.2	0.2
E.9ComStd.A	4.437	4.400	4.368	4.40	0.03	0.8	
E.9Com.WA	7.562	7.607	7.359	7.5	0.1	1.8	
E.9Com.DA	1.966	2.378	2.675	2.3	0.4	15.2	

Tabla C-5.4: Medidas de precisión para el método MLRAb.3

MLRAb.3							
Muestra (20mg) pot.	1 ^{ra} Lectura	2 ^{da} Lectura	3 ^{ra} Lectura	Promedio	Stdev	%RSD	Pooled Stdev (Sp)
E.8L955(Std.1)A(20mg)	4.072	4.200	4.228	4.17	0.08	2.0	0.1
E.9ComStd.A	4.517	4.536	4.607	4.55	0.05	1.0	
E.9Com.WA	8.297	8.245	8.105	8.2	0.1	1.2	
E.9Com.DA	3.131	3.456	3.504	3.4	0.2	6.0	

Tabla C-5.5: Medidas de precisión para el método PLSRAb.2

PLSRAb.2							
Muestra (20mg) pot.	1 ^{ra} Lectura	2 ^{da} Lectura	3 ^{ra} Lectura	Promedio	Stdev	%RSD	Pooled Stdev (Sp)
E.8L955(Std.1)A(20mg)	4.346	4.340	4.345	4.344	0.003	0.08	0.06
E.9ComStd.A	4.297	4.295	4.294	4.295	0.002	0.04	
E.9Com.WA	7.353	7.337	7.160	7.3	0.1	1.47	
E.9Com.DA	2.975	2.986	3.075	3.01	0.05	1.82	

Tabla C-5.6: Medidas de precisión para el método PLSRAb.1

PLSRAb.1							
Muestra (20mg) pot.	1 ^{ra} Lectura	2 ^{da} Lectura	3 ^{ra} Lectura	Promedio	Stdev	%RSD	Pooled Stdev (Sp)
E.8L955(Std.1)A(20mg)	4.373	4.395	4.401	4.39	0.02	0.3	0.05
E.9ComStd.A	4.301	4.313	4.305	4.306	0.006	0.1	
E.9Com.WA	7.406	7.409	7.296	7.37	0.06	0.9	
E.9Com.DA	2.953	2.968	3.078	3.00	0.07	2.3	

Tabla C-5.7: Medidas de precisión para el método PLSRAb.1SNV

PLSRAb.1SNV							
Muestra (20mg) pot.	1 ^{ra} Lectura	2 ^{da} Lectura	3 ^{ra} Lectura	Promedio	Stdev	%RSD	Pooled Stdev (Sp)
E.8L955(Std.1)A(20mg)	4.246	4.292	4.300	4.28	0.03	0.7	0.07
E.9ComStd.A	4.268	4.301	4.324	4.30	0.03	0.7	
E.9Com.WA	7.264	7.296	7.180	7.25	0.06	0.8	
E.9Com.DA	2.831	2.977	3.050	3.0	0.1	3.8	

Tabla C-5.8: Medidas de precisión para el método PLSRAb.SNV1

PLSRAb.SNV1							
Muestra (20mg) pot.	1 ^{ra} Lectura	2 ^{da} Lectura	3 ^{ra} Lectura	Promedio	Stdev	%RSD	Pooled Stdev (Sp)
E.8L955(Std.1)A(20mg)	4.299	4.352	4.361	4.34	0.03	0.8	0.04
E.9ComStd.A	4.409	4.420	4.424	4.418	0.008	0.2	
E.9Com.WA	7.496	7.507	7.390	7.46	0.06	0.9	
E.9Com.DA	3.204	3.257	3.302	3.25	0.05	1.5	

Tabla C-5.9: Medidas de precisión para el método PLSRAb.1SG

PLSRAb.1SG							
Muestra (20mg) pot.	1 ^{ra} Lectura	2 ^{da} Lectura	3 ^{ra} Lectura	Promedio	Stdev	%RSD	Pooled Stdev (Sp)
E.8L955(Std.1)A(20mg)	4.331	4.333	4.337	4.334	0.003	0.1	0.06
E.9ComStd.A	4.333	4.344	4.341	4.339	0.006	0.1	
E.9Com.WA	7.319	7.297	7.111	7.2	0.1	1.6	
E.9Com.DA	2.974	2.992	3.084	3.02	0.06	1.9	

Tabla C-5.10: Reporte de valores del % de humedad para las muestras de 20mg

Muestra (20mg) pot.	KF	MLRAb.20mg	PLSRAb.20mgB	MLRAb.3	PLSRAb.2
E.8L955(Std.1)A(20mg)	4.49(±0.02)	3.9(±0.1)	4.46(±0.06)	4.07(±0.08)	4.346(±0.003)
E.8L955(Std.2)A(20mg)	4.48(±0.02)	4.0(±0.1)	4.35(±0.06)	4.20(±0.08)	4.340(±0.003)
E.8L955(Std.3)A(20mg)	4.45(±0.02)	4.1(±0.1)	4.43(±0.06)	4.23(±0.08)	4.345(±0.003)
E.9ComStd.A	4.07(±0.02)	4.44(±0.03)	4.44(±0.03)	4.52(±0.05)	4.297(±0.002)
E.9ComStd.B	4.05(±0.02)	4.46(±0.03)	4.40(±0.03)	4.54(±0.05)	4.295(±0.002)
E.9ComStd.C	4.03(±0.02)	4.49(±0.03)	4.37(±0.03)	4.61(±0.05)	4.294(±0.002)
E.9Com.WA	7.1(±0.1)	7.9(±0.1)	7.6(±0.1)	8.3(±0.1)	7.4(±0.1)
E.9Com.WB	7.2(±0.1)	7.9(±0.1)	7.6(±0.1)	8.2(±0.1)	7.3(±0.1)
E.9Com.WC	7.0(±0.1)	7.7(±0.1)	7.4(±0.1)	8.1(±0.1)	7.2(±0.1)
E.9Com.DA	2.92(±0.06)	3.0(±0.1)	2.0(±0.4)	3.1(±0.2)	2.98(±0.06)
E.9Com.DB	2.95(±0.06)	3.2(±0.1)	2.4(±0.4)	3.5(±0.2)	2.99(±0.06)
E.9Com.DC	3.04(±0.06)	3.2(±0.1)	2.7(±0.4)	3.5(±0.2)	3.08(±0.06)

Muestra (20mg) pot.	PLSRAb.1	PLSRAb.1SNV	PLSRAb.SNV1	PLSRAb.1SG
E.8L955(Std.1)A(20mg)	4.37(±0.02)	4.25(±0.03)	4.30(±0.03)	4.331(±0.003)
E.8L955(Std.2)A(20mg)	4.40(±0.02)	4.30(±0.03)	4.35(±0.03)	4.333(±0.003)
E.8L955(Std.3)A(20mg)	4.40(±0.02)	4.30(±0.03)	4.36(±0.03)	4.337(±0.003)
E.9ComStd.A	4.301(±0.006)	4.27(±0.03)	4.409(±0.008)	4.333(±0.006)
E.9ComStd.B	4.313(±0.006)	4.30(±0.03)	4.420(±0.008)	4.344(±0.006)
E.9ComStd.C	4.305(±0.006)	4.32(±0.03)	4.424(±0.008)	4.341(±0.006)
E.9Com.WA	7.41(±0.07)	7.26(±0.06)	7.50(±0.07)	7.3(±0.1)
E.9Com.WB	7.41(±0.07)	7.30(±0.06)	7.51(±0.07)	7.3(±0.1)
E.9Com.WC	7.30(±0.07)	7.18(±0.06)	7.39(±0.07)	7.1(±0.1)
E.9Com.DA	2.95(±0.07)	2.8(±0.1)	3.20(±0.05)	2.97(±0.06)
E.9Com.DB	2.97(±0.07)	2.9(±0.1)	3.26(±0.05)	2.99(±0.06)
E.9Com.DC	3.08(±0.07)	3.0(±0.1)	3.30(±0.05)	3.08(±0.06)

Tabla C-5.11: Reporte de valores promedio del % de humedad para las muestras de 20mg

Muestra (20mg) pot.	KF	MLRAb.20mg	PLSRAb.20mgB	MLRAb.3	PLSRAb.2
E.8L955(Std.1)A(20mg)	4.47(± 0.02)	4.0(± 0.1)	4.41(± 0.05)	4.17(± 0.08)	4.344(± 0.003)
E.9ComStd.A	4.05(± 0.02)	4.46(± 0.03)	4.40(± 0.03)	4.55(± 0.05)	4.295(± 0.002)
E.9Com.WA	7.1(± 0.1)	7.8(± 0.1)	7.5(± 0.1)	8.2(± 0.1)	7.3(± 0.1)
E.9Com.DA	3.0(± 0.1)	3.1(± 0.1)	2.3(± 0.4)	3.4(± 0.2)	3.0(± 0.1)

Muestra (20mg) pot.	PLSRAb.1	PLSRAb.1SNV	PLSRAb.SNV1	PLSRAb.1SG
E.8L955(Std.1)A(20mg)	4.39(± 0.02)	4.28(± 0.03)	4.34(± 0.03)	4.334(± 0.003)
E.9ComStd.A	4.31(± 0.01)	4.30(± 0.03)	4.418(± 0.008)	4.339(± 0.006)
E.9Com.WA	7.37(± 0.06)	7.25(± 0.06)	7.46(± 0.06)	7.2(± 0.1)
E.9Com.DA	3.0(± 0.1)	3.0(± 0.1)	3.25(± 0.05)	3.02(± 0.06)

Tabla C-6: Medida de la precisión instrumental

Muestra	MLRAb.20mg	PLSRAb.20mgB	MLRAb.3	PLSRAb.2	PLSRAb.1	PLSRAb.1SNV	PLSRAb.SNV1	PLSRAb.1SG
E.9ComStd.A1	4.49	4.37	4.63	4.27	4.25	4.28	4.39	4.31
E.9ComStd.A2	4.59	4.55	4.65	4.29	4.26	4.25	4.40	4.33
E.9ComStd.A3	4.63	4.65	4.66	4.30	4.27	4.24	4.41	4.34
E.9ComStd.A4	4.64	4.66	4.67	4.30	4.27	4.24	4.42	4.34
E.9ComStd.A5	4.68	4.66	4.67	4.30	4.27	4.23	4.42	4.34
E.9ComStd.A6	4.68	4.71	4.68	4.31	4.27	4.23	4.42	4.34
E.9ComStd.A7	4.67	4.71	4.68	4.31	4.27	4.23	4.42	4.34
E.9ComStd.A8	4.69	4.75	4.69	4.31	4.27	4.23	4.42	4.35
E.9ComStd.A9	4.69	4.74	4.68	4.31	4.27	4.23	4.42	4.34
E.9ComStd.A10	4.71	4.76	4.69	4.32	4.28	4.23	4.43	4.35
E.9ComStd.A10*	3.98	4.59	4.19	4.33	4.25	4.10	4.30	4.34
Average	4.6	4.6	4.6	4.31	4.27	4.23	4.41	4.34
St.Dev	0.2	0.1	0.1	0.02	0.01	0.04	0.04	0.01
RSD	4.58	2.44	3.16	0.37	0.23	1.05	0.86	0.23

* muestra sin compactar