

**UNIVERSIDAD METROPOLITANA
ESCUELA GRADUADA DE ASUNTOS AMBIENTALES
SAN JUAN, PUERTO RICO**

**ESTUDIO DE VIABILIDAD EN LA DETERMINACIÓN DE HUMEDAD EN
LIOFILIZADOS PENICILÍNICOS POR ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO
CERCANO (NIR)**

Requisito parcial para la obtención del
Grado de Maestría en Ciencias en Gerencia Ambiental
en Evaluación y Manejo de Riesgo Ambiental

Por
José A. López Fretts

4 de mayo de 2012

DEDICATORIA

*A mi madre, por su esfuerzo incondicional
y enseñarme a que no hay límites inalcanzables.
Lo difícil no es imposible.*

AGRADECIMIENTOS

De esta manera deseo agradecer a todas las personas que contribuyeron significativamente al desarrollo de éste trabajo. Gracias a la gerencia de Pfizer (Wyeth) Carolina por darme la oportunidad y permitir realizar éste trabajo en las facilidades del laboratorio del departamento de Control de Calidad. También deseo agradecer al personal de FOSS NIRSystems por brindarme toda su ayuda técnica y entendimiento a nivel instrumental. A mi comité de tesis, la Dra. Beatriz Zayas, Dr. Osvaldo Cox, Harry Peña, Dr. Juan C. Musa y al Ing. Fernando Cruz (Pfizer Carolina) les agradezco por su valioso tiempo, apoyo y consejos brindados. Y por último pero no menos importante a mi familia, a mi esposa Jannette por creer en mí, ayudarme y apoyarme incondicionalmente para finalizar este trabajo de tesis.

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE TABLAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE APÉNDICES	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN.....	1
Trasfondo del problema	1
Problema de estudio.....	2
Justificación del estudio	3
Hipótesis	4
Meta	5
Objetivos	5
CAPÍTULO II: REVISIÓN DE LITERATURA.....	7
Trasfondo histórico	7
Marco teórico	9
Estudios de casos	11
Marco legal.....	11
CAPÍTULO III: METODOLOGÍA.....	13
Área de estudio	13
Objetivos	14
Descripción de la muestra	14
Periodo del estudio	14
Diseño metodológico	14
Análisis de datos	19
CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	25
LITERATURA CITADA	27

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Muestras para el desarrollo del modelo de calibración.....	33
Tabla 2. Hoja de datos para la determinación del contenido de humedad para el grupo de calibración	34
Tabla 3. Parámetros utilizados en la elaboración de la ecuación de calibración.	35
Tabla 4. Resultados obtenidos de humedad con las muestras de validación en ambos métodos y diferencia pareada (cálculos para Prueba T pareada)	37
Tabla 5. Resultados obtenidos para los cálculos de Prueba T pareada.	38
Tabla 6. Actividades para el análisis de peligrosidades de tarea (JHA).....	39

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Espectro de NIR para muestras de calibración.	41
Figura 2. Contenido de humedad para las muestras de calibración.	42
Figura 3. Segunda derivada del espectro de infrarrojo cercano del grupo de calibración.	43
Figura 4. Ampliación de la segunda derivada del espectro de infrarrojo cercano del grupo de calibración en la región de interés.	44
Figura 6. Algoritmos generados por la aplicación del NIR (Vision), correlación entre métodos para las muestras de calibración.	45
Figura 7. Algoritmos generados por la aplicación del NIR (Vision® Software).	46
Figura 8. Algoritmos generados por la aplicación del NIR (Vision®).	47
Figura 9. Diagrama básico de proceso.	48
Figura 10. Diagrama de las bandas de absorción del Infrarrojo cercano.	49
Figura 11. Cambios en el espectro de reflectancia durante a través del tiempo de secado.	50
Figura 12. Ejemplo de la reflectancia difusa.	51
Figura 14. Diagrama de fases de Clausius-Clapeyron.	52
Figura 15. Gráfica de boxplot de variabilidad.	53

LISTA DE APÉNDICES

Apéndice 1. Análisis de trabajo, riesgos y procedimientos de emergencia	55
Apéndice 2 Hoja de aprobación del protocolo de IBC.....	56
Apéndice 3. Carta de autorización para tesis aplicada al trabajo.....	58
Apéndice 4. Vista lateral al interior del compartimiento de la muestra del NIR con vial y el iris abierto.....	59
Apéndice 5. Hoja de datos de seguridad del material para la solución A	60
Apéndice 6. Hoja de datos de seguridad del material para la solución B.....	62

RESUMEN

Con el propósito de determinar la viabilidad de la utilización de la espectroscopia de infrarrojo cercano (NIR por sus siglas en inglés) para la determinación de humedad en liofilizados penicilínicos como método alternativo, realizamos un estudio donde evaluamos los datos de la humedad obtenida por ambos métodos analíticos, el método primario que es por titulación coulombimétrica y el propuesto, el cual es por NIR. Creamos un grupo de calibración (para el NIR) con el cual generamos una curva de calibración a base de la humedad añadida en cada grupo y para la cual obtuvimos el espectro de NIR a cada una. Dado que el NIR es un método no destructivo y no requiere abrir la muestra para su análisis, el mismo grupo fue utilizado posteriormente para el análisis por titulación coulombimétrica Karl Fischer. Como parte de la evaluación para comparar la equivalencia entre ambos métodos procedimos a determinar la humedad a muestras de manera independiente, primero por NIR realizando análisis de rutina y posteriormente por titulación coulombimétrica. Ambos resultados fueron evaluados estadísticamente utilizando la prueba T pareada para determinar si hay o no diferencia entre los métodos basados en las asunciones de la prueba. Los resultados demostraron que no hay diferencia entre el método primario y el propuesto por lo tanto, es viable el uso del NIR como método alternativo en la determinación de humedad en productos liofilizados penicilínicos reduciendo por completo la generación de desperdicios peligrosos que contienen piridina, minimizando los riesgos y costos asociados al método primario.

ABSTRACT

This study was performed to determine the viability of using the Near Infrared technique for the moisture content determination in freeze dry penicillin product as an alternative method. The moisture content data were evaluated from both, primary (coulometric titration) and propose alternative method (NIR). A calibration set was created (for NIR) in order to generated a calibration curve based on the moisture added for each group and the NIR spectrum was obtained for each sample for the calibration set. Then, the same calibration set was analyzed by coulometric titration; NIR is a non destructive method thus sample do not required to open for its analysis. Once calibration set had been created and tested into the NIR system, the moisture contents for samples were determinate in routing analysis. The same samples were analyzed by coulometric titration in order to compare and determinate the viability for the propose method. Both results were evaluated statistically using Paired T-test to determine if there is or not difference between methods based in the assumptions test. The results demonstrate that there is no difference in the primary and propose method therefore, it is viable using the NIR as an alternative method for the moisture content determination in penicillin freeze dry product reducing the hazardous waste generation which contain pyridine, minimizing therefore the risk and cost associated due to primary method.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Trasfondo del problema

Para el 1977, según la Ley para el Control de Sustancias Tóxicas (TSCA, por sus siglas en inglés), se sometió una lista de sustancias prioritarias a ser evaluadas por el comité de control de sustancias tóxicas. Piridina fue incluida en dicha lista en abril de 1978 debido a la poca información científica recolectada al momento y a la gran cantidad de producción el cual superó los 60 millones de libras en dicho año (USEPA, 1978).

Aproximadamente, de los 26 millones de libras de piridina producidas anualmente en los Estados Unidos, prácticamente la mitad es exportada. Cerca del 80% de la piridina es usada sola o mezclada con otros químicos como ingrediente (por ejemplo químicos usados para la agricultura tales como insecticidas, herbicidas y en la farmacéutica). El restante 20% es usado como reactivo en la manufactura o como componente en reactivos de Karl Fischer en laboratorios (USEPA, 1982).

Según los reportes oficiales de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA, por sus siglas en inglés) en el Inventario de Escapes Tóxicos (TRI, por sus siglas en inglés) para Puerto Rico, la generación total relacionada al manejo de desperdicios de piridina reflejó un incremento desde el 1991 hasta el 2001. Por ejemplo, para el 1991 según los reportes del TRI, mostraron que el manejo de desperdicios relacionado a la generación total de piridina fue de 169,350 libras, siendo el año 1999 el máximo valor alcanzado de 863,550 libras (USEPA, 2004).

Cabe destacar que a pesar de ser pocos los estudios realizados sobre los efectos de la piridina en el ser humano, si se ha demostrado que la misma tiene efectos en las funciones de

expresión a diferentes niveles en el citocromo (Kim et al., 2000), además pueden unirse con otros compuestos y formar derivados antiespermatogénicos lo cual induciría a la infertilidad específicamente en el hombre, mientras que en el ambiente piridina y sus derivados pueden acomplejarse con metales en solución acuosa (Sims, & O'Loughlin, 1989).

Problema de estudio

La liofilización es un proceso en el que se extrae el solvente (comúnmente agua) de un producto. La liofilización es llevada a cabo por un principio de física llamado sublimación (Figura 12); que es la transición de la sustancia del estado sólido al gaseoso. Esto ayuda a preservar el producto por un periodo mayor y a temperatura ambiente. Una vez liofilizado, el producto tendrá un contenido mínimo de humedad, el cual se le llamará humedad residual (Imtiaz Haider & Ashok, 2009).

El contenido de humedad residual en medicamentos liofilizados es una condición que afecta los atributos de potencia, pureza y calidad, determinando a su vez la estabilidad del producto (USP 34-NF 29). Son varios los métodos y técnicas que pueden ser utilizados para realizar la prueba del contenido de humedad (Zhou, Hines & Borer, 1998). No obstante, la implementación, el grado de dificultad, la viabilidad del método para el producto deseado así como el costo, entre otros, puede ser limitante al momento de seleccionar el método. En la actualidad el método primario para determinar la humedad en productos penicilínicos es la titulación coulombimétrica Karl Fischer método 921 (USP 34-NF 29), en la cual por naturaleza del producto se utiliza compuestos a base de piridina y metanol (Photovolt, 2006^a, 2006b, 2006c & 2006d). Los desperdicios que contienen piridina son catalogados como peligrosos por la EPA y listados en el Código de Registro Federal (CFR por sus siglas en inglés) como desperdicio

peligroso (40 CFR § 261). Por lo tanto, la viabilidad de un proceso que no requiera el uso de sustancias con base de piridina en la determinación de humedad en productos liofilizados penicilínicos es necesaria para eliminar el riesgo relacionado con la generación, manejo y disposición de las mismas como desperdicio peligroso.

Justificación del estudio

Según dispone la Ley de Recuperación y Conservación del Recurso del 1976, mejor conocida como *Resource Conservation and Recovery Act* (RCRA, por sus siglas en inglés), se debe minimizar la generación del desperdicio peligroso así como su disposición fomentando la sustitución del proceso, recuperación del material, reciclaje, re-uso y tratamiento por el cual se genera (42 USC § 6902(a)(6)).

Para el 1987, en la Comisión del Medio Ambiente y Desarrollo de Naciones Unidas fue presentado un informe socio-económico “Nuestro Futuro Común”, mejor conocido como “El Informe Brundtland” (Jimenez & Constable, 2011), en el cual fue definido el concepto de “Desarrollo Sostenible: satisfacer las necesidades del presente sin comprometer la capacidad de las generaciones futuras para desarrollarse”. En dicho informe se analizó la situación mundial en ese momento para demostrar que la sociedad a nivel mundial estaba destruyendo el ambiente, por lo que se demuestra que es uno de los primeros intentos de disolver la confrontación entre el desarrollo y la sostenibilidad. Básicamente el propósito del informe fue hallar medios o vías prácticas para contrarrestar los problemas ambientales y de desarrollo. Luego de haber sido aprobada la Ley de Prevención de la Contaminación de 1990 (42 U.S.C. §13101, 1990), la Oficina de Prevención de la Contaminación y Sustancias Tóxicas de la EPA (OPPT, por sus siglas en inglés) comenzó con la exploración del desarrollo de productos y procesos químicos

nuevos o mejorar los existentes para poder lograr la disminución del peligro a la salud del ser humano y al medio ambiente. En 1991, la OPPT comenzó el programa piloto de asistencia a la investigación "Rutas Sintéticas Alternativas para la Prevención de la Contaminación". De esta manera surge el concepto de lo que hoy en día se denomina *Green Chemistry* (Química Verde) con el objetivo de promover tecnologías y procesos químicos innovadoras que logren reducir el uso o generación de sustancias químicas peligrosas a través del diseño, fabricación y uso de los productos químicos.

Como parte de la Política Pública del Estado Libre Asociado de Puerto Rico se ha de establecer el desarrollo e implementación de estrategias viables y ambientalmente seguras que promuevan la reducción de los desperdicios peligrosos. Ésta es llamada la “Ley para el Fomento de la Reducción de los Desperdicios Peligrosos” (12 L.P.R.A. §1321).

El manejo y disposición de los desperdicios peligrosos puede llegar a crear una situación de riesgo tanto a la salud, y seguridad como al medioambiente de Puerto Rico por lo cual se requiere que se minimicen en el mayor grado posible la generación de desperdicios peligrosos. Siguiendo las reglamentaciones ambientales, cada generador de desperdicio peligroso debe comprometerse a disminuir el riesgo y buscar soluciones alternas para eliminarlo. Por esto, una alternativa es el uso de la espectroscopia de infrarrojo cercano (NIR por sus siglas en inglés) que es una técnica no destructiva y la cual provee información cualitativa y cuantitativa en un amplio rango de matrices incluyendo liofilizados (Reich, 2005).

El éxito del proceso propuesto proveerá un ambiente de trabajo libre de la generación, manejo y disposición de compuestos y desperdicios peligrosos relacionados a la determinación de humedad en liofilizados penicilínicos, lo cual promueve el programa de minimización de desperdicios de la Agencia de Protección Ambiental y reglamentos relacionados. Además,

promueve la competitividad del proceso debido a que se minimizan los costos asociados al manejo y disposición de los desperdicios generados, el tiempo de análisis disminuye debido a que no hay preparación o tratamiento de la muestra en comparación al método actual, además el equipo de infrarrojo cercano requiere menor mantenimiento que los equipos de titulación coulombimétrica.

Hipótesis

No hay diferencia significativa entre la determinación de humedad por el método de espectrometría de infrarrojo cercano (NIR) versus la determinación de humedad por el método coulombimétrico de Karl Fischer en productos penicilínicos liofilizados como método analítico alternativo.

Meta

La meta de éste estudio de viabilidad es desarrollar un proceso para la determinación del contenido de humedad en productos penicilínicos con la técnica de espectroscopia de infrarrojo cercano como método alternativo, esto eliminaría la generación de desperdicios peligrosos que contienen piridina por el método actual de titulación coulombimétrica Karl Fischer.

Objetivos

Para alcanzar ésta meta se han identificado los siguientes objetivos:

1. Comparar la equivalencia entre los métodos por NIR y el método de titulación coulombimétrica utilizado actualmente.

2. Determinar cuál de los métodos (NIR vs. titulación coulombimétrica) presenta un menor riesgo en el manejo de los desperdicios con piridina.

CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

Trasfondo histórico

En 1851, Thomas Anderson, químico orgánico nacido en Edimburgo, descubrió la piridina (impura). La misma fue extraída de aceite de hueso de material animal (Anderson, 1857), no obstante fue sintetizada (pura) para comienzos del siglo veinte, especialmente cuando el químico ruso Aleksei Chichibabin logró obtenerla con reactivos relativamente sencillos y de bajo costo llamándose “Síntesis de Chichibabin” (Frank & Riener, 1950). Actualmente ésta síntesis sigue siendo utilizada para su producción a nivel industrial. Para el 1935, Karl Fischer, químico alemán, necesitaba un método para determinar la humedad en dióxido de azufre. Mezcló reactivos que contenían piridina, yodo y dióxido de azufre de acuerdo a la ecuación de Bunsen pero sin el exceso de agua produciendo la siguiente reacción: $2\text{H}_2\text{O} + \text{SO}_2 + 2 \text{ Piridina} + \text{I}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{SO}_4 + 2\text{HI} \cdot \text{Piridina}$ (Fluka & Riedel-de Haën, 2000). Ya para el 1938, la técnica de la coulombimetría había sido desarrollada por Szebelledy y Somogy, la cual difiere de la titulación directa en que el titulante es generado *in situ* por electrólisis (Hoyt, 1969) y luego reacciona estequiométricamente con la sustancia a ser titulada o determinada (De Agostini, 2002).

Anders Cedergren en el año 1974 descubrió que piridina más que tomar parte directamente en la reacción más bien trabajaba como una especie de amortiguador (Cedergren, 1974). No fue hasta principios de los años 1980 que Eugen Scholz de Riedel-de Haën en Alemania comenzó a llevar a cabo investigaciones con los reactivos de Karl Fischer, con el objetivo de desarrollar una reacción sin piridina ya que su presencia producía un olor desagradable (Fluka & Riedel-de Haën, 2000). Como resultado se obtuvieron reactivos que no contenían piridina, sin embargo, aún quedaba un gran grupo de muestras las cuales durante la

titulación generaban una reacción secundaria no deseada con los nuevos reactivos de titulación (tanto titulación directa como coulombimétrica). Además, encontraron que los ácidos y bases presentes cambiaban el pH, el cual es un factor primordial que controla las reacciones secundarias (Hoebus, Roets & Hoogmartens, 1996).

Actualmente son muchos los reactivos de Karl Fischer para la titulación de humedad. No obstante para las muestras cuyo pH han de ser básicos como los compuestos penicilínicos liofilizados, éstos siguen siendo un reto para determinar la humedad debido a que la formación del ácido peniciloico interfiere en la reacción (Hoebus, Roets & Hoogmartens, 1996) y no se puede tener seguridad de su presencia o formación una vez la penicilina este en solución (Lindquist, 1984) y utilizando controles de optimización electrónica.

Como se menciona previamente de manera resumida, en el transcurso evolutivo de la determinación de humedad por titulación son muchos los factores y variables que pueden afectar el control de calidad del proceso para demostrar un resultado confiable. De esta manera, las industrias comienzan a mirar otros procesos y tecnologías que pueden ayudar a realizar de manera cuantitativamente confiable y precisa la determinación de humedad; más aún en que el uso de compuestos a base de piridina convierte los desperdicios en peligrosos siendo su manejo un riesgo a la salud y al ambiente (USEPA, 1986). La cromatografía de gas (Badoni & Jayaraman 1990), cromatografía líquida, pérdida por secado, calorimetría y análisis termogravimétrico (Roggo, Chalus, Maurer, Lema-Martínez, Edmond & Jent, 2007) son algunas de las técnicas utilizadas por las industrias en la determinación de humedad a una amplia gama de compuestos, productos que se encuentran en diferentes estados, entiéndase sólido, líquido o gaseoso y composiciones tales como suspensiones y cremas, pero es realmente la espectroscopia la técnica que marca el precedente de ser no solo no-invasiva, por lo que no requiere

necesariamente ser tratada la muestra, sino que puede ser utilizada para realizar análisis cualitativos y cuantitativos a prácticamente cualquier producto sin importar su matriz (Reich, 2005).

A pesar de que la primera región no visible del espectro de absorción en ser descubierta fue la del infrarrojo cercano en el siglo XIX (Blanco, Coello, Iturriaga, MasPOCH & Pezuela, 1998), no es hasta la década de los años 50 y 60 que comienza a tener utilidad. Durante las últimas dos décadas, las aplicaciones para el uso de la tecnología de la espectroscopía de infrarrojo cercano ha ido en aumento, en especial para la industria de alimentos, agroquímicos y farmacéutica (Osborne & Fearn, 1986).

Marco teórico

La reacción de Karl Fischer es utilizada en la determinación coulombimétrica (Método Ic de USP) de agua. Esta reacción consiste en una celda con un ánodo y un cátodo separado por un diafragma. En el cátodo se genera principalmente hidrógeno. Los iones de hidrógeno se reducen transformándose en hidrógeno. En dicha reacción yoduro es añadido en el ánodo como una solución volumétrica el cual se oxida transformándose en yodo que posteriormente reacciona con el agua presente. Luego que toda el agua haya reaccionado, el exceso de yodo de la titulación indicará el punto final (*end point*) de la reacción el cual es detectado eléctricamente. Un requisito de este método es que cada componente del analito sea compatible con otros componentes, para que no ocurran reacciones secundarias (Hoebus, Roets & Hoogmartens, 1996).

El analito liofilizado penicilínico es introducido al envase como una solución inyectada a través de un sello. Para la determinación de humedad de productos penicilínicos liofilizado en el laboratorio de la industria farmacéutica se emplea el *Aquatest 2010 Coulometry Titrator* en

conjunto con los reactivos del KF coulombimétrico; generador, neutralizador y soluciones A/B, estas últimas contienen piridina.

Los cambios en el nuevo método propuesto difieren del actual en cuanto a la técnica utilizada y la categoría del instrumento analítico. El equipo propuesto es un sistema de espectrometría de infrarrojo cercano (NIR por sus siglas en inglés). Los cambios son la sustitución del equipo actual, los reactivos envueltos y por ende el procedimiento es uno diferente.

Los equipos propuestos serán instalados de acuerdo a las especificaciones de diseño para asegurar su correcta operación. Los mismos habrán de ser cualificados de acuerdo a las especificaciones del manufacturero, necesidades del laboratorio, regulaciones, políticas y procedimientos establecidos por la industria farmacéutica.

El equipo propuesto - NIR XDS usa un diseño de monocromador empleando un *grating* dispersivo controlado digitalmente con un sistema sensible de detección. Este instrumento emplea el espectro de energía del infrarrojo cercano para iluminar la muestra. La región del infrarrojo cercano del espectro se extiende desde el final de la región visible que es alrededor de 770 nm hasta los 3000 nm ($12,000\text{ cm}^{-1}$ hasta $3,300\text{ cm}^{-1}$). Las bandas de absorción en esta región son sobretonos o combinaciones de bandas de las vibraciones fundamentales moleculares. Como se muestra en la

Figura 9, los enlaces envueltos son usualmente C-H, N-H y O-H, por lo que muchas especies químicas y bioquímicas exhiben bandas de absorción únicas en esta región espectral de infrarrojo (Skoog, Holler & Nieman, 1998). Por medida de la energía reflectada (*Figura 11*) de la muestra la información química y su composición pueden ser determinadas. Esta información es usada para la cuantificación y cualificación de los materiales. Para propósitos de éste estudio, el analito

será la humedad (agua) contenida en los productos liofilizados. El espectro de NIR para agua exhibe cinco máximos de absorción a 760, 970, 1190, 1450 y 1940 nm. (Blanco, Coello, Iturriaga, Maspocho & Pezuela, 1998), estas bandas son notables en los procesos de secado donde se monitorea a través del tiempo (Figura 10).

Estudios de casos

La EPA identificó 1,177 lugares en su listado de prioridades nacionales (NPL, por sus siglas en inglés), de los cuales Piridina había sido hallado en cuatro de ellos aún sin haber sido evaluados para piridina (ATSDR, 1992). Esta cantidad puede variar debido a que la EPA está evaluando constantemente lugares. En Puerto Rico, la producción total relacionada al manejo de desperdicios que contienen piridina alcanzó las 120,061 libras según reportada (TRI Explorer, 2011).

Marco legal

Ley Número 416 de 22 de septiembre de 2004, Ley sobre Política Pública Ambiental.

La Junta de Calidad Ambiental establece requisitos para promover el logro de “Implantar, en cualquier etapa de un proceso, técnicas que minimicen o eliminen la contaminación” y de “Establecer prácticas para la prevención de contaminación en su origen”. El gobierno y organizaciones civiles han trabajado en la publicación y orientación de métodos para controlar la contaminación en la fuente u origen a través de la integración y armonización de diversos programas, estudios, actividades y esfuerzos realizados por la industria.

Ley Núm. 10 del 19 de enero de 1995. Ley para el Fomento de la Reducción de los desperdicios peligrosos en Puerto Rico.

Artículo 2 - Política pública

“Se declara política pública del Estado Libre Asociado de Puerto Rico el desarrollo e implantación de estrategias económicamente viables y ambientalmente seguras que fomenten la reducción de desperdicios peligrosos. A ese fin, es necesario desarrollar un plan para estimular la reducción de las fuentes de desperdicios peligrosos y fomentar su manejo en el lugar donde son generados, reduciendo así la dependencia en las instalaciones existentes de tratamiento y manejo.”

La prevención y manejo de desperdicios peligrosos deberá de ser reducida en la producción de desperdicios peligrosos en su lugar de origen. (12 LPRA § 1321 et seq.)

Ley para el control de sustancias tóxicas, 15 U.S.C. §2601 et seq. (1976).

La Ley para el Control de Sustancias Tóxicas (conocida como TSCA por sus siglas en inglés) provee a la Agencia de Protección Ambiental con la autoridad para requerir, reportar, mantener, analizar y restringir el uso de sustancias o mezclas químicas. Piridina fue incluida en abril de 1978 por la poca información científica existente, y a la gran cantidad de producción en dicho año (USEPA, 1978). Hoy en día piridina sigue en el listado de TSCA (USEPA, 2004).

La Ley de Seguridad y Salud Ocupacional de 1970.

La Ley de Seguridad y Salud Ocupacional de 1970 crea la Administración de Seguridad & Salud Ocupacional, el Instituto Nacional para la Seguridad & Salud Ocupacional y la Comisión de Revisión de Seguridad & Salud Ocupacional (OSHA, NIOSH y OSHRC por sus siglas en ingles respectivamente). 29 CFR 1910.

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

Creamos una curva de calibración inyectando unas cantidades de agua que variaban entre entre 0 μL (control) y 68 μL (límite máximo) en cada uno de los viales en triplicados, estos se fueron utilizados como el grupo de calibración. Luego de dejarlos equilibrando por 48 horas los mismos fueron escaneados en el NIR para obtener los espectros para cada uno de ellos. Éste grupo de calibración fueron utilizados en el desarrollo de la ecuación de calibración en el NIR. Luego de creada y probada la ecuación de calibración procedimos a realizar las determinaciones de humedad en las muestras liofilizadas. Comparamos estadísticamente los resultados obtenidos de humedad por espectroscopía de infrarrojo cercano y por el método primario de titulación coulombimétrica Karl Fischer en las muestras liofilizadas para determinar si hay o no diferencia entre ambos métodos. Posteriormente determinamos el riesgo envuelto para ambos métodos basados en el análisis de peligrosidad de las tareas utilizando el software de *job hazard analitics* de Alliant®.

Área de estudio

Las pruebas fueron realizadas en los laboratorios de control de calidad de la compañía farmacéutica Pfizer de Carolina, en el edificio donde se manufactura los liofilizados penicilínicos. Los tituladores cuya marca es Aquatest y modelo 2010 están instalados dentro de los sistemas de ventilación con campanas de extracción de vapores (*Fume Hood*), mientras que el NIR se encuentra instalado en un tope (*bench*) del laboratorio analítico de control de calidad.

Objetivos

- 1. Comparar la equivalencia entre los métodos por NIR y el método de titulación coulombimétrica utilizado actualmente.**
- 2. Determinar cuál de los métodos (NIR vs. titulación coulombimétrica) presenta un menor riesgo en el manejo de los desperdicios con piridina.**

Descripción de la muestra

La muestra consistirá en viales sellados conteniendo el antibiótico estéril liofilizado (polvo) blanco. Las muestras serán provistas por el Departamento de Control de Calidad, las mismas serán representativas de un lote manufacturado para fines no comerciales. Las muestras serán seleccionadas por muestreo al azar (*random sampling*), proceso establecido por el departamento de servicios técnicos. Para propósitos del grupo de calibración para el NIR utilizamos seis grupos de muestras en triplicado para un total de 18 y para el grupo de análisis de rutina por NIR utilizamos cinco muestras, estas cinco muestras serán analizadas posteriormente por titulación coulombimétrica, estos resultados serán comparados posteriormente.

Período del estudio

La aprobación del protocolo para ejecución comprendió desde el 25 de agosto de 2009 al 23 de octubre de 2009.

Diseño metodológico

El Sistema Universitario Ana G. Méndez (SUAGM) ha establecido el Comité de Bioseguridad para asegurar el manejo adecuado de posibles agentes peligrosos. Como parte del proceso de comité de bioseguridad (IBC por sus siglas en inglés) de la oficina de cumplimiento las certificaciones de *Bioseguridad y Conducta Responsable en la Investigación* requeridas

fueron completadas. Todos los documentos requeridos por el Comité de Cumplimiento fueron sometidos para su revisión, y el mismo obtuvo la aprobación final.

NIR – Grupo de calibración

Preparamos un grupo de calibración utilizando viales de muestras liofilizadas las cuales dividiremos en seis grupos. Sin abrir el vial, le inyectaremos una cantidad específica de agua a cada uno de los grupos de muestras de manera que logremos un incremento en el contenido de humedad.

1. Colocamos el vial de manera horizontal con un poco de ángulo.
2. Inyectamos con una micro-jeringuilla una cantidad determinada de agua destilada a través del tapón de goma en el espacio o vacío del vial (*headspace*) a cada uno de los viales de acuerdo a la Tabla 1.
3. Rotulamos los viales de acuerdo a la cantidad de agua inyectada.
4. Guardamos las muestras por aproximadamente 48 horas, esto permitirá al agua añadida evaporarse y equilibrarse con la muestra dentro del vial. La posición horizontal debe de mantenerse para evitar que el agua añadida entre en contacto con la muestra liofilizada.
5. Creamos un proyecto en el infrarrojo cercano para el grupo de calibración siguiendo los pasos para las prueba de análisis cuantitativo provisto en el manual de referencias de FOSS NIRS.
6. Procedimos a escanear los viales con el infrarrojo cercano.
7. Analizamos las mismas muestras del paso 6 por titulación coulombimétrica, que habían sido escaneadas previamente en el infrarrojo cercano.

8. Documentamos en el campo del los constituyentes (en la aplicación del NIR) los resultados obtenidos de la titulación de cada uno de los viales.

Titulación coulombimétrica

Los siguientes pasos ejecutados corresponden al proceso actual tanto para la preparación de equipo, como de la muestra, así como para el análisis y determinación de humedad. En el Apéndice 1 se encuentra los pasos a seguir en caso de un accidente o derrame. Una vez culminado el análisis, se procedió a decantar y lavar los envases de titulación, tomando en consideración que los desperdicios generados contienen piridina por lo que son catalogados como desperdicio peligroso.

- 1) Encendimos el instrumento de titulación.
- 2) Vertimos completamente la solución A en la solución B una hora antes de realizar la prueba.
- 3) Tomamos 100 mL de la mezcla preparada en el paso 2 (mezcla AB) con una pipeta y se añadió en el envase de titulación.
- 4) Añadimos 5 mL de la solución generadora (ánodo).
- 5) Colocamos el cátodo, los sellos, el agitador y tubo con agente secante.
- 6) Procedimos a medir el potencial el cual debe de estar entre -2 y +2 para poder comenzar el análisis.
 - a. Si el potencial se encuentra muy negativo se procede a añadir la solución neutralizadora hasta llegar entre -2 y +2. Esto es indicativo que la solución en el envase contiene una cantidad alta de yodo libre (esto es común en soluciones a base de piridina).

- b. Si el potencial se encuentra más de +2, se procede a titular el exceso de humedad residual.
- 7) Inyectamos 1 μ L de agua. El instrumento comenzará automáticamente a titular la muestra. Una vez finalizado la titulación el instrumento imprime la respuesta la cual debe de estar en $1,000 \pm 100\mu\text{g}$ de agua.
 - 8) Luego, inyectamos 3 replicas de 1 mL de metanol.
 - 9) Calculamos la desviación estándar.
 - 10) Procedimos a pesar el vial sellado (peso inicial).
 - 11) Reconstituimos el vial con metanol y se esperó a que se disolviera la muestra liofilizada.
 - 12) Pesamos el vial con el metanol añadido (Peso inicial + Metanol).
 - 13) Sacamos 1mL del vial y se inyectó en el titulador.
 - 14) Procedimos a pesar el vial (peso reconstituida menos 1mL).
 - 15) Repetimos los pasos del 10 al 14 para cada vial.
 - 16) Lavamos cada uno de los viales
 - 17) Colocamos los viales en una bandeja dentro del horno para secar a una temperatura de 105°C por dos horas.
 - 18) Sacamos la bandeja del horno y se dejaron enfriar los viales.
 - 19) Procedimos a pesar los viales (peso final).
 - 20) Calculamos los resultados a partir de la lectura del equipo que es dado en microgramos de agua.

Una vez completado el proceso de añadir el valor obtenido por titulación coulombimétrica en el renglón del constituyente de humedad, procedimos a crear el modelo de

calibración. El modelo de calibración constó de algoritmos estadísticos basado en unos parámetros utilizados por el sistema (*software*) del NIR para crear la ecuación de calibración la cual aplicaremos a las muestras durante el análisis de rutina (Tabla 3). Estos algoritmos estadísticos son utilizados para determinar tanto la viabilidad de un método de NIR como la validez de la ecuación de calibración (Burns & Ciurzak, 2001), de esta manera permite predecir con exactitud la información deseada (como la concentración por ejemplo) de un analito nunca analizado previamente por el instrumento.

Análisis de datos

Para probar la equivalencia entre el uso del método de NIR para realizar pruebas de humedad a productos liofilizados y el uso del método de Karl Fischer desarrollamos un diseño experimental donde cada muestra fuese utilizada como su propio control. Un grupo de muestras seleccionadas aleatoriamente (*random sampling*) y de manera independiente fue utilizado para realizar este estudio. El contenido de humedad fue determinado en un total de cinco muestras de producto liofilizado utilizando el método de NIR. Posteriormente, el contenido de humedad fue determinado a las mismas muestras utilizando el método de Karl Fischer (titulación coulombimétrica). Los resultados fueron analizados estadísticamente utilizando la Prueba T para pares.

Los resultados de contenido de humedad obtenidos durante el estudio realizado utilizando el método de NIR vs. los resultados de contenido de humedad obtenidos durante el estudio utilizando el método de Karl Fischer mostraron una gran similitud. El contenido de humedad obtenido utilizando el método de NIR fue significativamente similar al contenido de humedad obtenido utilizando el método de Karl Fischer (0.45 ± 0.01 % y 0.44 ± 0.02 % de humedad, respectivamente).

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como primer objetivo teníamos el comparar la equivalencia entre los métodos por NIR y el método de titulación coulombimétrica utilizado actualmente. Como parte fundamental del estudio de viabilidad, se comenzó con el desarrollo del modelo de calibración, el cual consistió de cuatro pasos. Primero, obtuvimos el espectro de NIR para cada una de las muestras del grupo de calibración (Figura 1). Segundo, analizamos las muestras del grupo de calibración por el método primario para obtener el correspondiente valor de referencia del parámetro investigado; que en nuestro caso es contenido de humedad (Tabla 2). Tercero, determinamos la relación matemática entre el espectro de NIR de la muestra de calibración y el valor de referencia correspondiente al parámetro investigado (Figura 5). Procedimos a realizar el análisis quemométrico utilizando la aplicación (software) Visio® de FOSS NIRS. Los parámetros utilizados fueron la regresión de *Partial Least Square* y el tratamiento de *Savitzky Golay* con la segunda derivada (Tabla 3), de ésta manera obtuvimos una serie de factores con sus correlaciones correspondientes (Tabla 4) generados por la aplicación (Vision®). El número de factores óptimo a ser utilizado es determinado por la suma de los cuadrados de la predicción de error residual (PRESS por sus siglas en ingles) y la relación entre el error estándar de la calibración (SEC por sus siglas en ingles) y el error estándar de la validación cruzada (SECV por sus siglas en inglés) cuyo valor de SECV no debe de ser mayor que dos veces el SEC, de lo contrario la ecuación estaría sobre ajustada resultando en un modelo no apropiado. En cuanto a la correlación, la misma debe ser mayor de 0.95 para establecer que es favorable para utilizar como modelo. Por lo tanto determinamos que factor de 3 corresponde al factor ideal para establecer el

modelo debido a que posee un menor PRESS y el SECV es menor que dos veces el SEC (Burns & Ciurzak, 2001) con 0.9756 de correlación.

Finalmente, una vez establecido el factor a utilizar, validamos la ecuación de calibración con muestras independientes (análisis de rutina). Estas muestras de validación fueron analizadas por ambos métodos para asegurar que los resultados son estadísticamente aceptables (Tabla 6).

El modelo de calibración validado fue utilizado para predecir el valor del parámetro investigado para nuevas muestras y muestras posteriores bajo las mismas condiciones. Este proceso al cual se le llama análisis de rutina (RA por sus siglas en inglés) puede ser correctamente predicho si las muestras están dentro del rango de las variables (concentración, temperatura, tiempo de la muestra) cubiertas en la calibración. La extrapolación del modelo de calibración fuera de los rangos establecidos lleva a predicciones erróneas.

La Tabla 5 muestra los resultados obtenidos entre ambos métodos (Titulación coulombimétrica y NIR) para las mismas muestras. Los resultados obtenidos para las cinco muestras analizadas por rutinas (Routine Analysis) en el NIR presentan un promedio de 0.44548% con una desviación estándar de 0.00548 mientras que las mismas muestras analizadas por el método actual de titulación coulombimétrica presenta un promedio de 0.43524% con una desviación estándar de 0.02024. Esto demuestra que el método por NIR presenta menor variabilidad versus el método actual. Esto puede deberse a que el método actual posee más variables de proceso y manejo con respecto al NIR. El *boxplot*, como se presenta en la Figura 13, es una gráfica que permite observar de manera visual la variabilidad entre ambos procesos.

Los datos obtenidos en el análisis de rutina con las muestras de validación fueron utilizados para realizar el estudio estadístico comparativo. Este estudio consistió en la prueba T pareada. Esta prueba está diseñada para probar y comparar estadísticamente la distribución entre

poblaciones pequeñas (Mendenhall, Beaver & Beaver, 1999). Se siguieron los postulados de la prueba:

- Las muestras (paired difference) fueron escogidas al azar.
- Las muestras son independientes.
- Los datos son medidos en un intervalo y la variable es continua.
- Las muestras están normalmente distribuidas.

La prueba de hipótesis (H_0) establecida fue la siguiente:

No hay diferencia significativa entre la determinación de humedad por el método de espectroscopia de infrarrojo cercano versus la determinación de humedad por el método coulombimétrico de Karl Fischer en productos penicilínicos liofilizados como método analítico alternativo.

El postulado de la hipótesis alterna (H_a) fue:

Hay diferencia significativa entre la determinación de humedad por el método de espectroscopia de infrarrojo cercano versus la determinación de humedad por el método coulombimétrico de Karl Fischer en productos penicilínicos liofilizados como método analítico alternativo.

La hipótesis fue probada al 95% de confiabilidad. La condición que tiene que prevalecer para que la hipótesis nula no sea rechazada en la prueba T es que la T calculada sea menor que la T crítica ($T_{calc} < T_{crit}$). La Tabla 6 presenta los resultados obtenidos de la prueba T pareada, la cual indica que la hipótesis nula prevalece dado que obtuvimos una T_{calc} de 0.99227 mientras que la T_{crit} fue de 2.77645. De esta manera demostramos que ambos métodos no presentan diferencia significativa.

Como segundo objetivo teníamos el determinar cuál de los métodos (NIR vs. titulación coulombimétrica) presenta un menor riesgo en el manejo de los desperdicios con piridina.

Como parte de la evaluación para determinar cuantitativamente cuál método presenta un menor riesgo utilizamos la Matriz de Inventario de Riesgo (RIM score por sus siglas en inglés). Esta aplicación electrónica de Alliant®, Job Hazard Analytics crea cuantitativamente una puntuación basado en criterios establecidos. La matriz es alimentada con la información del análisis de peligrosidades de la tarea (JHA por sus siglas en inglés). El JHA se crea evaluando la tarea o actividad por paso, para cada actividad determinamos los peligros asociados durante la ejecución. Para cada peligro identificado, determinamos un control o controles para minimizar, mitigar y/o eliminar la peligrosidad identificada para la tarea.

Las actividades evaluadas fueron del proceso utilizado actualmente en la determinación de humedad para productos penicilínicos por Karl Fischer y las envueltas en el proceso utilizando el NIR (Tabla 7). Estas actividades tienen un riesgo o peligrosidad asociada, como observamos en el análisis realizado para la determinación de humedad utilizando el método coulombimétrico por Karl Fischer (proceso actual), la misma presenta mayor cantidad de tareas que a su vez desprende una serie de riesgos asociados. Para cada riesgo o peligrosidad determinamos su control para minimizar, eliminar o mitigar la misma.

Debido a que el método actual conlleva el uso de reactivos que contienen piridina entre otros componentes (Apéndice 5, Apéndice 6 y sustancias inflamables como el metanol, al finalizar el proceso se genera una cantidad mayor de desperdicios que son catalogados como peligrosos de acuerdo al 40 CFR § 261.31). A su vez aumenta su riesgo debido al manejo del mismo que debe ser transportado desde los contenedores principales con capacidad de un galón, localizados dentro del fume hood hasta ser decantado en el contenedor de almacenaje final con

capacidad de 30 galones. Además, el manejo de jeringuillas y agujas aumenta el riesgo en el proceso debido al manejo para poder realizar las pruebas requeridas.

El proceso para la determinación de humedad utilizando el NIR conlleva un menor riesgo debido a que no hay reactivos envueltos, no hay exposición de la muestra al analista ni manejo de jeringuillas y agujas, más aún el mismo vial utilizado para el análisis puede ser re-utilizado en otras pruebas, minimizando la cantidad de materiales que deben ser solicitados para pruebas, reduciendo el costo envuelto por análisis y disposición por la generación de desperdicios.

Como resultado del análisis final utilizamos la aplicación de *Job Hazard Analytics* para obtener la matriz de inventario de riesgo. Generamos el análisis de peligrosidades de las tareas para el método coulombimétrico Karl Fischer, la aplicación generó una puntuación con los datos entrados de nuestro proceso y obtuvimos una puntuación de 50. Procedimos a realizar los mismos pasos para obtener la matriz de inventario de riesgo para la determinación de humedad utilizando el NIR; la puntuación obtenida fue de 26. Cabe mencionar que utilizamos los argumentos previamente establecidos por la matriz de Alliant® para comparar y reportar de manera uniforme la puntuación de la matriz de inventario de riesgo de ambos procesos, de esta manera nos aseguramos utilizar la aplicación de manera estandarizada.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Este trabajo tuvo como meta establecer la viabilidad del uso de la tecnología de la espectroscopia de infrarrojo cercano de manera confiable para la determinación de humedad en productos liofilizado penicilínicos para eliminar la generación de desperdicios peligrosos que contienen piridina. Esta meta está basada en el primer o de los doce principios de la química verde: *Prevenir la creación de residuos peligrosos* (Lancaster, 2002).

Conclusiones

Los resultados de este trabajo demostraron que no existe diferencia significativa entre la determinación de humedad en productos liofilizados penicilínicos obtenida por el método NIR vs. La determinación de humedad en productos liofilizados penicilínicos obtenida por titulación coulombimétrica Karl Fisher, de acuerdo al análisis estadístico que realizamos para el grupo de muestras desconocidas.

De esta manera podemos concluir que el uso de la tecnología de NIR puede reducir significativamente los riesgos asociados a las tareas para la determinación de humedad en productos liofilizados penicilínicos. Además el NIR proporciona otras ventajas:

- La calidad del análisis es igual o mejor
- El tiempo de análisis se reduce considerablemente
- La generación, manejo y disposición de desperdicios peligrosos es eliminado
- Los costos asociados son minimizados (*cost saving*)
- La eficiencia aumenta con respecto al recurso humano

- Se cumple con leyes y políticas ambientales tales como RCRA-ELAPR y EPA.

Recomendaciones

Como recomendación cabe mencionar que basado en la literatura revisada se puede estudiar la viabilidad del uso del NIR en las líneas de producción (*in line*) para monitorear parámetros críticos tales como humedad, composición, potencia, *melt back* (como parámetro de calidad en productos liofilizados). Basados en los resultados previamente discutidos podemos concluir que el uso del NIR es viable para la determinación de humedad en productos liofilizados penicilínicos cumpliendo así con la eliminación de la generación, manejo y disposición de desperdicios peligrosos.

Limitaciones

No obstante, como en todo trabajo analítico existen limitaciones. Básicamente en este trabajo debido al costo asociado del proceso por unidad la cantidad provista de muestra fue limitada.

LITERATURA CITADA

- American Psychological Association (2010). Publication Manual of the American Psychological Association. (6th Ed.). Washington , DC.
- Anderson, T. (1857). On the products of the destructive distillation of animal substances, *Transactions of the Royal Society of Edinburgh*, XXI, 219-233. Edinburgh.
- Badoni, R., Jayaraman, A. (1990). Determination of the water content in organic compounds by gas chromatography using back flush technique, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 338 (6), 745-748.
- Blanco, M., Coello, J., Iturriaga, H., MasPOCH, S. & De la Pezuela, C. (1998). Near-infrared spectroscopy in the pharmaceutical industry, *Analyst*, 123, 135R-150R.
- Burns, D. & Ciurzak, E. (2001) Handbook of Near-Infrared Analysis: second edition revised, Marcell Dekker.
- Cao, W., Mao, C., Chen, W., Lin, H., Krishnan, S. & Cauchon, N. (2006). Differentiation and quantitative determination of surface and hydrate water in lyophilized mannitol using NIR Spectroscopy. *Journal of pharmaceutical sciences*, 95 (9), 2077-2086.
- Cedergen, A., (1974). Reaction Rates between Water and Karl Fischer Reagent. *Talanta*, 21, 265-271.
- Davis K.R., Schultz T.W. & Dumont J.N. (1981). Toxic and teratogenic effects of selected aromatic amines on embryos of the amphibian *Xenopus laevis*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 10(3), 371-391.
- De Agostini, A. (2002). Coulometric Titration. UserCom 7, Mettler Toledo, ME-51710185.
- Derksen, M.W.J., Van de Oetelaar, P.J.M. & Maris, F.A. (1998). The use of near-infrared spectroscopy in the efficient prediction of a specification for the residual moisture content of a freeze-dried product. *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*, 17, 473– 480.

- Fluka & Riedel-de Haën. (2000). Latest Developments of Karl Fischer Reagents. *Analytix*, 3.
- Frank, R. L. & Riener, E. F. (1950). Polypyridyls by Chichibabin Synthesis. *Journal of the American Chemical Society*. 72 (9), 4182-4183.
- Geladi P. & Kowalski BR. (1986). Partial least-squares regression: A tutorial. *Analytica Chimica Acta*. 185, 1-17.
- Grünke, S. & Wünsch, G. (2000). Kinetics and stoichiometry in the Karl Fischer solution. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 368, 139-147.
- Haider, S. I. & Ashok, A. (2009). *Biotechnology a comprehensive training guide for the biotechnology industry*. Taylor & Francis Group. Florida: CRC Press. ISBN 978-1-4200-8448-1.
- Hoebus, J., Roets, E. & Hoogmartens, J. (1996). The interference of penicilloic acids with Karl Fischer titration of penicillins. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 15(3), 359-364.
- Hoyt, J. L., (1969). An automated coulometric titrator and its application to the determination of water, *Analytica Chimica Acta*, Volume 44, (2), 369-375.
- Jimenez, C. & Constable, D. J. (2011). *Green Chemistry and Engineering: A Practical Design Approach*. Hoboken, N.J.: Wiley, 6-7.
- Jones, J.A., Last, I.R., Macdonald, B.F. & Prebbe, K.A., (1993). Development and transferability of near-infrared methods for determination of moisture in a freeze-dried injection product. *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*, 11, 1227– 1231.
- Junta de Calidad Ambiental (1995) Ley de Política Pública para el Fomento de la Reducción de los Desperdicios Peligrosos de Puerto Rico, Ley Número 10 del 19 de enero de 1995.
- Kim, H., Putt, D., Zangar, R., Wolf, R.C., Guengerich, F.P., Edwards, R., Hollenberg, P., Novak, R., (2001), Differential Induction of Rat Hepatic Cytochromes P450 3A1, 3A2, 2B1, 2B2, and 2E1 in response to Pyridine Treatment., *Drug Metabolism and Disposition*, 29, No. 3, (2), 353-360.

Lancaster, M. (2002). Green Chemistry: An Introductory test. Green Chemistry Network, University of York. 1-20. DOI:10.1039/9781847551009-00001

Last, I.R., Prebbe, K.A. (1993). Suitability of near-infrared methods for the determination of moisture in a freeze-dried injection product containing different amounts of active ingredient, *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*, 11, 1071– 1076.

Lindquist, J. (1984). Determination of Water in Penicillins using fase Karl Fisher reagents and electronic end-point optimization, *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Análisis*, 2 (1) 37-44.

Mendenhall, W., Beaver, R. & Beaver, B. (1999). *Introduction To Probability And Statistics*, 10th Ed. California: Brooks/Cole Publishing Company.

Osborne, B. & Fearn, T. (1986). Near infrared spectroscopy in food analysis. (R. Meyers, Ed.) *Carbohydrate Polymers* (Vol. 7, p. 327). Longman.

Photovolt Instruments. (2008a). Material Safety Data Sheet (No. de informe MSDS 2791006A). Recuperado de <http://www.photovolt.com/pages/2791006a.html>.

Photovolt Instruments. (2008b). Material Safety Data Sheet (No. de informe MSDS 2791006B). Recuperado de <http://www.photovolt.com/pages/2791006b.html>.

Photovolt Instruments. (2008c). Material Safety Data Sheet (No. de informe MSDS 2791003). Recuperado de <http://www.photovolt.com/pages/2791003.html>.

Photovolt Instruments. (2008d). Material Safety Data Sheet (No. de informe MSDS 2712204). Recuperado de <http://www.photovolt.com/pages/2712204.html>.

Reich, G. (2005). Near-infrared spectroscopy and imaging: Basic principles and pharmaceutical applications, *Advance Drug Delivery Reviews* 57, 1109-1143.

Roggo, Y., Chalus, P., Maurer, L., Lema-Martinez, C., Edmond, A. & Jent, N., (2007). A review of Near Infrared Spectroscopy and Chemometrics in Pharmaceutical Technologies, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 44 , 683-700.

Sims, G. & O'Loughlin, E. (1989). Degradation of pyridines in the environment. *Critical Reviews in Environmental Control* 19(4): 309-340.

Skoog, D., Holler, F. & Nieman, T. (1998). *Principles of Instrumental Analysis*, 5ta edición, Philadelphia, Sounder College Publishing, 422.

US Environmental Protection Agency (1976) Resource Recovery and Conservation Act (RCRA), 42 U.S.C. § 6901.

US Environmental Protection Agency. (1978). *Federal Register* 43 (76), 16684-16688.

US Environmental Protection Agency. (1982). *Federal Register* 47 (250), 58031-58035.

US Environmental Protection Agency. (1986). Health and Environmental Effects Profile for Pyridine. (No. de documento EPA/600/X-86/168 (NTIS PB89123384))

US Environmental Protection Agency. (1990). Code Title 42, chapter 82 § 6902 (a)(6).

US Environmental Protection Agency. (1990). Code Title 42, chapter 133§13101

US Environmental Protection Agency. (2002). *Folleto de información sobre la química verde*. (No. de documento EPA 742-F-02-003-S). Washington, DC: Oficina de prevención de la contaminación y sustancias tóxicas.

US Environmental Protection Agency. (2004). The National Waste Minimization Program. Recuperado de <http://www.epa.gov/epaoswer/hazwaste/minimize/about.htm>.

US Environmental Protection Agency. (2009). Protection of Environment, *Code of Federal regulation* 40 (261). GPO: Washington DC.

- US Environmental Protection Agency. (2009). Protection of Environment, *Code of Federal regulation* 40 (261.31). GPO: Washington DC.
- US Environmental Protection Agency. (2004). Waste Quantity: Trends Report. Toxic Release Inventory. Recuperado de <http://www.epa.gov/triexplorer/chemical.htm>.
- US Pharmacopeia. XXVIX. (2011). <921> Water Determination. *The United States Pharmacopeial Convention*, Rockville, MD, EE.UU.
- US Pharmacopeia. XXVIX. (2011). <1049> Quality of Biotechnological Products: Stability Testing of Biotechnological / Biological. *The United States Pharmacopeial Convention*, Rockville, MD, EE.UU.
- US Pharmacopeia. XXVIX. (2011). <1119> Near-Infrared Spectrophotometry. *The United States Pharmacopeial Convention*, Rockville, MD, EE.UU.
- US Public Health Service (1992). *Toxicological Profile for Pyridine*. Agency for Toxic Substances and Disease registry.
- Warner, J.C., Cannon, A.S. & Dye, K.M. (2004). Green Chemistry. *Environmental Impact Assesment Review*, 24 (7-8), 775-799.
- Wheelock, C., Forshed, J., Goto, S., Hammock, B. & Newman, J. (2008). Effects of pyridine exposure upon structural lipid metabolism in Swiss Webster mice. *Chemical Research in Toxicology* 21(3):583-590
- Zhou, X., Hines, P. & Borer, M.W. (1998). Moisture determination in hygroscopic drug substance by near infrared spectroscopy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 17 (2), 219-225.
- Niu, J. & Conway, B. (2002). Development of techniques for purification of waste waters: removal of pyridine from aqueous solution by adsorption at high-area C-cloth electrodes using in situ optical spectrometry. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 521(1-2), 16-28.

TABLAS

Tabla 1

Muestras para el desarrollo del modelo de calibración.

Grupo	Cantidad de Viales	Volumen de agua destilada inyectada aproximadamente (µL)
A	3	0 (control)
B	3	6.8
C	3	14
D	3	34
E	3	50
F	3	68

Tabla 2

Hoja de datos para la determinación del contenido de humedad para el grupo de calibración.

Vial ID	Neto	MeOH (1mL)	MeOH wt.	MeOH + muestra	Humedad (µg/mL)	% Humedad
1A	3.8360	1.0111	5.4747	9.3107	1613.9	0.3921
2A	3.8010	1.0091	5.4306	9.2316	1772.4	0.4266
3A	3.8009	1.0085	5.4252	9.2261	1802.7	0.4339
1B	3.8339	1.0105	5.4492	9.2831	2613.4	0.6262
2B	3.8583	1.0128	5.4440	9.3023	2739.9	0.6522
3B	3.8384	1.0086	5.4177	9.2561	2887.2	0.6903
1C	3.8158	1.0111	5.4280	9.2438	3244.2	0.7773
2C	3.8380	1.0106	5.4383	9.2763	3280.3	0.7845
3C	3.8636	1.0087	5.260	9.2896	3376.3	0.8048
1D	3.8741	1.0115	5.4328	9.3069	5442.9	1.2927
2D	3.8654	1.0152	5.4127	9.2781	5669.2	1.3404
3D	3.8709	1.0031	5.4186	8.2895	5741.9	1.3731
1E	3.7206	1.0011	5.6155	9.3361	7665.6	1.9214
2E	3.8874	1.0115	5.4296	9.3170	7176.6	1.7005
3E	4.0615	1.0068	5.2473	9.3088	7597.0	1.7294
1F	3.7763	1.0113	5.5612	9.3375	9882.9	2.4164
2F	3.4216	0.9903	5.4442	8.8658	11649.6	2.8911
3F	4.0275	1.0064	5.3056	9.3331	10924.0	2.5154

Tabla 3

Parámetros utilizados en la elaboración de la ecuación de calibración.

Parámetros	
Método de regresión	Partial Least Square
Método de pre-tratamiento	Savitzky-Golay y segunda derivada
Rango de largos de onda	1450 nm – 2000 nm
Factores	Máximo de factores
Método de validación	Validación cruzada

Tabla 4

Resumen del algoritmo utilizado por “Partial Least Square”

Factor	R squared	Std Error calibration	PRESS	F Value	Std Error X Validation
Factor 1	0.7222	0.4237	3.3265	41.5945	0.4299
Factor 2	0.9633	0.159	0.7717	196.8672	0.2071
Factor 3*	0.9756	0.1342	0.6812	186.6486	0.1945
Factor 4	0.9787	0.1302	1.0861	149.1465	0.2456
Factor 5	0.9855	0.1117	1.1657	163.1946	0.2545
Factor 6	0.9894	0.0998	0.8076	171.0998	0.2118
Factor 7	0.9962	0.063	0.5508	370.916	0.1749
Factor 8	0.9978	0.0497	0.5615	521.132	0.1766
Factor 9	0.9989	0.0376	0.5822	812.8774	0.1798
Factor 10	0.9998	0.0187	0.6214	2958.9902	0.1858
Factor 11	0.9999	0.0104	0.6298	8632.6699	0.1871

Tabla 5

Resultados obtenidos de humedad con las muestras de validación en ambos métodos y diferencia pareada (cálculos para Prueba T pareada).

Muestra	NIR	KF	Diferencia pareada (NIR - KF)
1	0.4497	0.4320	0.0177
2	0.4455	0.4386	0.0069
3	0.4479	0.4541	-0.0062
4	0.4482	0.4025	0.0457
5	0.4361	0.4490	-0.0129
N	5	5	5
Mean	0.44548	0.43524	0.01024
SD	0.00546	0.02024	0.023075702
SE	0.00244	0.00905	0.010319767

Tabla 6

Resultados obtenidos para los cálculos de Prueba T pareada.

Parámetro	Resultado
degrees of freedom = $df = n - 1 =$	4
$t_{calc} = \text{mean difference} / \text{SE difference} =$	0.99227
$t_{crit} (0.05, df = 4) =$	2.77645
P value	0.37723

Nota: Para prevalecer H_0 , t_{calc} debe ser menor que T_{crit} .

Tabla 7

Actividades para el análisis de peligrosidades de tarea (JHA).

Actividades para la tarea utilizando KF	Actividades para la tarea utilizando NIR
Manejo (Encendido) del instrumento	Manejo (Encendido) del instrumento
Llenado del envase con solvente	Lectura de estándares y muestras
Vaciado del envase con solvente	
Manejo de jeringuilla	
Inyección manual	
Secado	
Manejo de desperdicios peligrosos	

FIGURAS

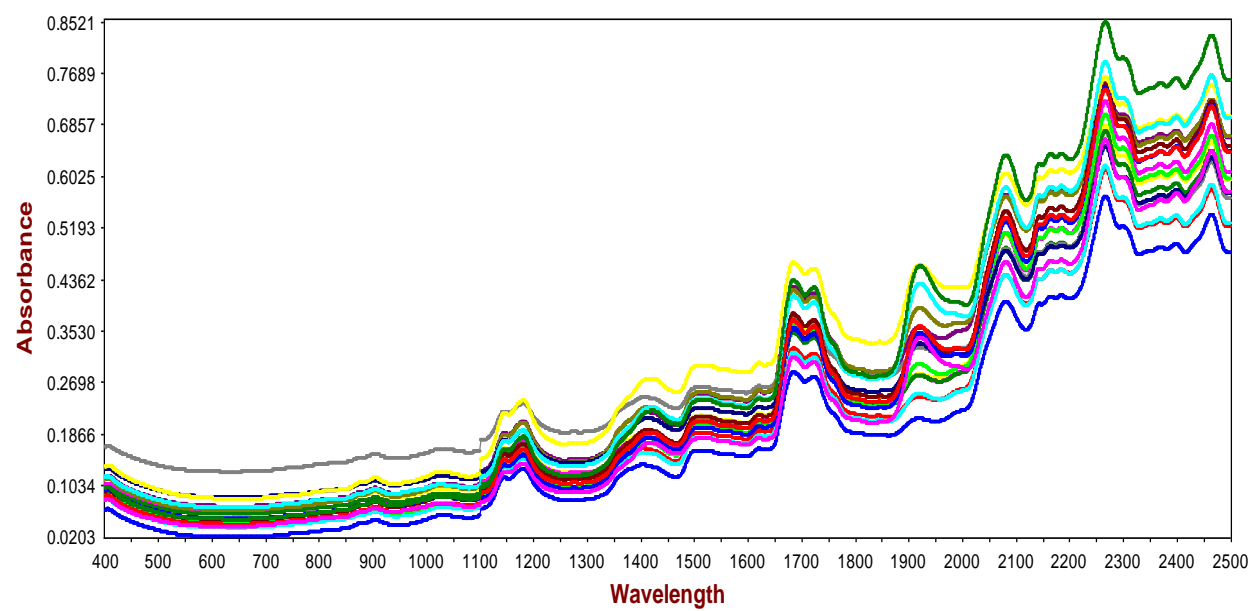


Figura 1. Espectro de NIR para muestras de calibración.

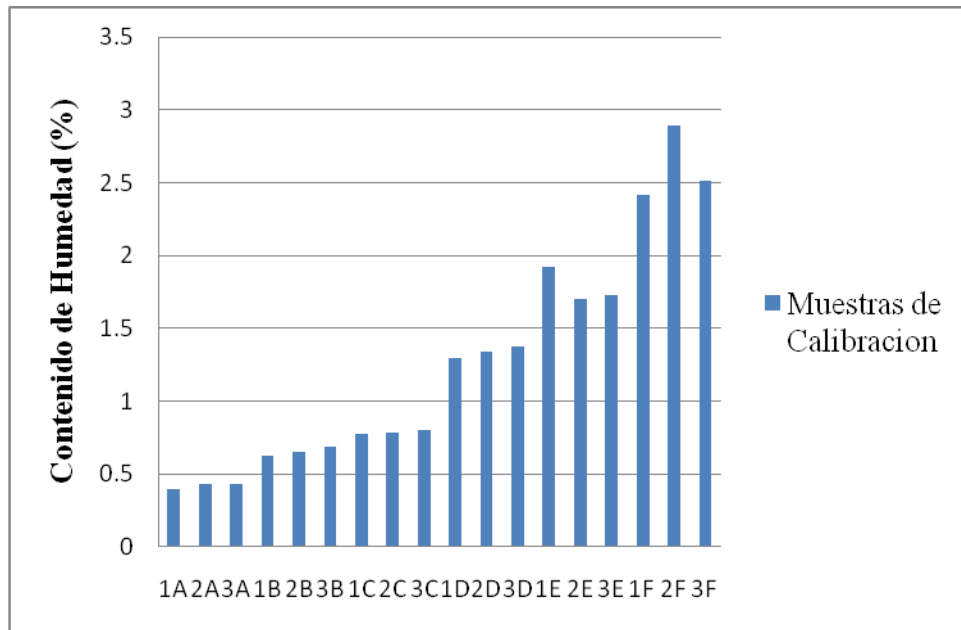


Figura 2. Contenido de humedad para las muestras de calibración.

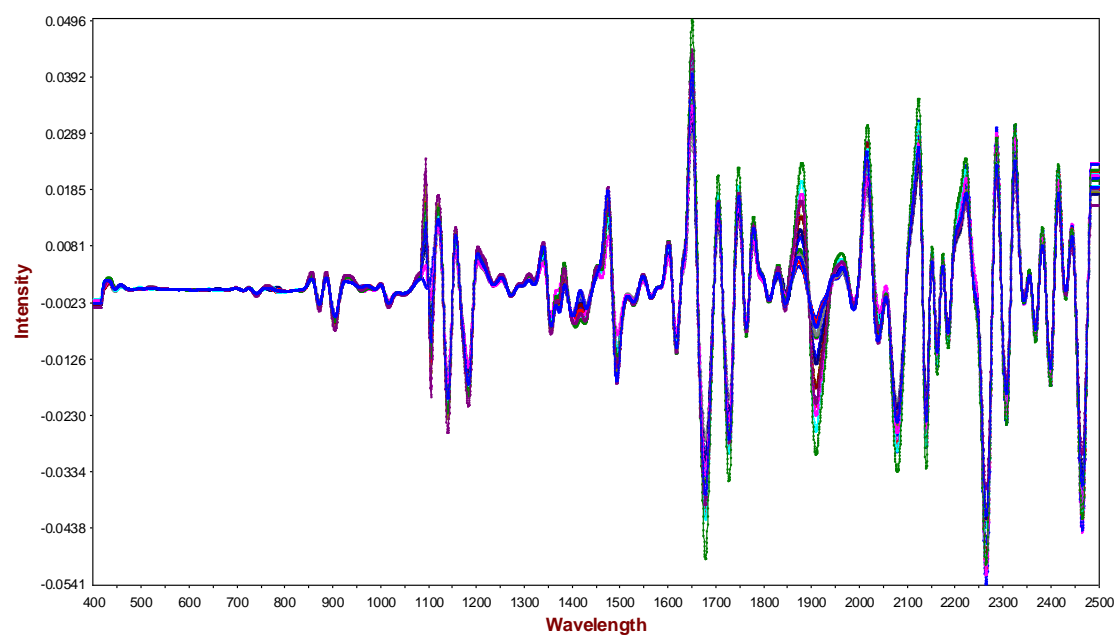


Figura 3. Segunda derivada del espectro de infrarrojo cercano del grupo de calibración.

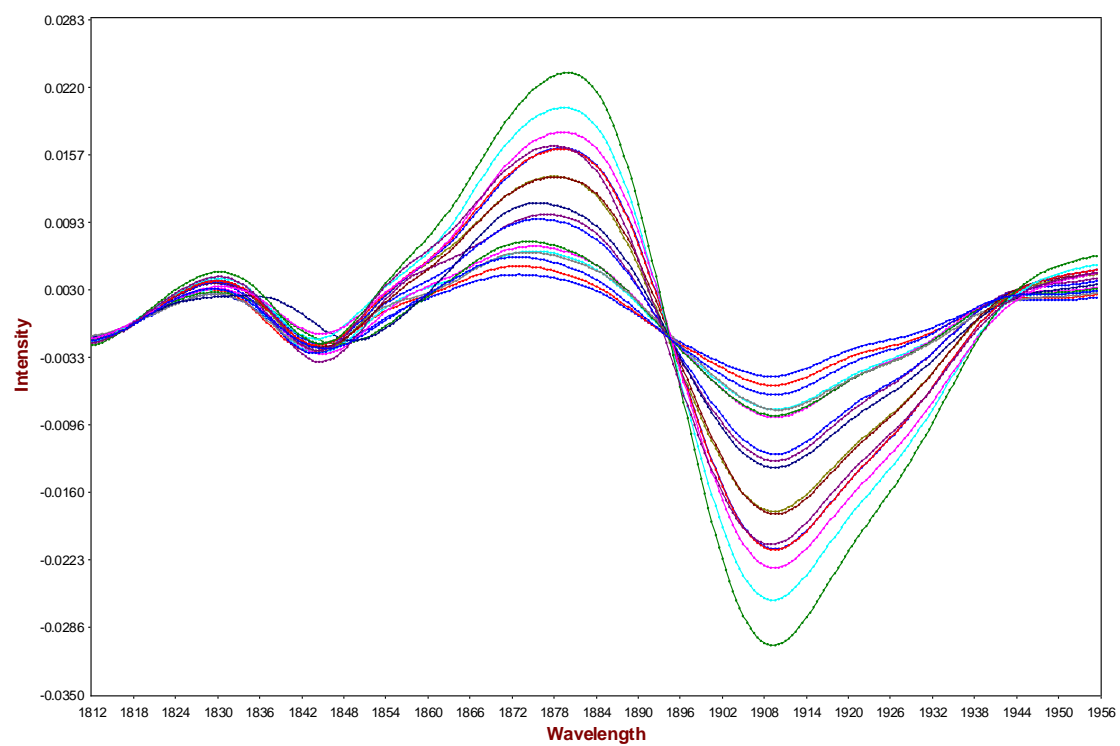


Figura 4. Ampliación de la segunda derivada del espectro de infrarrojo cercano del grupo de calibración en la región de interés.

Calibration Set : Calculated vs Lab Data

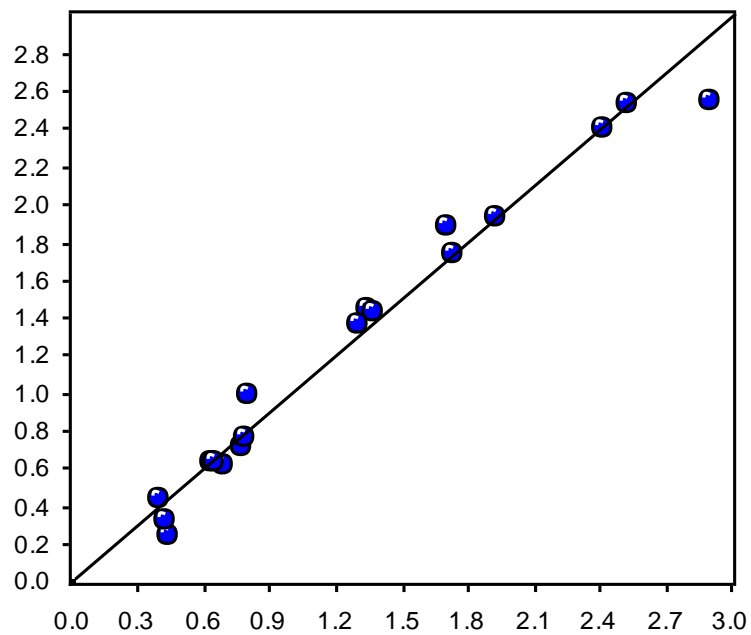


Figura 5. Algoritmos generados por la aplicación del NIR (Vision), correlación entre métodos para las muestras de calibración.

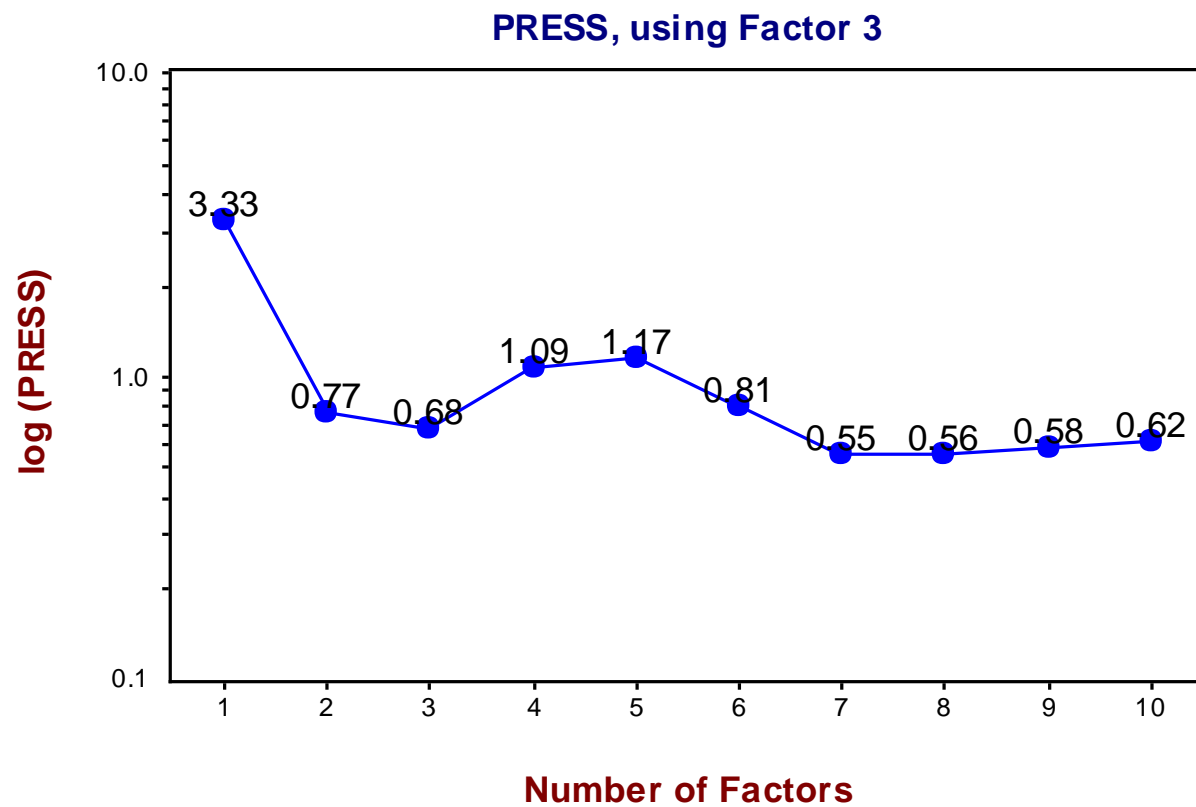


Figura 6. Algoritmos generados por la aplicación del NIR (Vision® Software).

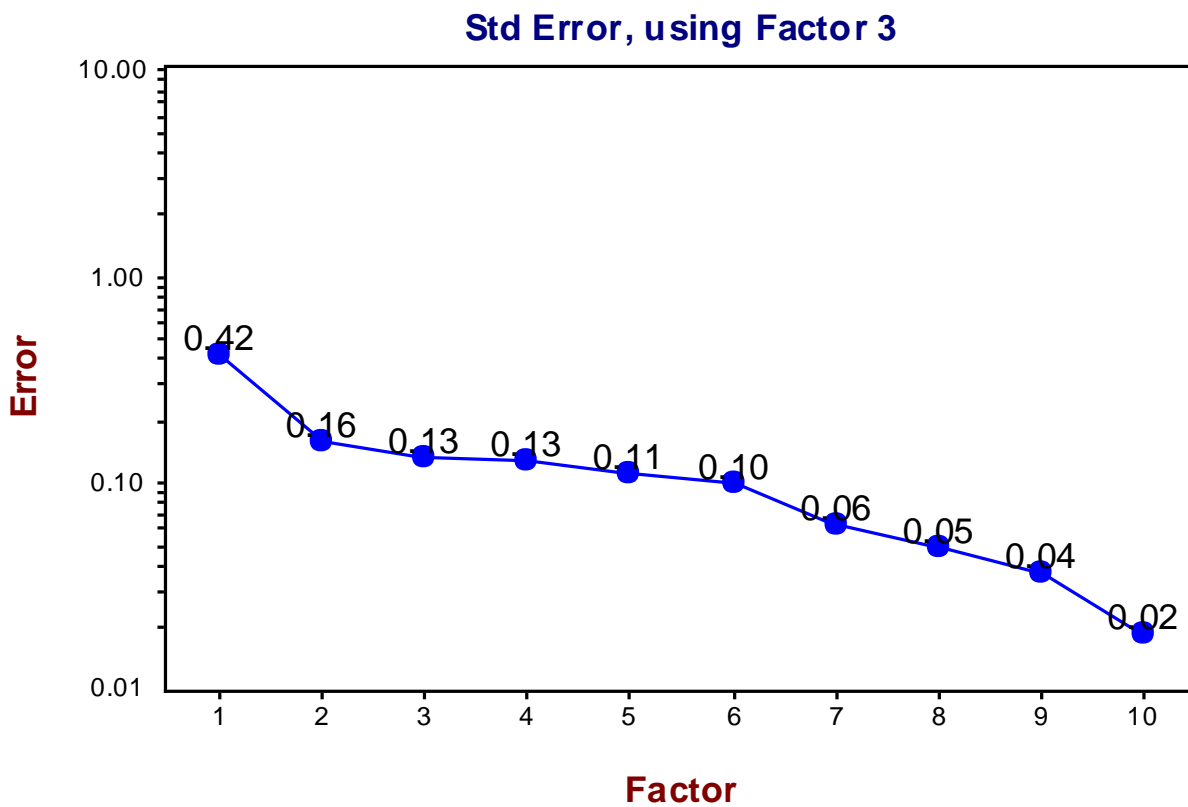


Figura 7. Algoritmos generados por la aplicación del NIR (Vision®).

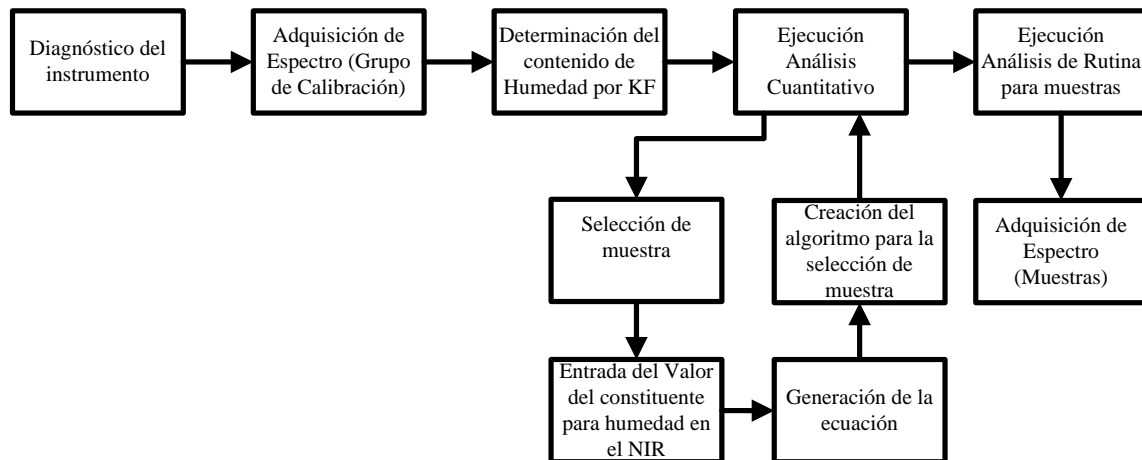


Figura 8. Diagrama básico de proceso.

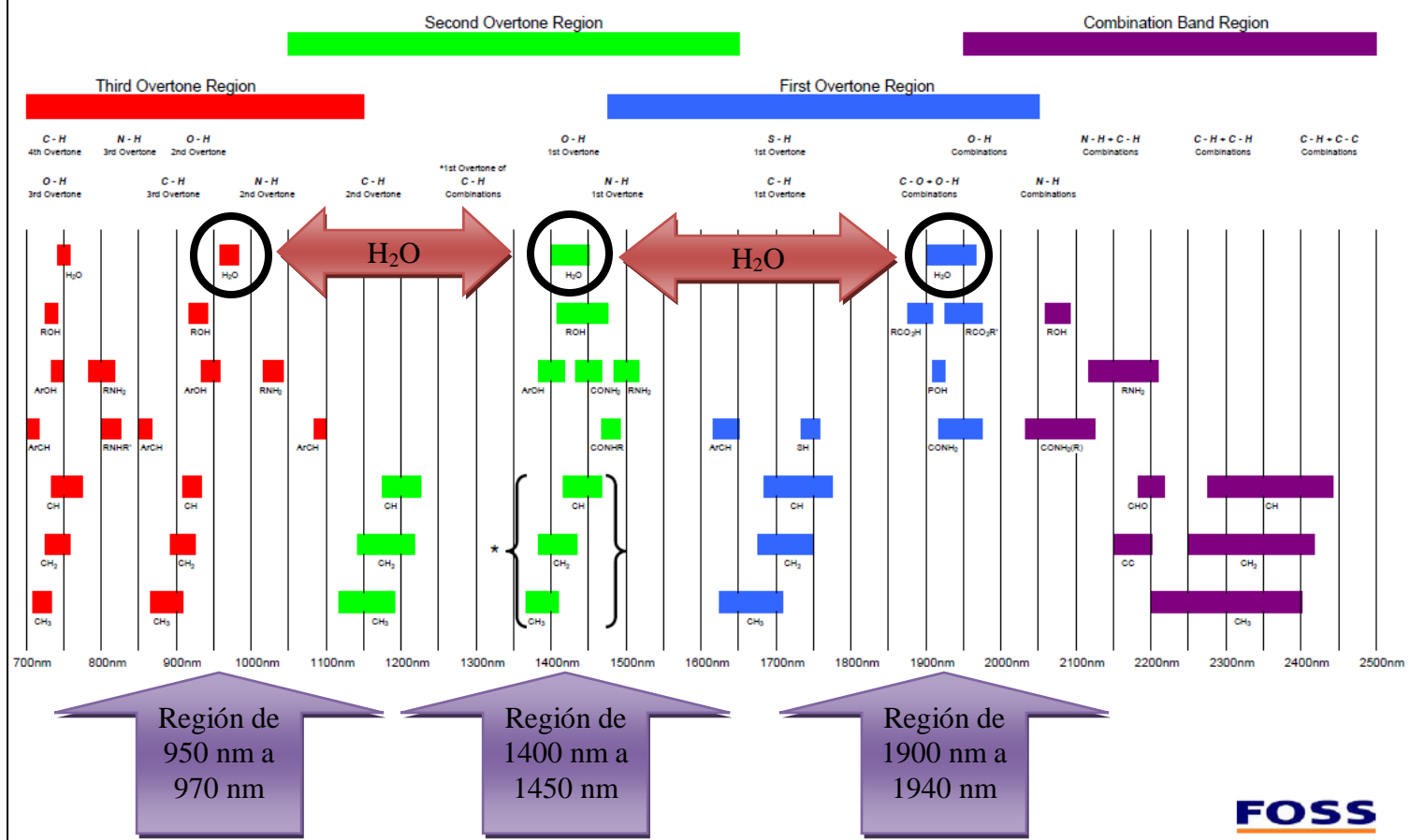


Figura 9. Diagrama de las bandas de absorción del Infrarrojo cercano.

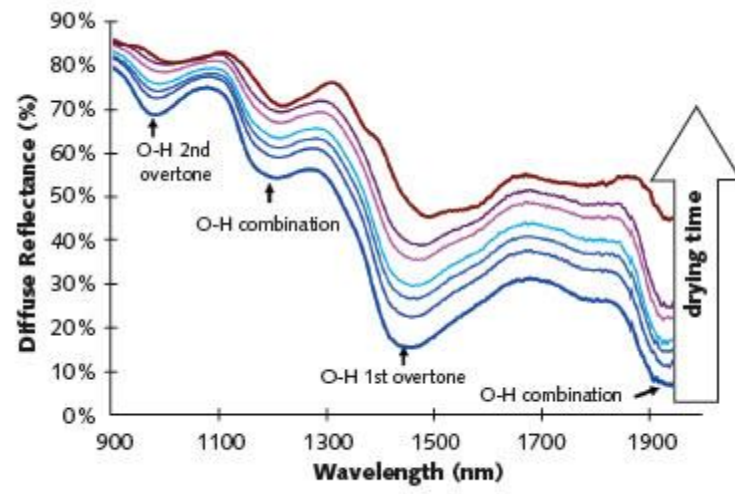


Figura 10. Cambios en el espectro de reflectancia a través del tiempo de secado.

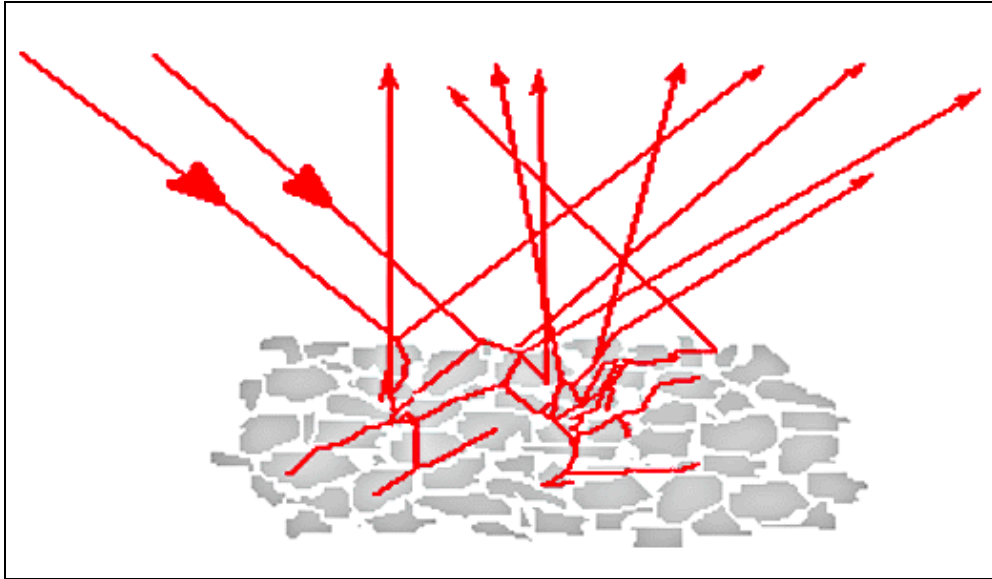


Figura 11. Ejemplo de la reflectancia difusa.

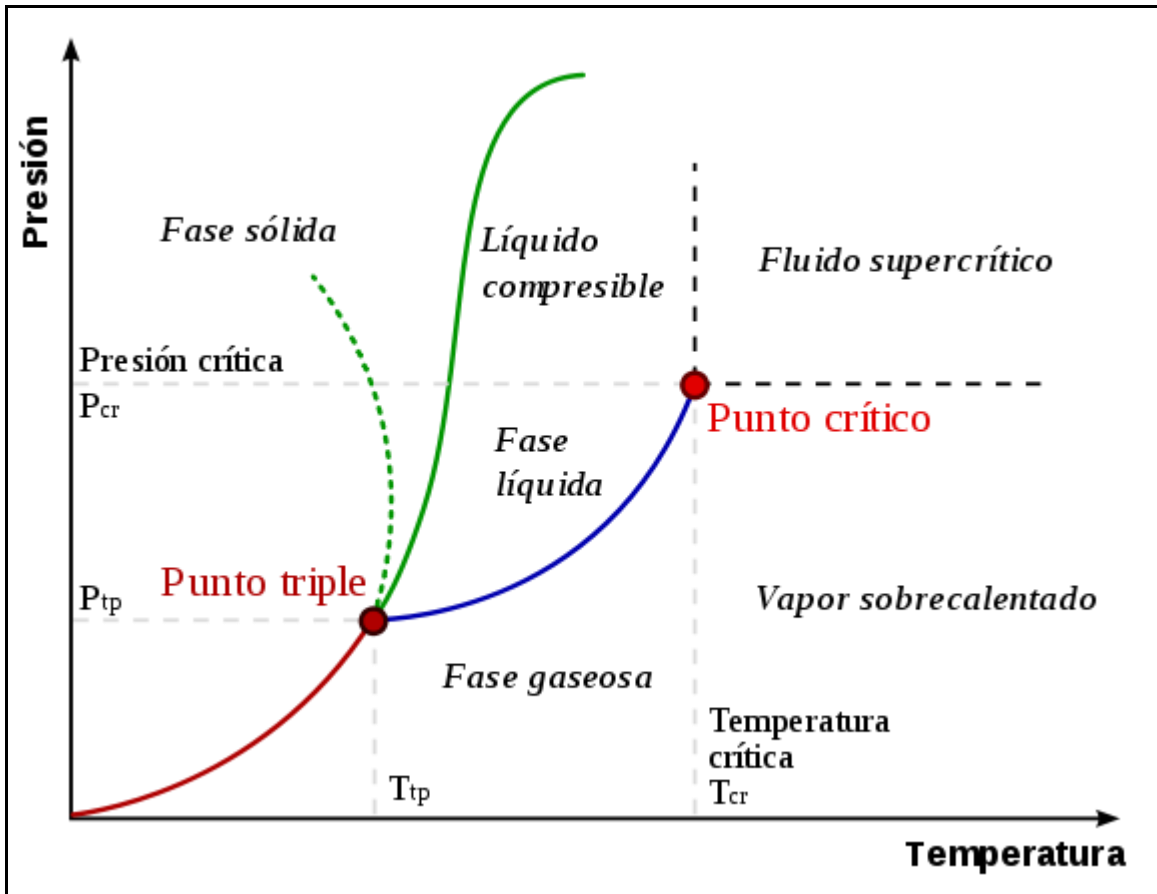


Figura 12. Diagrama de fases de Clausius-Clapeyron.

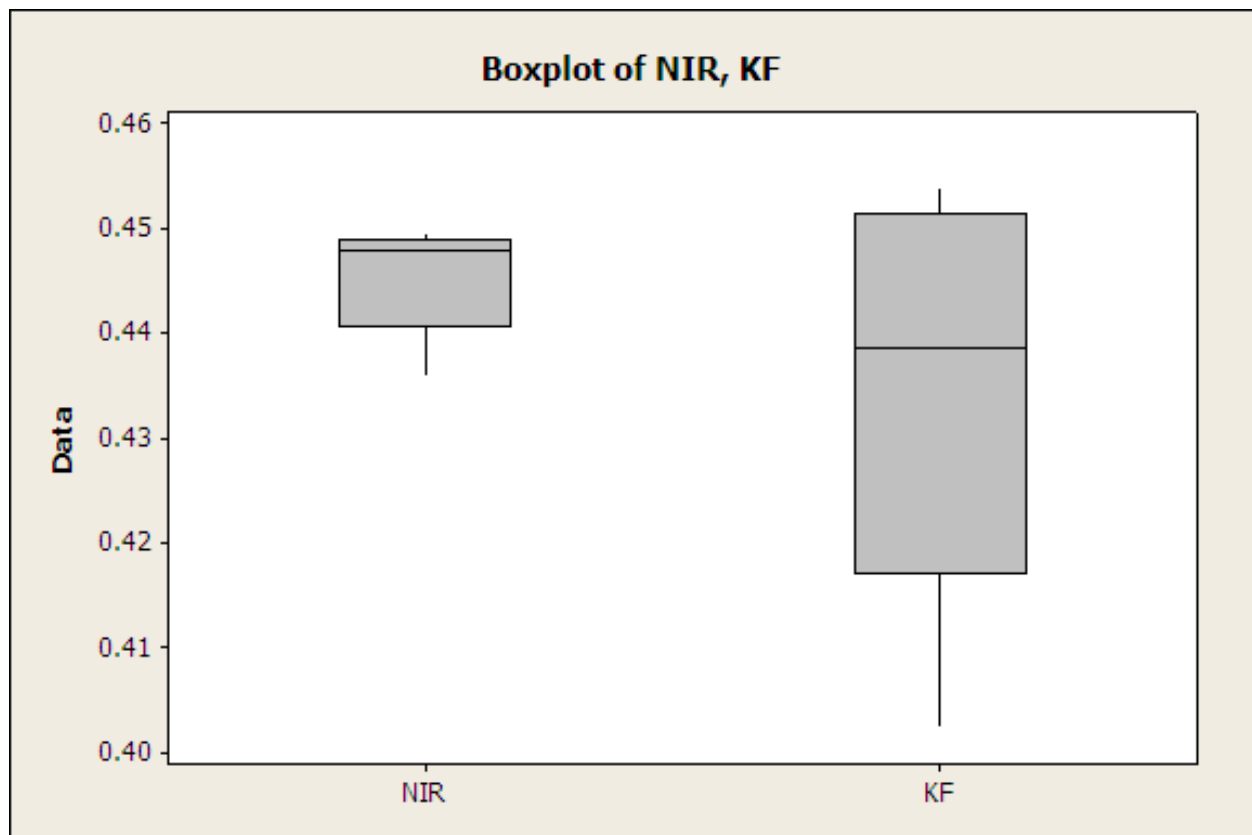


Figura 13. Gráfica de boxplot de variabilidad.

APÉNDICES

Apéndice 1

Análisis de trabajo, riesgos y procedimientos de emergencia.

Pasos	Accidentes potenciales o peligrosos	Procedimiento de seguridad
Operación del instrumento.	Choque eléctrico, fuego	Conectar el instrumento a un receptáculo trifásico con conexión a tierra (<i>ground</i>).
Inspección visual de las partes de cristal del instrumento para asegurar las mismas o se encuentren rotas o quebradas.	Partes del instrumento con daños, rotas o quebradas pueden causar heridas y/o cortaduras.	Manejar con extremo cuidado. Descartar cualquier parte o pieza de la cristalería en la caja para disposición de cristalerías designada.
Manejo de los solventes y/o reactivos.	Intoxicación con vapores tóxicos y/o vapores de piridina.	Disponer de los desperdicios de solventes y reactivos en el contenedor designado. Manejar con extremo cuidado. Revisar el MSDS correspondiente. Si se está trabajando con piridina, el extractor (<i>Hood</i>) debe de estar encendido en todo momento.
Secado en horno	Quemaduras	Manejar con extremo cuidado. Utilizar equipo apropiado de protección.
Manejo y descarte de los desperdicios: materiales y solventes.	Contaminación del área de trabajo con posibles vapores tóxicos y flamables.	En caso de accidentes o derramen evacuar el área y comunicarse con el número de extensión para emergencias. El equipo de respuestas a emergencias será responsable de limpiar el área.

Apéndice 2

Hoja de aprobación del protocolo de IBC.



ANA G MÉNDEZ UNIVERSITY SYSTEM
Vicepresidency for Planning and Academic Affairs
Associate Vicepresidency for Sponsored Programs
Office of Regulatory Compliance

Institutional Biosafety Committee (IBC)

Date : December 16, 2011

Principal Investigator : José A. López Fretts

Protocol Title : "Estudio de viabilidad en la determinación de humedad en liofilizados penicilínicos por espectroscopía de infrarrojo cercano (NIR)".

Protocol Number : B01-007-11

Submission Type : Initial Protocol

Institution/School : Universidad Metropolitana/ Environmental Affairs School

Revision Type : Full Review

Action : Acknowledged

Review Date : December 16, 2011

We certify that this research protocol/proposal was received, reviewed and acknowledged in the Office of Regulatory Compliance by the *Institutional Biosafety Committee (IBC)* in **December 16, 2011**. Your protocol/proposal was reviewed and acknowledge under **Full Committee Review**. The *Ana G. Mendez University System-IBC* **acknowledges** that all requirements, as established by Institutional Policies were meet and the Protocol/ Project do not requires further AGMUS-IBC review.

The following documents were reviewed:

<input checked="" type="checkbox"/> Protocol/ Project	<input checked="" type="checkbox"/> Risk Assessment Form (IBC_09)
<input checked="" type="checkbox"/> Hazardous Chemicals Report (IBC_03)	<input checked="" type="checkbox"/> Curriculum Vitae
<input checked="" type="checkbox"/> Laboratory Registration Form (IBC_05)	<input checked="" type="checkbox"/> Trainings and certifications
<input checked="" type="checkbox"/> Project Registration Form (IBC_06)	<input checked="" type="checkbox"/> Support/ Collaboration Letter

Please keep in mind the following:

- If any change or amendment is done to the attached documents with this study, that involves the use of any AGMUS facilities, they must be submitted again to the IBC for appropriate review, using the IBC Changes form (IBC_08).
- Every serious or unanticipated adverse event must be informed to the appropriate Office where the project will take place, outside AGMUS facilities.

This letter acknowledges that all processes and requirements of the AGMUS-IBC were met under Institutional Policies but all research related activities will take place at the Pfizer Carolina and not in AGMUS facilities. **The AGMUS_IBC cannot review and inspect Pfizer Carolina, hence, Pfizer Carolina is responsible for any research being conducted in its facilities.**

For more information, questions or to report a non-compliance event, please contact your Institutional Compliance Coordinator at: Universidad Metropolitana (UMET), Miss Carmen Crespo (787)766-1717 ext. 6366; Universidad del Turabo, Prof. Josefina Melgar (787)743-7979 ext.4126; and Universidad del Este, Ms. Natalia Torres (787)257-7373 Ext. 2279; or write to:

Office of Regulatory Compliance
Vice Presidency for Planning and Academic Affairs
Associate Vice Presidency for Sponsored Programs
Ana G. Mendez University System
P.O. Box 21345

Cordially,



Lymari Fuentes Claudio, Ph.D.
IBC Chair

Apéndice 3.

Carta de autorización para tesis aplicada al trabajo.



PARA: ESCUELA DE ASUNTOS AMBIENTALES, UMET
DE: VICTOR T. BATISTA, SITE LEADER
FECHA: 4 DE NOVIEMBRE DE 2011
ASUNTO: CARTA DE AUTORIZACIÓN PARA TESIS APLICADA AL TRABAJO

POR LA PRESENTE DESEO INFORMAR QUE JOSÉ A. LÓPEZ FRETTS SOLICITÓ LA COOPERACIÓN PARA PODER REALIZAR SU TESIS APLICADA AL TRABAJO. ENTENDEMOS QUE ESTE PROYECTO PUEDE TRAER UN GRAN BENEFICIO PARA AMBAS PARTES. POR LO TANTO SE LE ESTARÁ BRINDADO LA COOPERACIÓN NECESARIA PARA PODER SATISFACER LAS NECESIDADES.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Victor T. Batista".

VICTOR T. BATISTA
SITE LEADER
PFIZER CAROLINA
PUERTO RICO


Apéndice 4

Vista lateral al interior del compartimiento de la muestra del NIR con vial y el iris abierto.



Apéndice 5

Hoja de datos de seguridad del material para la solución A

Photovolt Instruments MSDS 2791006A		Page 1 of 2	
		MSDS 2791006A	
MATERIAL SAFETY DATA SHEET			
Photovolt Instruments Inc. 6323 Cambridge St. Minneapolis, MN 55416 USA		EMERGENCY & MSDS CONTACT	
Phone: 952-848-2000 FAX: 952-926-5498		3E Company (800) 451-8346 (619) 677-0150	
PHOTOVOLT KF PYRIDINE BASE VESSEL SOLUTION PART A P/N 2791006A 1 x 80ml bottles			
CHEMICAL NAME & SYNONYMS	DOT CLASS	SARA TITLE 313	
KF Pyridine base vessel solution for coulometric titration	3/II	Yes - pyridine	
TSCA Listed - yes			
FORMULA	REPORTABLE QTY.	F.W.	CAS#
Pyridine C ₅ H ₅ N 30-50%	454 kg	79.10	110-86-1
sulfur dioxide 15-18%	227 kg	64.07	7446-09-5
PHYSICAL DATA			
Boiling point 115C (pyridine); water soluble.			
Vapor pressure (pyridine) 10 mm at 13C; Vapor density (pyridine) 2.73			
APPEARANCE & ODOR			
Clear, colorless liquid. Odor of pyridine and sulfur dioxide.			
REACTIVITY & CONDITIONS TO AVOID			
Stable. No hazardous self-reactivity. Incompatible with oxidizers.			
FIRE HAZARDS			
Flammable. Emission of NO _x , SO _x and CO _x with production of soot. Avoid inhalation of fumes and vapors. Firefighters wear SCBA.			
EXTINGUISHER	FLASHPOINT	LEL	UEL
CO ₂ , water spray, dry chemical foam.	20C	1.8%	12.4%
HEALTH HAZARDS			
2/24/2011			

Irritating and corrosive to skin, eyes and mucous membranes. Consider toxic internally LD₅₀ (oral-rat) 891 mg/kg (pyridine), LC₅₀ (inhl-rat) 2520 ppm/1H (sulfur dioxide). OSHA PEL/ACGIH TLV: TWA: 5 ppm (pyridine); OSHA PEL: TWA 5 ppm (SO₂); ACGIH TLV 2 ppm (SO₂); STEL 5 ppm (SO₂). Mutagenic data, CNS depression. No evidence or carcinogenicity.

SPECIAL PRECAUTIONS

Goggles and rubber gloves must be worn. Eye wash nearby.

FIRST AID

Wash contact area thoroughly with water. For eyes, get medical attention. If swallowed, give water or milk. Vomiting will probably be spontaneous, if not, induce it. Get medical attention. Inhalation; remove to fresh air.

SPILLS & LEAKS

Contain spill. Ventilate area. Take up spill in absorbent and sweep. Disposal to hazardous waste.

DATE:
1/28/08

PREPARED BY:
JHN

**BACK TO MAIN INDEX**

Photovolt Instruments Inc.
sales@photovolt.com
PHONE: 1-952-848-2000
5498

email:


FAX 1-952-926-

© 2006 Photovolt Instruments Inc.

2/24/2011

Apéndice 6

Hoja de datos de seguridad del material para la solución B

Photovolt Instruments MSDS 2791006B		Page 1 of 2	
		MSDS 2791006B	
MATERIAL SAFETY DATA SHEET			
Photovolt Instruments Inc. 6323 Cambridge St. Minneapolis, MN 55416 USA		EMERGENCY & MSDS CONTACT	
Phone: 952-848-2000 FAX: 952-926-5498		3E Company (800) 451-8346 (619) 677-0150	
PHOTOVOLT KF PYRIDINE BASE VESSEL SOLUTION PART B P/N 2791006B 1 x 120ml bottles			
CHEMICAL NAME & SYNONYMS	DOT CLASS	SARA TITLE 313	
KF Pyridine base vessel solution for coulometric titration part B	3/II	Yes - methanol Methoxyethanol and pyridine	
TSCA Listed - yes			
FORMULA	REPORTABLE QTY.	F.W.	CAS#
Methanol CH ₃ OH 50%	2270 kg	32.04	67-56-1
Pyridine C ₅ H ₅ N 16%	454 kg	79.10	110-86-1
2-methoxyethanol 26%	N/A	76.10	109-86-4
Iodine I 5%	N/A	126.90	7553-56-2
sulfur dioxide SO ₂ 3%	227 kg	64.07	7446-09-5
PHYSICAL DATA			
Boiling point 65C (methanol); water miscible.			
APPEARANCE & ODOR			
Brown liquid. Odor of pyridine.			
REACTIVITY & CONDITIONS TO AVOID			
Stable. No hazardous self-reactivity. Incompatible with oxidizers.			
FIRE HAZARDS			
Flammable. Ignites readily. Emission of NO _x , SO _x , and iodine fumes in addition to sooty smoke. Firefighters wear SCBA.			
EXTINGUISHER	FLASHPOINT	LEL	UEL
CO ₂ , water spray, dry chemical foam.	53F	6 %	36.5%
HEALTH HAZARDS			
Irritating and corrosive to skin, eyes and mucous membranes.			
2/24/2011			

Consider toxic all routes. LD₅₀ (oral-rat) 5628 mg/kg (methanol) LD₅₀ (oral-rat) 891 mg/kg (pyridine), OSHA PEL/ACGIH TLV: TWA: 200 ppm (pyridine); OSHA PEL/ACGIH TLV: TWA: 5 ppm (pyridine). Exposure symptoms: dizziness, headaches, nausea,, nasal irritation, intoxication, unconsciousness. Fatal dose may be <50ml. Mutagenic data. Experimental teratogen, reproductive effects. Warning: This produce contains a chemical (2-methoxyethanol) known to the state of California to cause birth defects or other reproductive harm. No evidence of carcinogenicity.

SPECIAL PRECAUTIONS

Goggles and rubber gloves must be worn. Eye wash nearby. Use only with Adequate ventilation or suitable respirator to avoid respiration.

FIRST AID

Wash contact area thoroughly with water. For eyes, get medical attention. If swallowed, give water or milk nad induce vomiting. Get medical attention. Inhalation; remove to fresh air. Give oxygen if breathing difficult, rrespirationmas necessary. Get medical assistance.

SPILLS & LEAKS

Contain spill. Remove sources of ignition. Take up spill in absorbent and sweep. Disposal to hazardous waste only.

DATE:
1/28/08

PREPARED BY:
JHN



BACK TO MAIN INDEX

Photovolt Instruments Inc.
sales@photovolt.com
PHONE: 1-952-848-2000
5498

email:

FAX 1-952-926-

© 2006 Photovolt Instruments Inc.

2/24/2011