

**CUANTIFICACIÓN DE MENTOL POR CROMATOGRAFÍA DE GASES
(GC) BASADO EN EL MÉTODO ESTÁNDAR INTERNO Y DIRIGIDO POR
UN ENFOQUE ANALÍTICO DE CALIDAD POR DISEÑO (AQbD)**

**Julian Mauricio Puentes Torres
Santiago Puentes Fonseca**

Universidad El Bosque

Facultad de Ciencias - Programa de Química Farmacéutica

Bogotá DC. – Octubre y 2023

**CUANTIFICACIÓN DE MENTOL POR CROMATOGRAFÍA DE GASES
(GC) BASADO EN EL MÉTODO ESTÁNDAR INTERNO Y DIRIGIDO POR
UN ENFOQUE ANALÍTICO DE CALIDAD POR DISEÑO (AQbD)**

**Julian Mauricio Puentes Torres
Santiago Puentes Fonseca**

**Trabajo de Investigación presentado como requisito para optar al título de:
Químico Farmacéutico**

Modalidad de Trabajo de Grado

**Director: Emerson Eliecer León Ávila
Cotutor: Ronald Andrés Jiménez Ávila
Línea de investigación
Química Aplicada**

**Universidad El Bosque
Facultad de Ciencias – Programa de Química Farmacéutica
Bogotá D.C. – Julio, 2023**

Hoja de verificación

Título:	Cuantificación de mentol por cromatografía de gases (GC) basado en el método estándar interno y dirigido por un enfoque analítico de calidad por diseño (AQbD)
Grupo de investigación:	Grupo de Investigación en Química Aplicada (INQA)
Línea de Investigación:	Química Aplicada
Institución (es) Participante (s):	Facultad de Ciencias - Química Farmacéutica
Tipo de Investigación:	Investigación Aplicada
Estudiante:	Julian Mauricio Puentes Torres Santiago Puentes Fonseca
Director:	Emerson Eliecer León Ávila
Codirector:	Ronald Andrés Jiménez Cruz

Dedicatoria o lema

Dedicamos este trabajo de mucho esfuerzo y dedicación:

A nuestras familias, quienes con su amor y cariño nos motivaron a seguir adelante, haciendo las cosas con amor y pasión.

A nuestros profesores, por con su buena disposición y paciencia nos brindaron todas las herramientas necesarias para lograr con éxito el desarrollo de este trabajo.

A la Universidad del Bosque, que nos brindaron todas los equipos e instalaciones necesarias para el desarrollo de este trabajo.

Y por último y no menos importante a nosotros mismos, porque siempre dimos lo mejor de nosotros mismos, trabajando con pasión y amor, permitiendo lograr obtener un excelente resultado final.

Agradecimientos

Un fuerte agradecimiento en primer lugar a nuestra familia, por dar todo de ellos para poder nosotros alcanzar nuestros sueños y depositar su confianza en nosotros. Así como acompañarnos con amor y cariño en el día a día del desarrollo de este trabajo el cual no siempre fue sencillo.

A nuestro tutor de tesis, Emerson Eliecer León Ávila, y cotutor Ronald Andrés Jiménez, quienes además de estar siempre abiertos a compartir todo su conocimiento y brindar todo tipo de colaboración, nos enseñaron a trabajar con disciplina, pasión y amor, enseñanza que será fundamental en nuestro crecimiento personal y profesional.

A la Universidad del Bosque, por poner a disposición sus instalaciones y equipos, los cuales nos permitieron realizar el desarrollo de este trabajo con las mejores herramientas. De igual forma, a los auxiliares de laboratorio por su buena disposición y acompañamiento durante todo el desarrollo del trabajo práctico.

Tabla de contenido

1. Introducción	14
2. Marco teórico	16
2.1. Mentol	16
2.2. Validación.....	16
2.3. Cromatografía de gases	18
2.4. Calidad por diseño	19
3. Planteamiento del problema	22
4. Pregunta de investigación.....	24
5. Objetivos.....	25
5.1. Objetivo general del anteproyecto	25
5.2. Objetivos específicos.....	25
6. Metodología	26
6.1. Materiales.....	26
6.2. Instrumento cromatográfico y condiciones.....	26
6.3. Definición del perfil objetivo analítico.....	26
6.4. Evaluación de riesgos	28
6.5. Soluciones de control de calidad para el DOE.....	29
6.6. Desarrollo y optimización del método con un diseño de experimentos (DOE)	29
6.7. Región operable del método (MODR)	29
6.8. Validación.....	30
6.8.1. Estándares de calibración.....	30
6.8.2. Idoneidad del sistema	30
6.8.3. Límites de detección y cuantificación	30
6.8.4. Linealidad	31
6.8.5. Exactitud.....	31
6.8.6. Precisión.....	31
7. Resultados y análisis de resultados	32
7.1. Evaluación de riesgos	32
7.2. Desarrollo y optimización de métodos: atributos críticos analíticos.....	36
7.2.1. Tiempos de retención (Tr).....	36
7.2.2. Platos teóricos (N)	37
7.2.3. Resolución (Res)	38
7.2.4. Factor de coleo (Tc).....	40

7.2.5. Factor de capacidad (k').....	41
7.3. Desarrollo y optimización de métodos (MODR)	42
7.4. Condiciones cromatográficas finales	44
7.5. Validación del método	45
7.5.1. Idoneidad del sistema	45
7.5.2. Límite de detección y cuantificación.....	45
7.5.3. Linealidad	46
7.5.4. Exactitud.....	47
7.5.5. Precisión.....	48
8. Conclusiones	50
9. Recomendaciones	51
10. Referencias bibliográficas	52
11. Anexos.....	55

Listado de tablas

		Pag
Tabla 1	Parámetros cromatográficos utilizados basados en una elución por gradiente	26
Tabla 2	Perfil objetivo analítico (ATP) establecido para el análisis cromatográfico del mentol	27
Tabla 3	Criterios de puntuación del análisis de modo de fallos y efectos para establecer los parámetros críticos del método y atributos críticos analíticos	28
Tabla 4	Análisis de modo de fallos y efectos (FMEA) para establecer los parámetros críticos del método (CMP)	33
Tabla 5	Análisis de modo de fallos y efectos para establecer los atributos críticos analíticos (CAA)	34
Tabla 6	Requisitos para el desempeño del método de cada CAA para obtener el MODR	43
Tabla 7	Condiciones cromatográficas finales de temperatura de horno y tasa de flujo obtenidas por una elución por gradiente	44
Tabla 8	Idoneidad del sistema del mentol y timol	45
Tabla 9	Datos estadísticos de la regresión lineal de la curva de calibración de la figura 11	46
Tabla 10	Resultados de la linealidad	46
Tabla 11	Datos para determinar el parámetro de exactitud	48
Tabla 12	Datos del diseño experimental de los parámetros críticos del método (temperatura de horno y tasa de flujo) para los tiempos de retención.	55
Tabla 13	Datos del diseño experimental de los parámetros críticos del método (temperatura de horno y tasa de flujo) para la resolución.	55
Tabla 14	Datos del diseño experimental de los parámetros críticos del método (temperatura de horno y tasa de flujo) para el factor de capacidad.	55
Tabla 15	Datos del diseño experimental de los parámetros críticos del método (temperatura de horno y tasa de flujo) para los platos teóricos.	56
Tabla 16	Datos del diseño experimental de los parámetros críticos del método (temperatura de horno y tasa de flujo) para el factor de coleo.	56

Listado de figuras

		Pag
Figura 1	Estructura del mentol	14
Figura 2	Diagrama de Ishikawa que resalta los parámetros que intervienen en el método	32
Figura 3	Gráfico de superficie de respuesta tridimensional para el efecto de la temperatura del horno y la tasa de flujo sobre el tiempo de retención realizado por el programa <i>Desing Expert</i> .	37
Figura 4	Gráfico de superficie de respuesta tridimensional para el efecto de la temperatura del horno y la tasa de flujo sobre los platos teóricos realizado por el programa <i>Desing Expert</i> .	38
Figura 5	Gráfico de superficie de respuesta tridimensional para el efecto de la temperatura del horno y la tasa de flujo sobre la resolución realizado por el programa <i>Desing Expert</i> .	39
Figura 6	Impacto de la temperatura en la separación de hidrocarburos	40
Figura 7	Gráfico de superficie de respuesta tridimensional para el efecto de la temperatura del horno y la tasa de flujo sobre el factor de coleo realizado por el programa <i>Desing Expert</i> .	41
Figura 8	Gráfico de superficie de respuesta tridimensional para el efecto de la temperatura del horno y la tasa de flujo sobre el factor de capacidad realizado por el programa <i>Desing Expert</i> .	42
Figura 9	Gráfico de superposición con las variables CMPs y CAAs donde se define el Región Operable del método (MODR) por el programa <i>Desing Expert</i>	43
Figura 10	Condiciones cromatográficas con una temperatura de 170 °C y una tasa de flujo de 0,9 mL/min.	44
Figura 11	Curva de calibración del mentol obtenida por estándar interno por el programa de <i>LabSolutions</i>	47
Figura 12	Cromatograma para evaluar el parámetro de precisión a una concentración de 356 ppm	48

Lista de símbolos y abreviaturas

APM = Variables Potenciales del Método (VPM)

AQbD = Calidad Analítica por Diseño

ATP = Perfil Objetivo Analítico

CAAs = Atributos Críticos Analíticos

CMPs = Parámetros Críticos del Método

DOE = Diseño de Experimentos

EMA = Agencia Europea de Medicamentos

FDA = Administración de Alimentos y Medicamentos

FMEA = Análisis de Modo de Fallos y Efectos

GC = Cromatografía de Gases

HPLC = Cromatografía Líquida de Alta eficiencia

ICH = Consejo internacional de armonización

k' = Factor de Capacidad

LC = Límite de Cuantificación

LD = Límite de Detección

MODR = Región Operable del Método

NPR = Número de Riesgo Probable

OFAT = Un Factor a la Vez

OOC = Resultados Fuera de Control

OOS = Resultados Fuera de Especificación

OOSC = Resultados Fuera de Control Estadístico

OOT = Resultados Fuera de Tendencia

QbD = Calidad por Diseño

REM = Matriz de Estimación de Riesgos

Res = Resolución

RSD = Desviación Estándar Relativa

Tc = Factor de Coleo

Tr = Tiempo de Retención

VPM = Atributos Potenciales del Método

Resumen

Se presenta un enfoque de Calidad Analítica por Diseño (AQbD) con la finalidad de establecer los parámetros para cuantificar e identificar el mentol utilizando un método analítico reproducible, empleando cromatografía de gases y estándar interno. Este enfoque tiene como objetivo demostrar los beneficios y mostrar las ventajas de aplicar las estrategias de AQbD al desarrollo de métodos analíticos en el mentol.

En el proceso de desarrollar los parámetros de AQbD, primero se estableció un perfil objetivo analítico (ATP). Posteriormente, se determinaron los atributos críticos analíticos (CAAs) (resolución, tiempo de retención, platos teóricos, factor de capacidad y factor de coleo) y los parámetros críticos del proceso (CMPs) (temperatura de horno y tasa de flujo). Estos fueron identificados por medio de una gestión de riesgos, utilizando herramientas como la matriz FMEA y el diagrama de Ishikawa ya que consideraban factores clave que afecta el rendimiento del método. El comportamiento de los CMPs frente a los CAAs se evaluó a través de un diseño experimental conocido como diseño factorial. Posteriormente se realizó un modelo estadístico usando los diagramas de superficie de respuesta, lo que condujo a la definición de la Región Operable del método (MODR) para encontrar las mejores condiciones con unas especificaciones definidas para cada CAA.

El método óptimo fue sometido a una validación de acuerdo con las recomendaciones regulatorias internacionales para garantizar una idoneidad del sistema. Además, se evaluó la linealidad, exactitud, precisión, límite de detección y cuantificación, lo que demostró que las condiciones eran apropiadas para el análisis del mentol, usando una técnica cromatográfica de gases con estándar interno.

Palabras clave: Mentol, timol, Calidad analítica por diseño (AQbD), cromatografía de gases, validación

Abstract

An Analytical Quality by Design (AQbD) approach is presented with the aim of defining parameters for quantifying and identifying menthol using a reproducible analytical method, employing gas chromatography and an internal standard. The objective of this approach is to demonstrate the benefits of applying AQbD strategies to the development of analytical methods for menthol.

In the process of developing AQbD parameters, an Analytical Target Profile (ATP) was first established. Subsequently, Critical Analytical Attributes (CAAs) (resolution, retention time, theoretical plates, capacity factor, and tailing factor) and Critical Process Parameters (CPPs) (oven temperature and flow rate) were determined. These were identified through a risk management approach, utilizing tools such as the Failure Modes and Effects Analysis (FMEA) and the Ishikawa diagram as they considered key factors affecting method performance. The behavior of CPPs concerning CAAs was assessed through a factorial design experimental approach. Subsequently, a statistical model was created using response surface diagrams, leading to the definition of the Method Operable Design Region (MODR) to find the best conditions with specified requirements for each CAA.

The optimal method underwent validation following international regulatory recommendations to ensure the suitability of the system. Furthermore, tests for linearity, accuracy, precision, limit of detection, and limit of quantification were conducted, demonstrating that the conditions were suitable for menthol analysis using a gas chromatographic technique with an internal standard.

Keywords: Menthol, Thymol, Analytical Quality by Design (AQbD), Gas chromatography, Validation

1. Introducción

El mentol es un alcohol tricíclico que se obtiene a partir de aceites volátiles presentes en algunas especies de menta y se encuentra de manera natural como levomentol y racementol (ver figura 1). Este compuesto se ha usado principalmente como un agente aromatizante y olfativo en variedad de productos como cigarrillos, licores, tabletas para la tos, enjuagues bucales, pastas de dientes y champús (Aronson, 2016). Además, el mentol se usa ampliamente en varias aplicaciones biológicas activas, actuando como antipruriginoso, analgésico, antiinflamatorio, antiséptico y anestésico (S. Kumar et al., 2023).

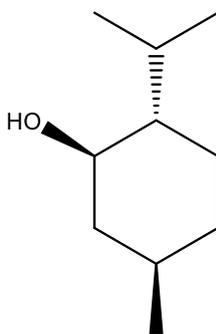


Figura 1. Estructura del mentol

Es bien conocido que, existen fallos en los métodos que son cada vez más comunes y más durante la transferencia de métodos en los departamentos de control de calidad. Además, existe un creciente interés por la necesidad de crear métodos analíticos adecuados, y la cromatografía se ha consolidado como el enfoque estándar para la cuantificación en la industria farmacéutica (Basso et al., 2021; Ramalingam & Jahnvi, 2019). El método GC empleado para la cuantificación del mentol se desarrolló utilizando un enfoque analítico de Calidad por Diseño (AQbD), con el objetivo principal de comprender profundamente el método.

El enfoque AQbD inicia con la definición de un perfil objetivo analítico (ATP), que establece unos Atributos Analíticos Críticos (CAAs) y unos Parámetros Críticos del Método (CMPs) los cuales tienen un impacto significativo en el rendimiento de la técnica (Basso et al., 2021). Para la identificación de estos parámetros, es necesario realizar una evaluación de riesgos utilizando distintas herramientas tales como un Análisis Modal de Falla y Efecto (FMEA) o un diagrama de Ishikawa. Posteriormente, se emplea un DoE que es una herramienta estadística de AQbD que explora las relaciones factor-respuesta (CMP-CAA) a través de variaciones simultáneas de las condiciones del CMPs. Esta metodología resulta eficaz en la gestión de los experimentos multifactoriales, donde se evalúan múltiples variables, como la temperatura de horno y la tasa de

flujo, y supera la estrategia de one-factor-at-time (OFAT) suele ser menos efectiva. En resumen, esta estrategia permite establecer una relación causa-efecto entre los CMPs y CAAs (Beg & Rahman, 2021). Ahora bien, se determina un espacio de diseño, en este caso, una región operable del método (MODR), el cual es un concepto científico usado en la industria farmacéutica para ayudar con el cumplimiento de la calidad deseada, y se define por la ICH Q8 como *“la combinación y compatibilidad multidimensional entre las variables de entrada y los parámetros que exhiben la calidad del método”* (Group & others, 2009). Para lograrlo, es necesario utilizar diferentes herramientas estadísticas como es el caso de diagramas de superficie de respuesta para modelar en 3D la relación de los CMPs y CAAs. Por último, se realiza una estrategia de control y definir un espacio de control y basados en la idoneidad del sistema cumpliendo con los requisitos de desempeño del método (Pradhan et al., 2021). Finalmente, se desarrolla una validación para garantizar que el método sea confiable, exacto y preciso.

Existen muchos métodos de cuantificación para el análisis del mentol como es el caso de HPLC, y GC. Sin embargo, tras la revisión realizada, hasta la fecha (2023) no se encontró ningún estudio aplique la metodología AQbD en el desarrollo de un método de cuantificación de mentol. Por consiguiente, el propósito principal de esta tesis fue determinar los parámetros de cuantificación e identificación del mentol basados en un enfoque QbD por medio de la aplicación de un método analítico reproducible, usando el método de cromatografía de gases (GC) y estándar interno, al mismo tiempo que se demuestran los beneficios que trae la aplicación de las estrategias de AQbD al desarrollo de métodos analíticos

2. Marco teórico

2.1. Mentol

El mentol es un alcohol monoterpénico cíclico que se encuentra en aceites esenciales de *Mentha canadensis* L. (menta de maíz) y *Mentha arvensis* var. *piperascens* (menta piperita). Principalmente, estas plantas son cultivadas en Japón, China, India y Brasil y son distinguidas por una inflorescencia en el ápice de estas flores (Kokkini et al., 2003). El mentol se encuentra en concentraciones bajas en algunas marcas de cigarrillos, proporcionando esa sensación frescura en el humo que es considerada agradable para los fumadores (Kamatou et al., 2013). Además, este compuesto se usa en diferentes medicamentos para aliviar los síntomas del asma y la rinitis, y forma parte de remedios para el resfriado común y ungüentos desarrollados para aplicarse en el pecho y las fosas nasales. Cuando se aplica sobre la piel, actúa como rubefaciente contrairritante, causando irritación y enrojecimiento de la piel debido al aumento flujo sanguíneo, lo que alivia el dolor de diversas afecciones que se generan en esas áreas (Aronson, 2016).

Los efectos del mentol son bien conocidos por su capacidad para crear una sensación refrescante cuando se consume, inhala y se aplica sobre la piel. Esto se debe a su capacidad de activar el canal catiónico del receptor sensible al frío (TRPM8) aumentando rápidamente el calcio intracelular, y movilizándolo para inducir una respuesta de frío en el sitio de aplicación (Kamatou et al., 2013). En la industria farmacéutica, este compuesto es de gran importancia ya que se utiliza en una gran variedad de áreas, incluyendo la cosmética o de medicamentos. Según Kumar (2021), los cristales de mentol se usan ampliamente en productos para la piel y de belleza debido a su aroma fresco a menta y su capacidad de promover el cuidado del cabello.

En los últimos años, que el mentol tiene la capacidad de formar biofilms, que son comunidades de microorganismos los cuales se adhieren a superficies y son capaces de inhibir ciertos tipos de bacterias. Estos microorganismos resistentes a los antifúngicos convencionales representan un problema de salud pública debido a la resistencia. Esto ha despertado el interés de la industria farmacéutica en la búsqueda de nuevos productos potenciales como antifúngicos, antimicrobianos, entre otros (Hajigholamreza et al., 2023).

2.2. Validación

El desarrollo de métodos analíticos es un componente esencial en el proceso más desarrollo y producción de productos farmacéuticos, teniendo un papel fundamental en el apoyo a otros procesos de desarrollo y producción en todas las etapas del ciclo de vida del producto

farmacéutico, donde se debe garantizar que el método sea confiable, exacto y preciso (Parr & Schmidt, 2018).

La validación tiene como propósito demostrar que el procedimiento analítico que se va a realizar es adecuado para el fin previsto (ICH Steering Committee, 2022). La validación analítica crea una prueba empírica de que un procedimiento, método o estudio produce resultados exactos y precisos de manera consistente cuando se aplica un enfoque que es probado y verdadero (McMillan, 2016). Para poder realizarla, es necesario tener en cuenta un conjunto de parámetros necesarios para el cumplimiento de los estándares adecuados de precisión y confiabilidad, entre estos están:

Exactitud: Según la USP (2018), este parámetro es la proximidad entre los datos resueltos obtenidos mediante el valor verdadero. En otras palabras, es el grado de proximidad del valor experimental obtenido a través de un proceso analítico que se acerca al valor real (McMillan, 2016).

Precisión: Hace referencia al grado de concordancia de los resultados de ensayos en múltiples muestreos. Usualmente se expresa como desviación estándar o coeficiente de variación (USP, 2018). Las guías de la Conferencia Internacional de Armonización (ICH Q2 R2) especifican tres niveles de precisión. La primera es la repetibilidad, que se realiza en breves intervalos de tiempo. La segunda es la precisión intermedia, que describe las diferencias en los resultados que tienen lugar dentro de un laboratorio en varios días, con varios analistas y con varios equipos. Por último, la reproducibilidad representa las variaciones en los resultados del ensayo entre laboratorios.

Límite de detección y cuantificación: El límite de detección indica la mínima cantidad de analito que es detectado en el proceso de obtención de una muestra, sin que sea cuantificada específicamente (Stauffer et al., 2008). En cambio, el límite de cuantificación es definida como la menor cantidad de analito dentro de una muestra que se puede cuantificar en un rango de exactitud y precisión (USP, 2018). En el campo farmacéutico, es muy importante estos parámetros analíticos debido a que se pueden determinar diversos compuestos en matrices complejas, como impurezas y productos de degradación (Vashist & Luong, 2018). Según la ICH Steering Committee, (2022) la estimación de la desviación estándar de la respuesta (σ) se puede calcular de tres formas:

- Basado en la desviación estándar del blanco
- Basado en la curva de calibración
- Basado en una evaluación visual

Linealidad: Se refiere a la relación entre la concentración y la medida de valoración. Teniendo en cuenta lo anterior, es su capacidad para obtener resultados de un ensayo que sean proporcionales (como una transformación matemática definida) a la concentración del analito dentro de un intervalo (USP 2018). Un ejemplo de este parámetro es realizar una curva de calibración, que relaciona la medida del analito y la respuesta del detector del equipo (McMillan, 2016).

2.3. Cromatografía de gases

Dentro del proceso de validación, se utilizan equipos analíticos como cromatografía de alta resolución (HPLC) cromatografía de gases (GC), y espectrofotómetros (UV-VIS o masas), para llevar a cabo valoraciones cuantitativas, garantizando así el cumplimiento de los estándares requeridos de precisión y confiabilidad. En el análisis del mentol, se han establecido múltiples técnicas utilizando HPLC, aunque este método no es especialmente sensible. Por esta razón, GC se ha convertido en la alternativa más comúnmente utilizada para analizar el mentol en alimentos y productos cosméticos, dado que es una técnica mucho más sensible para estudiar de esta sustancia (Abualhasan et al., 2017). Adicionalmente, GC permite un amplio rango de análisis, logrando la separación de compuestos con un peso molecular menor a 1000u y una temperatura máxima de trabajo de alrededor 400°C, dependiendo la columna utilizada. La única limitación existente en esta técnica está relacionada con la estabilidad térmica de la muestra.

La cromatografía de gases se describe como una técnica de separación física donde implica la distribución de la fase móvil (gas inerte) por medio de la fase estacionaria (que puede ser líquida o sólida). Se utiliza para separar mezclas de uno o más compuestos según sus propiedades de volatilidad, presión de vapor y polaridad de estos (Stauffer et al., 2008). El instrumento consta de componentes fundamentales como, una fuente de gas, un sistema de inyección, un horno y columna cromatográfica, un sistema de detección y un sistema de registro. El gas portador generalmente es un gas con capacidad muy baja o insignificante de adsorción, como es el hidrogeno, helio o nitrógeno. La elección del tipo del gas portador puede influir en las características de separación del sistema y tener un impacto en la sensibilidad de detección.

En el contexto de GC, existen principalmente dos tipos de columnas: columnas empaquetadas y capilares de varias dimensiones. Las primeras, son estructuras rígidas de metal o vidrio que contienen pequeñas partículas, generalmente recubiertas con una capa delgada de un polímero de alto peso molecular. Este tipo de columnas suele tener una longitud máxima de 3m debido a las altas presiones que se requieren para mantener los caudales del gas portador a velocidades óptimas para su funcionamiento. Por otro lado, tenemos las columnas capilares, las cuales son

básicamente un tubo de vidrio o sílice fundida de diámetro interno muy pequeño. Cada una de estas presenta ventajas y desventajas. Una ventaja de la columna empaquetada es que tienen una capacidad de muestra de 10 a 1000 veces mayor que las columnas capilares. Sin embargo, las capilares presentan hasta un 25-50% más de platos teóricos por metro que las empaquetadas (Forgács & Cserhádi, 2003).

Básicamente, un GC funciona al introducir una pequeña cantidad de muestra en el puerto de inyección la cual es arrastrada por una corriente de gas inerte a elevada temperatura, la cual es controlada por medio del horno, hacia la columna que contiene la fase estacionaria, la cual permitirá la separación de los componentes de la mezcla por medio de un mecanismo de partición (gas líquido), de adsorción (gas sólido), o en muchos casos por medio de una mezcla de ambos. Posteriormente los componentes separados emergerán de la columna a intervalos discretos para pasar al sistema de detección y por último hacia el sistema de registro. (Stauffer et al., 2008)

Con el fin de lograr una separación eficaz y fiable, la columna debe estar termostatazada por medio de una temperatura constante (separación isotérmica) o por medio de un programa de temperatura (separación por gradiente). Lo que convierte a la temperatura en uno de los parámetros más críticos en un análisis por cromatografía gaseosa. Logrando aumentar en gran medida la eficacia de la separación por medio de la utilización de un gradiente de temperatura (Stauffer et al., 2008).

2.4. Calidad por diseño

La calidad por diseño (QbD por sus siglas en inglés), es un enfoque que ha sido definido por la Conferencia Internacional de Armonización (ICH Q8). Este enfoque se caracteriza por ser sistemático y se inicia con la definición de objetivos específicos que orientan la comprensión de procesos y productos. Se apoya por una base científica sólida por una ciencia sólida y en la gestión de riesgos de calidad dentro de un ámbito farmacéutico como se menciona en la ICH Q8 (Roy, 2012).

Este concepto de Calidad por Diseño se introdujo en la industria farmacéutica con el propósito de fortalecer la robustez de los procesos de fabricación y garantizar el cumplimiento de la calidad del producto (Roy, 2012). En muchos países, especialmente en Europa a través de la agencia europea de medicamentos (EMA) la implementación de este enfoque QbD se ha vuelto una exigencia. Esto se debe principalmente a que las estrategias como "Six sigma", que se habían implementado para reducir los resultados fuera de especificación (OOS), resultados fuera de tendencia (OOT), resultados fuera de control (OOC) y resultados fuera del control estadístico

(OOSC), no estaban siendo lo suficientemente efectivos, mostrando todavía una gran cantidad de estos resultados no esperados (Torbeck, 2011).

Aunque inicialmente el enfoque QbD se desarrolló principalmente para su aplicación en el desarrollo de métodos de producción, en los últimos años, diversos autores han destacado la oportunidad de aplicar los beneficios de esta metodología al desarrollo de métodos analíticos (Schweitzer et al., 2010). Existen notables similitudes entre la metodología QbD enfocada a los procesos de fabricación farmacéuticos y aplicada al desarrollo de métodos analíticos.

Si comparamos un método analítico con un proceso farmacéutico, observamos que el objetivo de un producto farmacéutico busca que el producto final sea apto para su uso, lo que implica cumplir con los requisitos de seguridad y eficacia necesarios para el paciente. De manera análoga, un método analítico debe producir valores reportables que también sean apto para su uso, y estos resultados deben cumplir con requisitos mínimos de rendimiento (Verch et al., 2022).

Así, surge el concepto de AQbD (Analytical Quality By Design), que es una metodología que aplica el concepto de QbD al desarrollo de métodos analíticos. A través de una profunda comprensión del método que se está desarrollando, AQbD busca aumentar la flexibilidad regulatoria y prevenir riesgos relacionados a la calidad del método, como los resultados fuera de especificaciones (OOS) y fuera de tendencia (OOT) (Tome et al., 2019). El enfoque AQbD facilita la creación de un método robusto y rentable que puede ser utilizado durante todo el ciclo de vida del producto, permitiendo evitar la necesidad de una revalidación, aumentando la flexibilidad y facilidad a la hora de realizar la transferencia del método, ya que permite modificar los parámetros del método dentro del espacio de diseño definido llamado “región de diseño operable del método”, tal como lo describe la metodología AQbD (Elder & Borman, 2013).

El proceso de desarrollo de un método analítico usando la metodología AQbD comienza con la determinación de un perfil objetivo analítico (ATP), el cual es definido por PhRMA (The Pharmaceutical Research and Manufacturers of America) y EFPIA (The European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations), como “una declaración que define el propósito del método que se utiliza para impulsar actividades de selección, diseño y desarrollo del método”.

Las pautas de la ICH Q8 sobre el “espacio de diseño” en el desarrollo de productos, se traducen en AQbD en lo que se conoce como una región operable del método (MODR). Esta es el rango de operación de la variable de entrada del método crítico (CMP) que obtiene resultados que cumplan con los objetivos definidos en el ATP. Esto brinda flexibilidad en la configuración de los CMPs para alcanzar los criterios de rendimiento y respuesta del método esperados sin necesidad

de una revalidación ante las autoridades reguladoras (Peraman et al., 2015). MODR debe ser establecida en la fase de desarrollo del método y servirá como fuente de un método robusto, rentable y flexible.

En el contexto de la validación, el enfoque QbD tiene como propósito el desarrollo de técnicas analíticas que permitan comprender los objetivos predefinidos y controlar las variables críticas que impactan en los atributos críticos del proceso, logrando un rendimiento con alta robustez y una mejora continua (Patel et al., 2021). Una de las ventajas clave que presenta AQbD es la potencial flexibilidad regulatoria y la no necesidad de una revalidación u optimización, gracias a la implementación de un MODR, la cual es el rango de valores de los CMPs en el cual se obtiene un rendimiento del método aceptable y se la misma forma se cumple el ATP propuesto. Este MODR permite facilitar la transferencia del método y aumentar la flexibilidad regulatoria permitiendo cambios

En resumen, los métodos analíticos desarrollados con el enfoque AQbD, han demostrado ser altamente robustos, más rápidos en su ejecución y capaces de detectar un mayor número de analitos en comparación con los métodos desarrollados con el enfoque común de un factor a la vez (OFAT) (Tome et al., 2019). El enfoque OFAT comúnmente usado, no identifica los parámetros críticos del método, lo que implica que es necesario ajustar cada parámetro cromatográfico en cada experimento sucesivo hasta lograr la resolución esperada, lo que aumenta significativamente el número de experimentos ya que existen una gran cantidad de parámetros que pueden afectar el desarrollo y la calidad del método, y a su vez incrementa el tiempo y costo del análisis. Adicionalmente, en el enfoque OFAT, identifica ni evalúa las interacciones entre parámetros, lo que puede conducir a un método no optimizado con una pobre comprensión de los efectos de interacción multiparamétrica y con un rendimiento poco robusto del método (Peraman et al., 2015).

3. Planteamiento del problema

La validación de métodos analíticos es un requisito básico para garantizar la calidad y confianza de los resultados analítico, y se define como “la recolección y evaluación de datos, desde la etapa de diseño hasta la producción y que consolida con evidencia científica que el proceso es capaz de proporcionar datos fiables” (Tazón, 2008). Esta validación requiere la determinación de diferentes parámetros como: precisión, exactitud, especificidad, límite de detección y cuantificación, linealidad, y robustez (ICH Steering Committee, 2022). Teniendo en cuenta lo anterior, es necesario desarrollar una metodología para la cuantificación del mentol, debido a sus usos dentro de la industria farmacéutica como en el campo de medicamentos, cosméticos y fitoterapéuticos y la importancia de validar la materia prima cuando llega a la industria.

En los últimos años, se han observado un aumento en las fallas del método analítico, especialmente durante la etapa de transferencia del método. Adicionalmente, en relación con la cromatografía, debido a los complejos parámetros involucrados en la fase de desarrollo del método, la poca comprensión del método, entre otros factores, siempre se ha recomendado y exigido por parte de los entes reguladores un protocolo de revalidación u optimización del método (Castellanos et al., 2021).

Esto se debe principalmente a que la estrategia tradicionalmente usada para el desarrollo de métodos analíticos ha sido OFAT, donde un parámetro se optimiza por separado para obtener la respuesta deseada, mientras que los otros permanecen constantes. En otras palabras, no hay una comprensión de los efectos de interacción entre múltiples parámetros, lo que resulta en un método con un margen estrecho y poco robusto. Por esta razón, los métodos desarrollados mediante esta metodología tienen un alto riesgo de fallo y a menudo requieren un protocolo de revalidación después de la transferencia del método o el desarrollo de métodos alternativos, lo que finalmente aumenta los costos del método (Peraman et al., 2015).

Esta metodología se enfoca en la comprensión profunda del método durante su etapa de desarrollo, lo que implica una evaluación de riesgos desde la elección de la técnica hasta la determinación de parámetros críticos y resultados esperados. Esto permite, a lo largo de la investigación, identificar los modos de fallo y establecer un espacio de diseño lo que conlleva a una Región Operable del Método (MODR) previo a la etapa de desarrollo del método. El objetivo es reducir el tiempo y los costos que normalmente se requieren en enfoques convencional (fallo y error) (Roy, 2012).

Por esta razón, la metodología AQbD, se ha convertido en la estrategia preferida y recomendada por las autoridades regulatorias para el desarrollo de métodos analíticos, que incluye mayor flexibilidad, reducción de resultados OOS, OOT, OOC y OOSC, una mayor robustez y reducción de costos (Peraman et al., 2015). En consecuencia, en los últimos años, la metodología AQbD ha ganado cada vez más importancia.

4. Pregunta de investigación

El mentol ha sido un compuesto de interés en el sector farmacéutico por sus numerosas propiedades farmacológicas. Aunque, se han empleado diversas técnicas y equipos como HPLC y GC para la cuantificación de este compuesto y siguiendo la estrategia OFAT, no se ha usado una metodología AQbD para el análisis cuantitativo de este compuesto. Por lo tanto, surge la siguiente interrogante: ¿Cuáles son los mejores parámetros cromatográficos para desarrollar un método óptimo, basados en una técnica AQbD para la cuantificación de mentol por medio de cromatografía de gases?

5. Objetivos

5.1. Objetivo general del anteproyecto

Determinar los parámetros de cuantificación e identificación del mentol basados en un enfoque AQBd por medio de la aplicación de un método analítico reproducible, usando el método de cromatografía de gases (GC) y estándar interno, permitiendo demostrar los beneficios de aplicar las estrategias de AQBd al desarrollo de métodos analíticos.

5.2. Objetivos específicos

1. Identificar los atributos analíticos críticos y los parámetros críticos del método que intervienen en la cuantificación del mentol para seleccionar las condiciones cromatográficas óptimas por el método de GC, basados en una gestión de riesgos.
2. Desarrollar un diseño de experimentos para evaluar las mejores condiciones cromatográficas y realizar una optimización basados en la región de diseño operable del método, utilizando unos diagramas de superficie de respuesta y gráfico de superposición como herramienta estadística.
3. Determinar los parámetros estadísticos que conlleva el proceso de validación analítica del mentol por el método cromatográfico mediante la aplicación de condiciones óptimas reproducibles bajo las directrices de la ICH Q2 (R2) y las recomendaciones de la FDA.

6. Metodología

6.1. Materiales

El mentol estándar analítico (pureza 99%) se adquirió de Merck-Supelco y el timol de grado analítico (pureza > 98,5) se obtuvo de Sigma-Aldrich. El cloroformo (pureza $\geq 99.9\%$) para uso de HPLC y GC se adquirió por Sigma-Aldrich.

6.2. Instrumento cromatográfico y condiciones

La separación cromatográfica se realizó con una columna SH-I-5Sil MS (composición de fase cruzada de silarileno 1,4-bis(dimetilsiloxi)fenileno y dimetil polisiloxano), con un espesor de película de 0,25 μm y una longitud de 30 m. El análisis cromatográfico se realizó con un cromatógrafo de gases marca Thermo Scientific Trace 1310 GC equipado con un auto inyector AOC-20i Plus y el detector de ionización a la llama FID. Los parámetros que se usaron en el GC se resumen en la tabla 1, a excepción de la temperatura del horno y la tasa de flujo, los cuales se detallarán más adelante.

Tabla 1. Parámetros cromatográficos utilizados.

Temperatura del detector	250 °C
Temperatura del inyector	280 °C
Split ratio	50
Volumen de inyección	10 μL

Para cumplir con el objetivo específico 1 es necesario identificar los atributos analíticos críticos y los parámetros críticos del método. Esto permitirá desarrollar del método por medio de la estrategia AQbD, que se puede ver a continuación:

6.3. Definición del perfil objetivo analítico

El perfil objetivo analítico (ATP) fue el eje fundamental de la metodología AQbD, ya que ayudó a definir qué se va a analizar y a qué nivel es necesario hacerlo (Schweitzer et al., 2010). Esto permitió diseñar y dirigir el método de tal forma que permita el cumplimiento de este ATP.

El ATP incluyó algunos elementos como, analito, tipo de muestra, técnica analítica, instrumento analítico, requisitos de calidad del método, y atributos analíticos del método. Todos estos componentes fueron considerados a la hora de la creación del ATP, como se muestra en la tabla

2. Es importante destacar que, la elección de los CAAs se basó en la premisa de cumplir estos atributos, que garantizarán el desarrollo de un método exacto y preciso.

Tabla 2. Perfil objetivo analítico (ATP) establecido para el análisis cromatográfico del mentol

Elemento ATP	Objetivo	Justificación
Analito	Mentol	Analito de reciente interés farmacéutico y sin antecedentes de una aplicación de la metodología AQbD para su cuantificación.
Muestra	Sólida	El analito debido a sus características fisicoquímicas es sólido a temperatura ambiente. Por ello existe la necesidad de solubilizar completamente antes de realizar el análisis con el fin de lograr volatilizar toda la muestra.
Técnica analítica	Cromatografía	Técnica analítica con capacidad de cuantificación, separación, purificación e identificación, de una inmensa gama de analitos por medio de un fundamento teórico simple.
Instrumento	GC-FID	La cromatografía gaseosa es una técnica que se caracteriza por su alta rapidez, precisión y sensibilidad para la separación y análisis de compuestos químicos. El detector FID tiene un amplio rango dinámico, lo que permite cuantificar desde trazas hasta altas concentraciones. Además de ser un detector estable y robusto que proporciona resultados consistentes y reproducibles.

Método	Específico, exacto, preciso, lineal, reproducible, rentable y simple	El método debe ser simple y económico, y debe cumplir con los parámetros de validación basados en las recomendaciones de la FDA e ICH (ICH Steering Committee, 2022; Swartz & Krull, 1998).
CAAs	Factor de coleo, platos teóricos, tiempos de retención, resolución del pico (área de pico), factor de capacidad	Estos deben cumplir criterios de calidad formalmente establecidos con el fin de garantizar una cuantificación precisa y exacta (Basso et al., 2021).

6.4. Evaluación de riesgos

Inicialmente, se realizó una extensa búsqueda bibliográfica relacionada con la técnica y el método, en este caso cromatografía de gases y cuantificación de mentol, con el fin de identificar las posibles variables del método y reconocer todas las variables que se ven involucradas en el desarrollo de este. Posteriormente, se realizó un análisis de riesgo por medio de un diagrama de Ishikawa o diagrama de causa y efecto. Esta herramienta permite organizar una gran cantidad de datos para identificar las posibles causas de un problema en específico.

Una vez que se identificaron y analizaron los parámetros del método que afectan el proceso, se llevó a cabo una evaluación de estos parámetros utilizando un Análisis de Modos de Fallos y Efectos (FMEA por sus siglas en inglés) o una matriz de estimación de riesgos (REM) (Pillay & Wang, 2003). Estas herramientas permitieron determinar aquellos parámetros críticos del método que fueron clasificados y evaluados por medio de los criterios de puntuación descritos en la tabla 3. A través de esta evaluación, se buscó seleccionar esos CMPs y CAAs en función del número de riesgo probable (NPR), el cual se calculó considerando de los índices de severidad (S), ocurrencia (O) y detectabilidad (D). Aquellos parámetros con un NPR > 100, son considerados como parámetros críticos (Pillay & Wang, 2003).

Tabla 3. Criterios de puntuación del análisis de modo de fallos y efectos para establecer los parámetros críticos del método y atributos críticos analíticos.

Puntuación S y O	Criterio
1	Riesgo insignificante

2-3	Efecto menor que se corrige fácilmente
4-5	Efecto moderadamente severo que necesita atención
6-7	Efecto muy grave que necesita atención especial
Puntuación D	Criterio
1	Riesgo insignificante y fácilmente detectable
2-3	Detectable, con un efecto menor que se corrige fácilmente
4-5	No es fácilmente detectable, con un riesgo moderado que necesita atención
6-7	Difícil de detectar, con un riesgo muy grave que necesita atención especial

S: Severidad; O: Ocurrencia; D: Detectabilidad

Para desarrollar el objetivo específico 2, se estableció un diseño de experimentos y una región operable del método para evaluar las mejores condiciones cromatográficas como se ve a continuación:

6.5. Soluciones de control de calidad para el DOE

Las soluciones que se manejaron en el apartado de AQbD se desarrollaron de la siguiente manera: se tomaron 24,0 mg en un volumen de 10,0 mL de cloroformo para el estándar de mentol. En el caso del timol se tomaron 38,0 mg y se disolvieron en los mismos 10,0 mL de cloroformo para crear la solución correspondiente. Esta solución se transfirió al vial destinado para llevar a cabo el diseño de experimentos.

6.6. Desarrollo y optimización del método con un diseño de experimentos (DOE)

Con la ayuda de AQbD, los ensayos del método cromatográfico se desarrollaron con un diseño factorial completo. Este diseño se basa en un estudio para determinar el efecto que tienen las variables independientes o de entrada, sobre las variables dependientes o de salida. Para este caso, se tomaron las CMPs para este el estudio, con seis temperaturas (85, 95, 115, 130, 170, 200 °C) y 7 tasas de flujo (0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0 mL/min) y así evaluar la respuesta que se presentan en los CAAs (factor de coe, platos teóricos, tiempos de retención, resolución y factor de capacidad).

6.7. Región operable del método (MODR)

Una vez obtenidos los datos del DOE, se realizó la metodología de superficie de respuesta y un gráfico de superposición con los componentes CMPs y CAAs para optimizar los ensayos propuestos. Para ello, se empleó el programa de *Desing Expert 22.0.6* para desarrollar el modelo

estadístico de la investigación y así determinar las mejores condiciones cromatográficas y su espacio de diseño.

6.8. Validación

La validación del método cromatográfico optimizado se realizó de acuerdo con la guía ICH Steering Committee, 2022 y recomendaciones de la FDA, teniendo en cuenta la idoneidad del sistema, límites de detección y cuantificación, linealidad, exactitud y precisión (Swartz & Krull, 1998). Este apartado da solución al objetivo específico 3.

6.8.1. Estándares de calibración

Las soluciones madre del mentol como analito (5480 ppm) y el timol estándar interno (1040 ppm) se prepararon disolviéndolos con cloroformo y se utilizaron para llevar a cabo las diluciones en los siguientes pasos del proceso.

6.8.2. Idoneidad del sistema

Los parámetros para la idoneidad del sistema del método se determinaron inyectando cinco veces una solución con una concentración estándar de 356 ppm de mentol y 520 ppm de timol, con el fin de obtener unos resultados reproducibles. Para los cromatogramas obtenidos, la asimetría del pico (factor de coe) debe ser < 2,0; la resolución $\geq 1,5$ entre las señales de los dos patrones; los platos teóricos deben ser ≥ 2000 ; el factor de capacidad > 2,0 y el RSD sea de < 5,0 % (Swartz & Krull, 1998).

6.8.3. Límites de detección y cuantificación

Los límites de detección (LD) y de cuantificación (LC) se establecieron basados en la desviación estándar de una respuesta lineal y una pendiente a partir de la curva de calibración que se determina la linealidad por el método de estándar interno. Ahora bien, LD y LC se calcularon a partir de las ecuaciones 1 y 2, donde σ hace referencia al error típico y la S a la pendiente hallada en la curva de calibración (ICH Steering Committee, 2022).

$$LD = \frac{3,3\sigma}{S} \times [\text{patron interno}]$$

Ecuación 1. Cálculo para determinar el límite de detección

$$LC = \frac{10\sigma}{S} \times [\text{patron interno}]$$

Ecuación 2. Cálculo para determinar el límite de cuantificación

6.8.4. Linealidad

Para determinar este parámetro, se prepararon nueve patrones estándares de calibración (55, 110, 192, 356, 740, 986, 1507, 2000, 2740 ppm) mediante diluciones secuenciales de la solución madre de mentol (10, 20, 35, 65, 90, 135, 180, 275, 365, 500 μL) y a cada una de estas se le agregaron 500 μL de la solución madre de timol, para desarrollarlo por el método de estándar interno. Las curvas de calibración se realizaron mediante regresión lineal entre relación del área del pico del mentol dividida por el área del pico de timol, frente a la relación de la concentración de mentol dividida por la concentración del timol. Adicionalmente, para evaluar esta linealidad se analizaron 2 muestras por cada nivel de concentración. De acuerdo con las recomendaciones, se escogió un Coeficiente de correlación $R^2 > 0,999$ (Swartz & Krull, 1998).

6.8.5. Exactitud

La exactitud se realizó con base a la creación de una muestra problema con una concentración conocida de mentol (valor verdadero). Se tomó una alícuota de 300 μL de la solución madre de mentol, y se llevó a un volumen final de 1000 μL con 500 μL del estándar interno y 200 μL de cloroformo, para obtener una concentración de 1644 ppm. Todo este proceso se realizó por triplicado. Posteriormente se determinó el porcentaje de exactitud relativa que debe ser $< 5,0 \%$ para el valor experimental (Swartz & Krull, 1998).

6.8.6. Precisión

La precisión se preparó y analizó con cinco muestras de una solución con una concentración estándar de 356 ppm de mentol y 520 ppm de timol. Para evaluar el grado de dispersión entre estas cinco determinaciones de la misma muestra, se recomienda que el RSD sea de $< 5,0 \%$ (Swartz & Krull, 1998).

7. Resultados y análisis de resultados

7.1. Evaluación de riesgos

La gestión del riesgo de calidad (definida en ICH Q9), es un proceso esencial de la metodología AQBd. Este proceso implica en la identificación, evaluación y control de los riesgos que podrían afectar la calidad del método a lo largo de su ciclo de vida (Ramalinagm et al., 2021).

La evaluación de riesgos debe seguir las pautas en las directrices ICH Q9, donde determinan que la evaluación de riesgos es un proceso sistemático para la evaluación, control, comunicación y revisión de los riesgos para la calidad a lo largo del ciclo de vida del producto (Peraman et al., 2015). De acuerdo con la guía ICH Q9, la evaluación del riesgo puede ser realizada en 3 pasos: identificación del riesgo, análisis de riesgo y evaluación del riesgo.

La identificación del riesgo tiene como objetivo detectar todas las Variables Potenciales del Método (VPM) y Atributos Potenciales del Método (APM). Estos deben abarcar todos los aspectos relacionados con el analista, materiales, instrumento, método y ambiente, que pueden influir directa o indirectamente en la calidad del método (Bhutani et al., 2014). Es importante destacar que la revisión bibliográfica previa, el profundo conocimiento del proceso y la experiencia del investigador desempeñan un papel fundamental en la identificación de los CMPs.

Teniendo en cuenta lo anterior, se realizó un diagrama de Ishikawa a partir de conocimientos previos y una revisión teórica de la técnica. Esta herramienta permitió identificar todos aquellos factores que pueden afectar directa o indirectamente el rendimiento del método, teniendo en cuenta; investigador, materiales, métodos, medición, ambiente y equipos. Como se muestra en la figura 2 este diagrama arrojó un total de 24 variables que potencialmente pueden afectar el rendimiento del método.

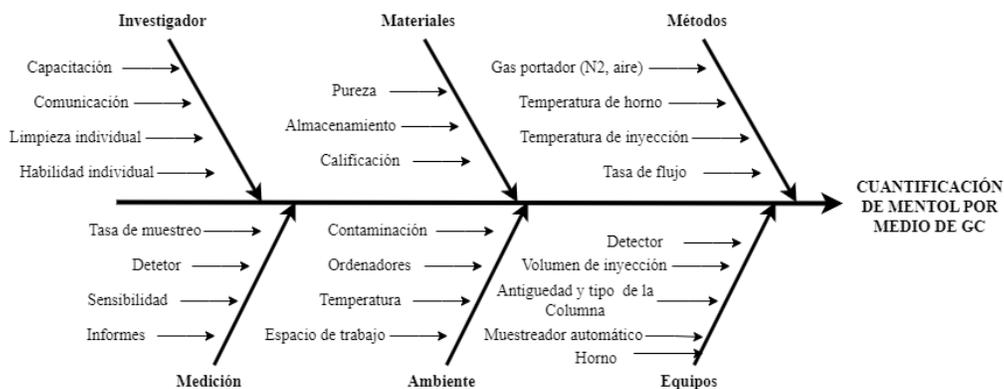


Figura 2. Diagrama de Ishikawa que resalta los parámetros que intervienen en el método.

A partir de este diagrama, se seleccionaron los parámetros relacionados con el método y el equipo, ya que son aquellos que pueden ser controlados más directamente en este estudio. Esto no solo permitió identificar cuál de estas variables son críticas, sino también priorizarlos según su gravedad, ocurrencia y detectabilidad por medio de la matriz FMEA, como se muestra en la tabla 4. Cabe resaltar que, esta herramienta consta de dos etapas, la primera se enfoca en identificar los posibles modos de fallo, sus efectos y posibles causas. En la segunda etapa, se busca clasificar estos modos de fallo según su índice de severidad (S) el cual es la gravedad de la consecuencia de esta falla, su ocurrencia (O) que corresponde a la probabilidad o frecuencia de ocurrencia de falla y según detectabilidad (D) asociada a la probabilidad de que la falla sea detectada antes de que tenga un impacto en el proceso, lo que nos permitió reducir el riesgo de una posible falla determinando una estrategia preventiva (Satamatis, 2003).

En la tabla 4, se puede evidenciar que la tasa de flujo y la temperatura de horno fueron los parámetros del método con una puntuación NPR más alta, y en consecuencia fueron seleccionados como aquellos parámetros críticos del método. Es importante destacar que, la puntuación asignada de S, O y D para cada parámetro viene acompañada de una revisión bibliográfica, que se documenta en los capítulos de los libros de Ramalingam & Jahnvi. (2019) y Pradhan et al. (2021). Esta revisión ayudó a consolidar el conocimiento acerca de la técnica GC y, como resultado, a asignar correctamente cada puntuación. Además, se consideró que las variables restantes no son críticas, ya que pueden resolverse fácilmente o no afectan significativamente el rendimiento del método ni el cumplimiento del ATP. Sin embargo, para el caso de la temperatura del detector y de inyección se modificaron durante el análisis y se rectificó que estas variables no son críticas.

Tabla 4. Análisis de modo de fallos y efectos (FMEA) para establecer los parámetros críticos del método (CMP)

Modo de fallo	Efecto	S	O	D	NPR	Estrategia
Tasa de flujo	Deficientes tiempos de retención y resolución de picos	6	5	5	150	Determinar un rango en el cual se garantice el cumplimiento del ATP, mediante MSR (metodología de superficie de respuesta)

Temperatura del horno	Deficientes tiempos de retención y resolución de picos	7	6	4	168	Determinar un rango en el cual se garantice el cumplimiento del ATP, mediante MSR (metodología de superficie de respuesta)
Temperatura de inyección	No volatilización o degradación de analitos	3	2	3	18	Bajo riesgo
Detector	Baja sensibilidad	4	2	1	8	Bajo riesgo
Gas portador	Variación de retención	6	3	4	72	Verificar que el gas disponible sea compatible con el analito
Tipo de columna	Variación de retención	5	5	3	75	Verificar que la columna disponible sea compatible con el analito
Volumen de inyección	Sensibilidad	3	4	3	36	Bajo riesgo
Antigüedad de columna	Baja selectividad	6	2	3	36	Bajo riesgo

S: Severidad; O: Ocurrencia; D: Detectabilidad

Se determinaron a la temperatura del horno y la tasa de flujo del gas de arrastre como los parámetros críticos del método (CMPs), teniendo en cuenta que lo que busca este método es el cumplimiento del ATP propuesto, que se especifica que se busca desarrollar un método sencillo y económico, lo que conlleva obtener tiempos de retención bajos con resolución de picos aceptable.

En la tabla 5 se puede observar la matriz FMEA que se elaboró con el fin de identificar cuáles son los atributos analíticos críticos. En esta instancia, se encontraron que fueron cinco de estos atributos, debido a que presentaban una puntuación de NPR mayor a 100. Teniendo en cuenta lo anterior, para cada una de estas CAAs se van a determinar los valores de CMPs ideales por medio de un diseño de experimentos.

Tabla 5. Análisis de modo de fallos y efectos para establecer los atributos críticos analíticos (CAA)

Modo de fallo	Efecto	S	O	D	NPR	Estrategia
Factor de coleo	Aumenta medida de asimetría del pico	6	6	3	108	Determinar el rango de valores para los CMPs, en los cuales este atributo cumpla los requisitos de calidad
Platos teóricos	Disminuye eficiencia de la columna	7	6	3	126	Determinar el rango de valores para los CMPs, en los cuales este atributo cumpla los requisitos de calidad
Tiempo de retención	Tiempos y costos de análisis altos	7	6	3	126	Determinar el rango de valores para los CMPs, en los cuales este atributo cumpla los requisitos de calidad
Resolución del pico (Área del pico)	Baja eficiencia de la separación entre los picos	7	7	3	147	Determinar el rango de valores para los CMPs, en los cuales este atributo cumpla los requisitos de calidad
Factor de capacidad	Bajo grado de retención del analito en la columna	6	6	4	144	Determinar el rango de valores para los CMPs, en los cuales este atributo cumpla los requisitos de calidad
Factor de selectividad	Bajo grado de separación entre los dos picos	3	4	3	36	Bajo riesgo

S: Severidad; O: Ocurrencia; D: Detectabilidad

7.2. Desarrollo y optimización de métodos: atributos críticos analíticos

Un gráfico de superficie de respuesta es una técnica avanzada del DOE que ayuda a entender mejor un método y optimizar la respuesta. A continuación, se presentan estos gráficos para cada CAAs que se detallan en la tabla 5, con el objetivo de tener una mayor comprensión del método y obtener las mejores condiciones cromatográficas para este. Adicionalmente, los datos que se utilizaron para la construcción de los gráficos de superficie de respuesta se presentan en las tablas 12, 13, 14, 15 y 16 respectivamente.

7.2.1. Tiempos de retención (Tr)

Este tiempo de retención está principalmente influenciado por dos parámetros: la temperatura y la tasa de flujo. La temperatura afecta la volatilidad del analito y por ende sus interacciones con la fase estacionaria. A medida que aumenta la temperatura, la volatilidad del analito aumenta, lo que reduce las interacciones entre el mentol y la fase estacionaria, dando como resultado la disminución de los tiempos de retención. Este efecto es beneficioso para cumplir el ATP. Por otro lado, la tasa de flujo también impacta directamente a los Tr, ya que a un mayor flujo hace que el mentol se desplace a través de la columna a mayor velocidad, lo que reduce su interacción con la misma y, por lo tanto, disminuye también los tiempos de retención (Zeeuw, J., 2009)

En el diagrama de superficie presentado en la figura 3 muestra que los menores Tr se encuentran en las condiciones de temperaturas entre 200 y 170 °C y a una tasa de flujo entre 1,0 y 0,9 mL/min. Esto se debe a que la temperatura afecta la fuerza de retención del mentol en la fase estacionaria, mientras que la tasa de flujo afecta la velocidad de este analito que se mueve en la columna. Por lo tanto, estos valores se establecieron como los más adecuados para satisfacer esta variable (Waters, 2020). Adicionalmente, un tiempo de retención corto mejora la precisión y exactitud en el proceso de cuantificación, ya que reduce el tiempo de análisis y, por lo tanto, probabilidad de errores.

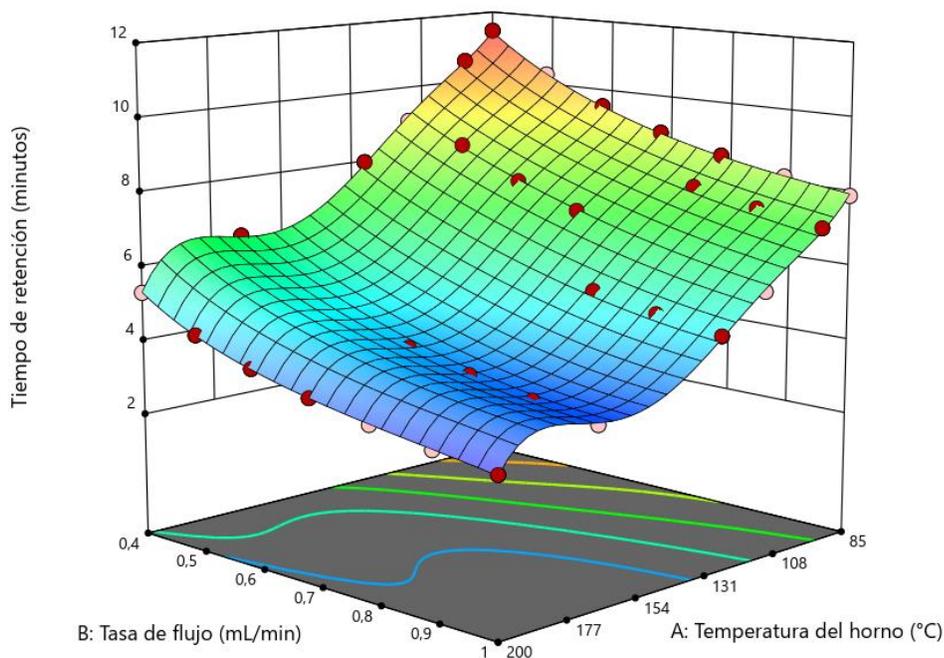


Figura 3. Gráfico de superficie de respuesta tridimensional para el efecto de la temperatura del horno y la tasa de flujo sobre el tiempo de retención realizado por el programa *Desing Expert*.

7.2.2. Platos teóricos (N)

Los platos teóricos nos indica cuantas etapas de equilibrio teóricas ocurren durante la separación, por lo que entre más platos teóricos tenga una columna, mejor será su capacidad de separación, entonces, los platos teóricos hacen referencia a la medida de eficiencia y la capacidad de separación de la columna (Ho et al., 2022). Todos los valores de N obtenidos en el DOE superaron el mínimo requerido por las pautas regulatorias ($N > 2000$). Como se puede observar en la figura 4, todos los valores de N estuvieron por encima de 31643, lo que indica que todas las condiciones fueron consideradas significativas en cuanto a este parámetro.

Un valor alto de platos teóricos indica que la columna utilizada (SH-I-5Sil MS) tiene una gran eficiencia y capacidad de separación. Esto se debe a que la estructura del relleno con poros de tamaño uniforme permite que el mentol se difunda de forma eficiente a través de la fase estacionaria, lo que conduce a una mayor eficiencia de los platos teóricos y en una mejor resolución.

Es importante señalar que, el método AQbD contribuyó en obtener los valores de N altos, debido a la selección de los parámetros críticos (temperatura de horno y tasa de flujo del gas de arrastre)

que afectaron el rendimiento fueron monitoreados y controlados continuamente durante su ejecución, lo cual permitió obtener buenos resultados durante el proceso.

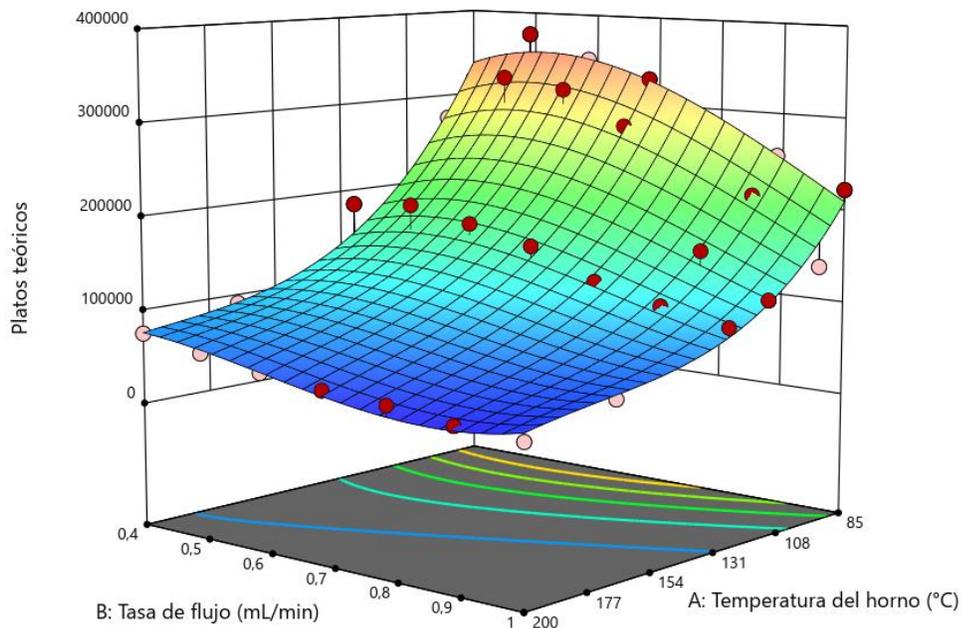


Figura 4. Gráfico de superficie de respuesta tridimensional para el efecto de la temperatura del horno y la tasa de flujo sobre los platos teóricos realizado por el programa *Desing Expert*.

7.2.3. Resolución (*Res*)

La resolución se define como una medida de separación entre dos picos cromatográficos en términos de su distancia y ancho (Ho et al., 2022). Un valor de este parámetro igual a cero indica que los picos están superpuestos y no separados en absoluto, mientras que un valor de 2,0 es lo mínimo para una buena separación (Basso et al., 2021). Como se puede apreciar en la figura 5, los valores óptimos de resolución se obtienen a una temperatura de 200 y 170 °C independientemente de la tasa de flujo. Por lo tanto, temperaturas por debajo de estas no se obtendrá la resolución y tiempos de retención deseados para este método.

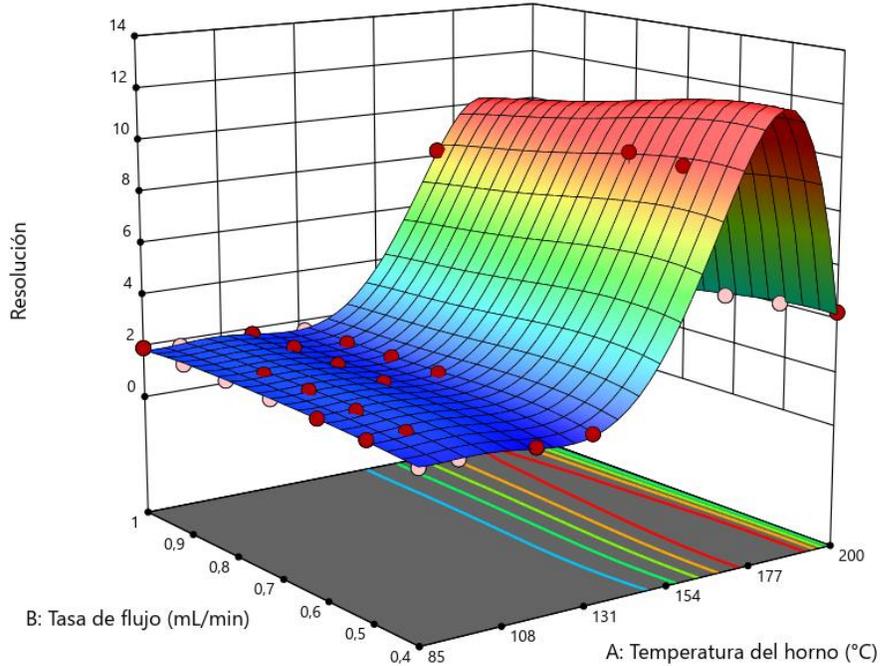


Figura 5. Gráfico de superficie de respuesta tridimensional para el efecto de la temperatura del horno y la tasa de flujo sobre la resolución realizado por el programa Desing Expert.

La temperatura tiene un impacto significativo en este CAA, ya que a medida que la temperatura disminuye, la resolución tiende a aumentar de forma casi lineal (Wong et al., 2015). Esto indica que la temperatura y la resolución tienen una relación inversamente proporcional como se evidencia en el cromatograma que se muestra en la figura 6. Sin embargo, es importante tener en cuenta que la resolución es un factor de separación entre picos, por lo que es especialmente crítico para métodos de separación de una gran cantidad de analitos. En el caso de este método, al tratarse de un análisis solo del mentol y el timol la temperatura no disminuirá significativamente la resolución de picos (Wong et al., 2015).

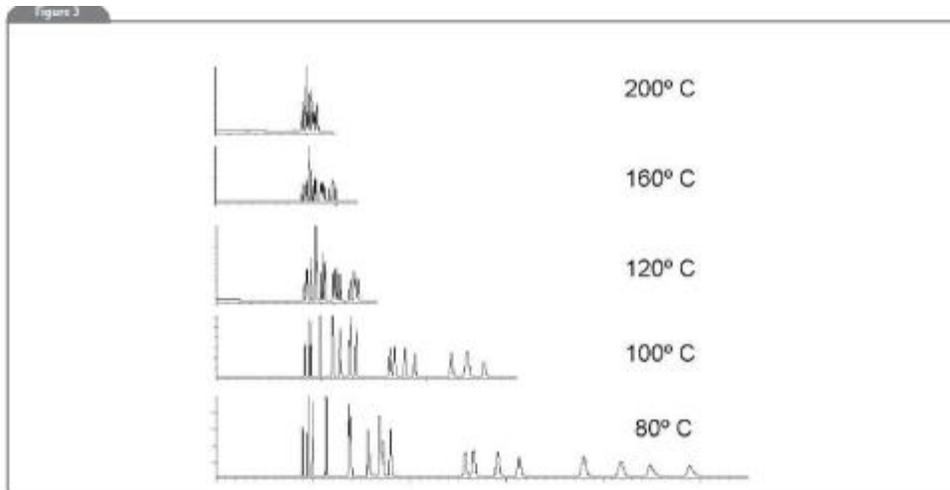


Figura 6. Impacto de la temperatura en la separación de hidrocarburos. Tomado de Wong et al., (2015)

7.2.4. Factor de coileo (T_c)

Es importante destacar que todos los picos en los ensayos del DOE tienden a una simetría notablemente alta como se muestra en la figura 7. Esto indica, por un lado, que la columna SH-I-5Sil MS se encuentra en buen estado y, por otro lado, que no se observa una sobrecarga ni interacciones fuertes del mentol a la columna (Ornaf & Dong, 2005). se encontraron por debajo del valor 1, cumpliendo así con las recomendaciones dichas por la FDA.

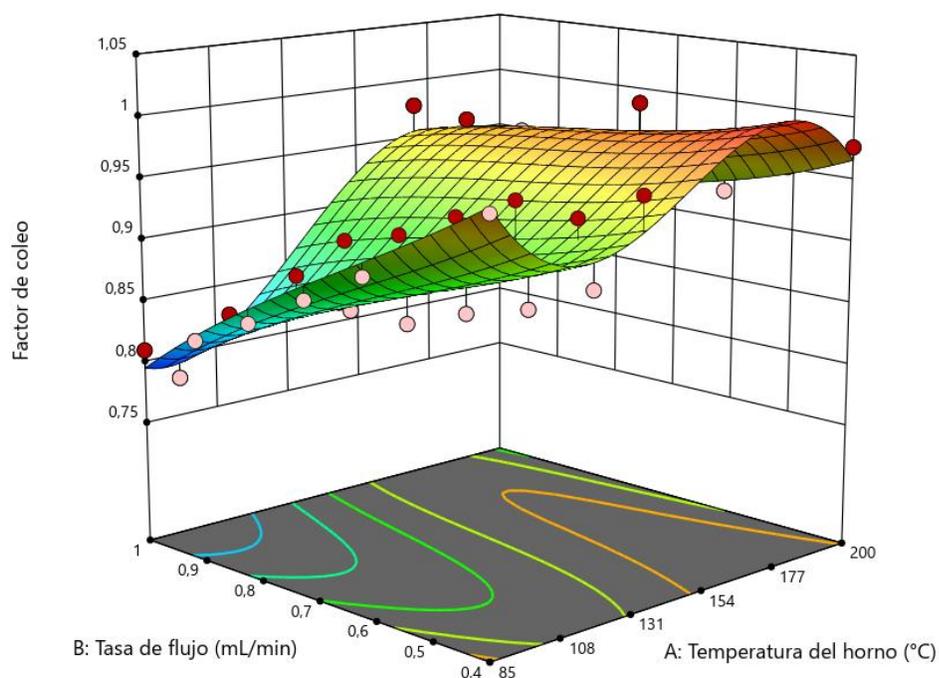


Figura 7. Gráfico de superficie de respuesta tridimensional para el efecto de la temperatura del horno y la tasa de flujo sobre el factor de coleo realizado por el programa *Desing Expert*.

7.2.5. Factor de capacidad (k')

El factor de capacidad indica el grado de retención del analito en la columna en referencia al volumen muerto (Ho et al., 2022). En todas las ejecuciones que se llevaron a cabo en el DOE, se obtuvieron valores por debajo de 2 (ver figura 8), indicando que el mentol no presenta una buena retención por la columna y esto se debe a varios factores. Uno de ellos es que, al querer tener tiempos de retención bajos, se necesita que el mentol eluya de manera más rápida lo que resulta en una menor retención de esta. Además, cuando se emplean proporciones elevadas de disolventes orgánicos como el cloroformo en este caso, la retención de los analitos se reduce (Basso et al., 2021).

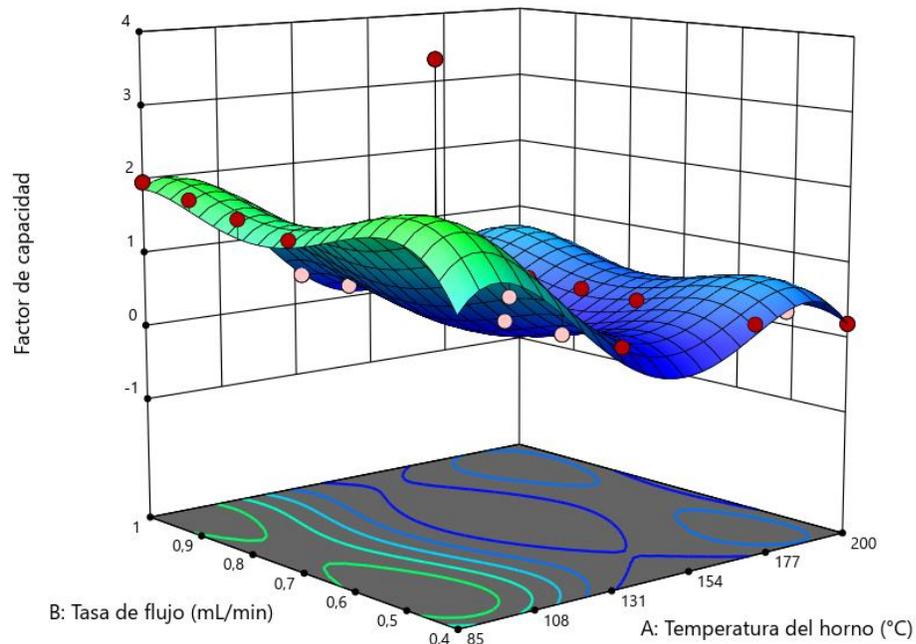


Figura 8. Gráfico de superficie de respuesta tridimensional para el efecto de la temperatura del horno y la tasa de flujo sobre el factor de capacidad realizado por el programa *Desing Expert*.

7.3. Desarrollo y optimización de métodos (MODR)

El MODR es la región que establece un rango permitido por los CAAs y desarrolla un espacio multidimensional relacionando las variables CAAs y CMPs, generando un procedimiento adecuado para la cuantificación del mentol basados en los requisitos del ATP. La identificación de esta región se encuentra en la figura 8 (en la zona de color amarillo) y se efectuó con base a los criterios definidos en el apartado de idoneidad del sistema. Cada punto rojo en la región gris representa un posible método cromatográfico (en cuanto a la temperatura del horno y tasa de flujo).

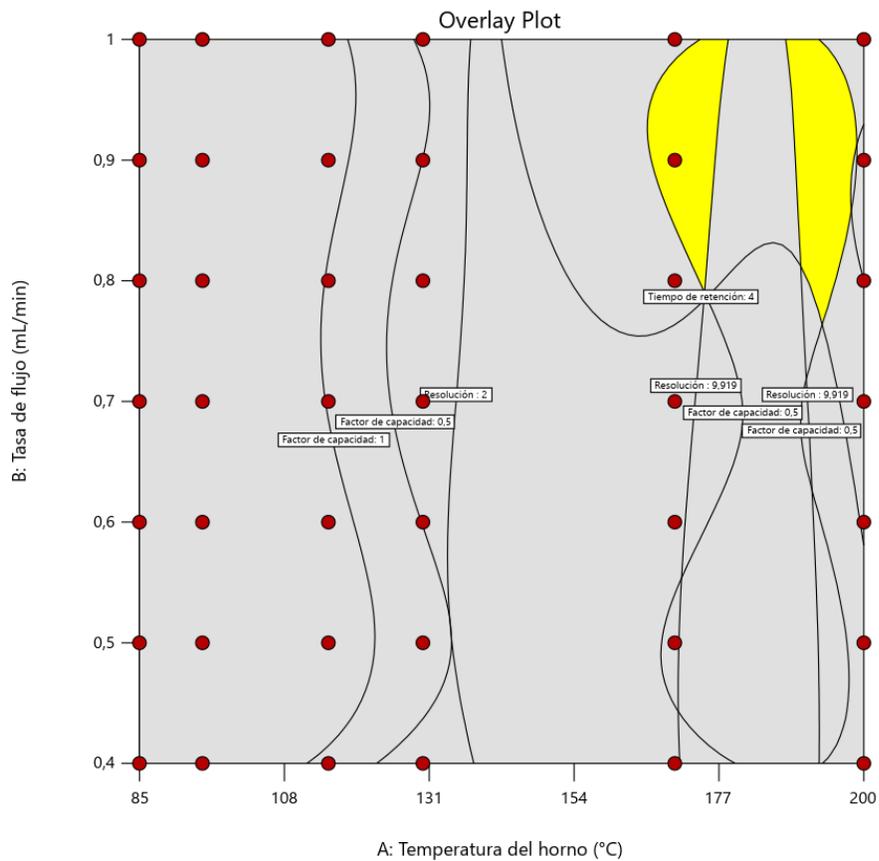


Figura 9. Gráfico de superposición con las variables CMPs y CAAs donde se define el Región Operable del método (MODR) por el programa *Desing Expert*

Se optó por seleccionar un intervalo para cada CAA (ver tabla 6), para cumplir con los criterios definidos y, en consecuencia, lograr un desarrollo exitoso en el MODR, siguiendo con lo establecido en el ATP. Por conveniencia, los parámetros del método elegidos para proceder con la validación del método, es una temperatura de 170 °C y una tasa de flujo de 0,9 mL/min (como se muestra en la región amarilla de la figura 8). Estas condiciones cromatográficas aseguran la idoneidad del método cromatográfico y está asociada a tener unos menores tiempos de retención, mayor resolución, altos platos teóricos, y una buena simetría del pico. Adicionalmente, en la figura 10 se exhibe el cromatograma resultante con estas condiciones.

Tabla 6. Requisitos para el desempeño del método de cada CAA para obtener el MODR

CAA	Límite inferior	Límite superior
Platos teóricos	31643	374728
Resolución	2,00	9,91

Factor de coleo	0,78	1,00
Factor de capacidad	0,50	1,00
Tiempo de retención (minutos)	2,00	4,00

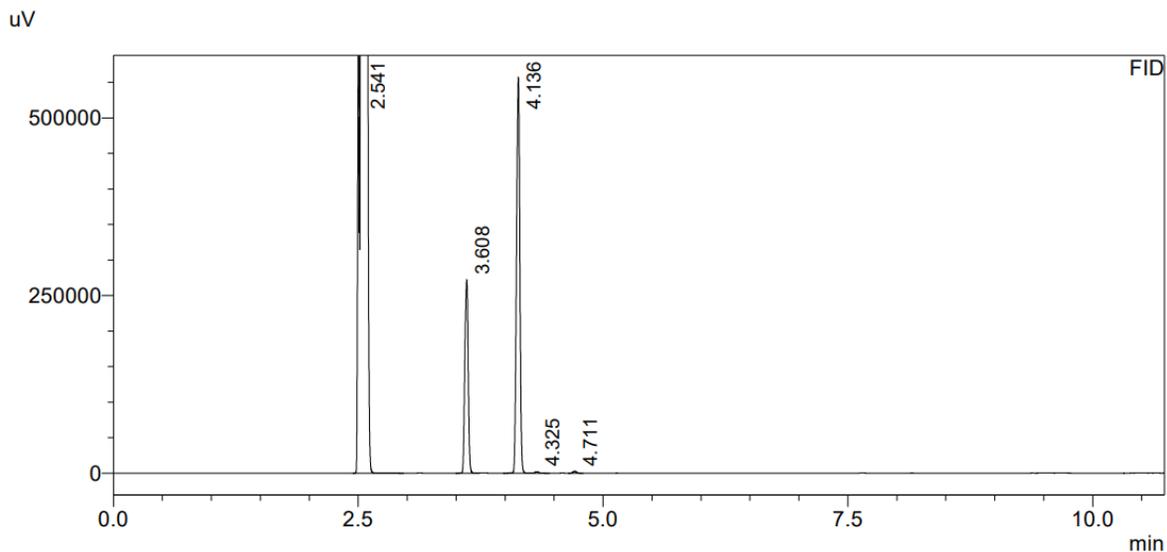


Figura 10. Condiciones cromatográficas con una temperatura de 170 °C y una tasa de flujo de 0,9 mL/min.

7.4. Condiciones cromatográficas finales

Se realizó una elución por gradiente debido a que esta técnica es más versátil en comparación con una isotérmica, por lo que hubo una mejor resolución del pico, menores tiempos de análisis y mejor detectabilidad (Marina & García, 2000). Lo anterior se puede evidenciar en la tabla 7.

Tabla 7. Condiciones cromatográficas finales de temperatura de horno y tasa de flujo obtenidas por una elución por gradiente.

Gas portador		Nitrógeno		
Temperatura del horno	Velocidad (°C/minuto)	Temperatura (°C)	Tiempo de espera (minuto)	Tiempo total (minuto)
	Inicial	170	2	2
	15	210	2	8,33
Tiempo total				11,33
Tasa de flujo	0,9 mL/minuto			

7.5. Validación del método

7.5.1. Idoneidad del sistema

Con el fin de evaluar si el método y el equipo son capaces de producir resultados exactos y precisos es necesario realizar pruebas de idoneidad del sistema. Se evaluaron los CAA previamente identificados (tiempos de retención, área, número de platos teóricos, resolución). Los resultados para la evaluación de idoneidad del sistema se muestran en la tabla 8. Se obtuvo que la precisión de los tiempos de retención y las áreas de picos fueron compatibles para ambos analitos de acuerdo con la $RSD \leq 2,0\%$. Además, se observó un excelente rendimiento de platos teóricos, siendo 67698 para el mentol y 91175 para el timol. Estos valores superaron significativamente el criterio de aceptación establecido (>2000), lo que nos permite afirmar que la eficiencia de separación de la columna fue buena.

Tabla 8. Idoneidad del sistema del mentol y timol.

Analito	Concentración (ppm)	T. Retención (minutos)		Área		N	Res	Fc	k'
		Media	RSD (%)	Media	RSD (%)				
Mentol	365	3,51	0,02	11814	1,57	67698	8,37	1,06	0,3
				1					
Timol	520	3,92	0,02	21803	1,46	91175		1,08	0,5
				3					5
Criterio de aceptación	-	-	\leq 2,0%	\leq 2,0%		$>$ 2000	> 2	< 2	> 2

7.5.2. Límite de detección y cuantificación

La menor concentración a la que cada analito puede ser detectado o identificado con una exactitud y precisión aceptables fue determinada por medio del cálculo del error típico a partir de la curva de calibración realizada en la figura 11 y los datos en la tabla 9. A partir de los cálculos realizados (ecuación 3 y 4) se determina que el método desarrollado no será capaz de cuantificar con una precisión y exactitud aceptable a muestras con concentraciones menores a 312 ppm. De igual forma, no será capaz de detectar ningún analito en muestras con concentraciones menores a 104 ppm.

Tabla 9. Datos estadísticos de la regresión lineal de la curva de calibración de la figura 11.

Coefficiente de correlación	Coefficiente de determinación	R ² ajustado	Error típico
0,9995	0,9990	0,9988	0,0612

$$LD = \frac{3.3 \cdot 0,0612}{398.93} * 512 \text{ ppm} = 104 \text{ ppm}$$

Ecuación 3. Cálculo para determinar LD

$$LC = \frac{10 \cdot 0,0612}{398.93} * 512 \text{ ppm} = 312 \text{ ppm}$$

Ecuación 4. Cálculo para determinar LD

7.5.3. Linealidad

La linealidad de los patrones de calibración se evaluó en el rango entre 55 a 2740 ppm. Los resultados obtenidos se evidencian en la tabla 10, a partir de los cuales se construyó la curva de calibración que se evidencia en la figura 11 por estándar interno y usando la ecuación de regresión lineal (ecuación 5) obtenida por medio del método de mínimos cuadrados, dio como resultado un coeficiente de correlación de 0,9995. El valor de R² obtenido cumple con las recomendaciones de la FDA, el cual indica que existe una alta correlación entre las variables.

$$\text{Área} \frac{\text{Mentol}}{\text{Timol}} = 1,009 \frac{[\text{Mentol}]}{[\text{Timol}]} - 0,1061; R^2 = 0,9995$$

Ecuación 5. Modelo específico de la curva de calibración del mentol y timol como estándar interno

Tabla 10. Resultados de la linealidad.

	Concentración del mentol (ppm)	Área del mentol	Concentración del timol (EI) (ppm)	Área del timol (PI)	C mentol/C timol	A mentol/A timol
Patrón 1	55	8282	520	164725	0,105385	0,050278
Patrón 2	110	14228	520	178642	0,210769	0,079645
Patrón 3	192	45581	520	139426	0,368846	0,326920
Patrón 4	356	107112	520	197625	0,685000	0,541996

Patrón 5	740	252088	520	182557	1,422692	1,380873
Patrón 6	986	334305	520	192127	1,896923	1,740018
Patrón 7	1507	547110	520	200171	2,898077	2,733220
Patrón 8	2000	731318	520	193464	3,846538	3,780124
Patrón 9	2740	1013678	520	192531	5,269231	5,265023

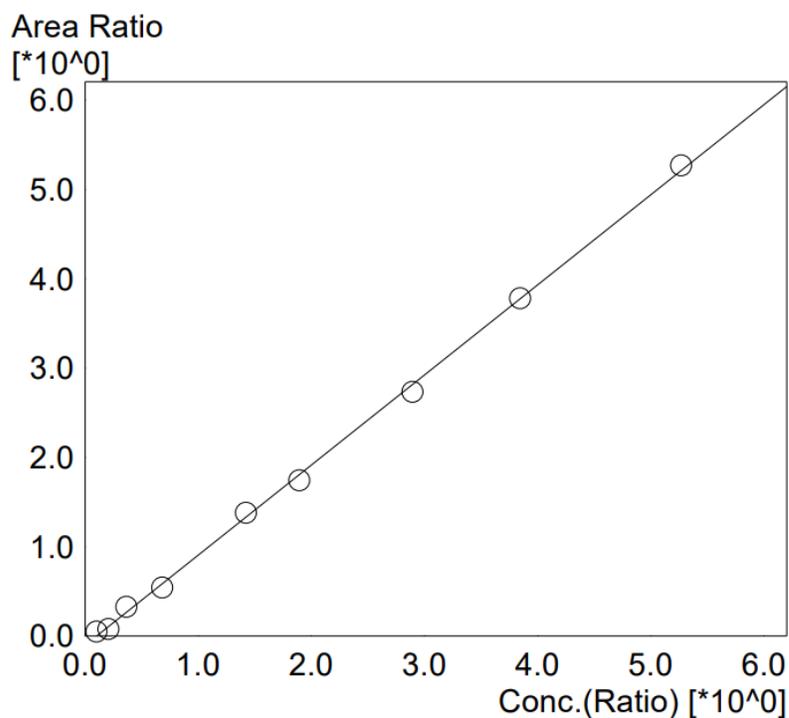


Figura 11. Curva de calibración del mentol obtenida por estándar interno por el programa de *LabSolutions*

7.5.4. Exactitud

La exactitud del método desarrollado se determinó por medio del porcentaje de recuperación obtenido a partir de la curva de calibración realizada por medio del método de estándar interno (ver tabla 11). El cual fue calculado usando la ecuación de la recta de la curva de calibración realizada, dando como resultado un porcentaje de exactitud relativa del 105,58%. Este valor supera levemente el límite propuesto, por lo que se considera ligeramente exacto. Este resultado se debe por la influencia de una alta incertidumbre de las micropipetas utilizadas, contaminación o impurezas en las muestras.

Tabla 11. Datos para determinar el parámetro de exactitud.

Ecuación de la recta	$y = 1,009x - 0,1061$
Valor de Y (mV)	589356
Valor teórico de concentración (ppm)	1644
Valor experimental de concentración (ppm)	1735,74
Porcentaje de recuperación	105,58%

7.5.5. Precisión

Los resultados para evaluar la precisión del sistema se evidencian en la tabla 8 de idoneidad del sistema, donde se determinó la desviación estándar relativa para evidenciar la variabilidad de los resultados de las áreas obtenidas para el mentol y timol, siendo de 1,57% para el mentol y 1,46% para el timol, encontrándose por debajo del criterio de aceptación (2,0%), lo que permite afirmar que el método desarrollado para la cuantificación del mentol presenta la repetibilidad requerida para el análisis lo que permite que produzca resultados precisos. Para observar el cromatograma en los experimentos de este parámetro véase la figura 12.

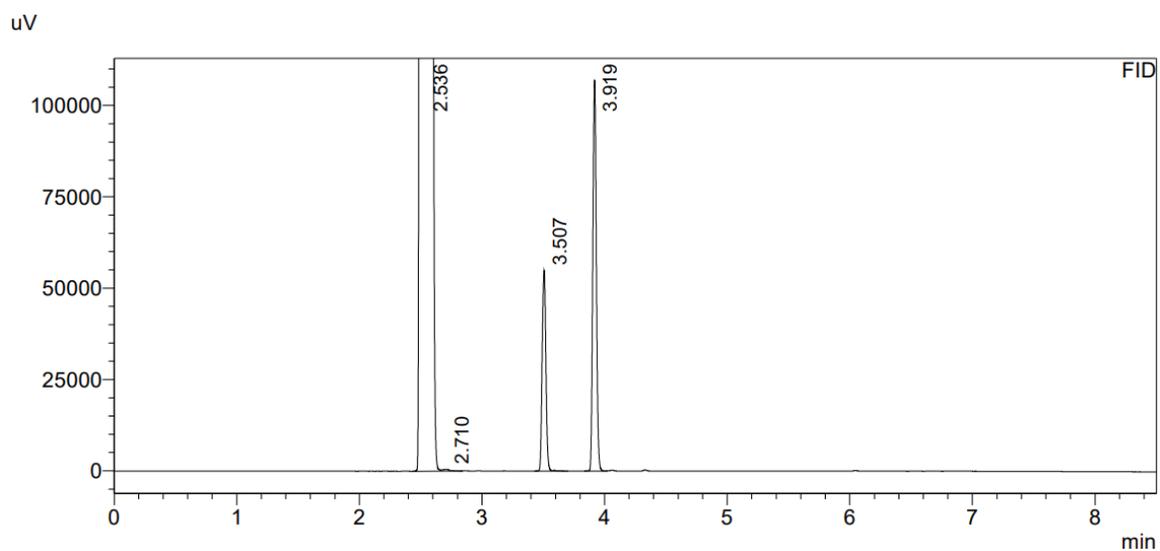


Figura 12. Cromatograma para evaluar el parámetro de precisión a una concentración de 356 ppm

Considerando que los resultados obtenidos de los parámetros de validación evaluados, es posible afirmar que el método desarrollado cumple con los requisitos de calidad necesarios para su

aplicación en la industria. Adicionalmente, fue posible evidenciar los beneficios de aplicar las estrategias AQbD al desarrollo de métodos analíticos, las cuales permiten una mayor flexibilidad regulatoria frente al método, facilidad en la etapa de transferencia del método y una reducción del gasto de recursos.

8. Conclusiones

Se desarrolló una estrategia AQbD para cuantificar el mentol a través de cromatografía de gases utilizando un método que incluye el estándar interno. En este proceso, se determinaron los parámetros críticos del método que permiten el cumplimiento del ATP propuesto los cuales fueron, temperatura del horno y tasa de flujo, para su posterior evaluación, así como los atributos críticos analíticos incluyendo la resolución, platos teóricos, tiempos de retención, factor de coe y factor de capacidad. Esta evaluación se basó en un análisis de riesgo realizado mediante un diagrama de Ishikawa y una matriz FMEA. Posteriormente se llevó a cabo un diseño de experimentos, haciendo uso de un diseño factorial completo, este tipo de diseño experimental demostró ser eficiente a la hora de evaluar 2 factores a una gran cantidad de niveles, siendo a su vez sencillo de aplicar e interpretar. Este tipo de diseño permitió conocer las relaciones factor respuesta que tienen los CAAs sobre los CMPs utilizando unos diagramas de superficie de respuesta, para así obtener la región operable del método y lograr determinar las mejores condiciones cromatográficas, las cuales fueron una temperatura de 170 °C y una tasa de flujo de 0,9 mL/min, ya que son las que permiten de la mejor manera el cumplimiento del ATP propuesto. Además, se validaron de acuerdo con las pautas reglamentarias que abarcaron la linealidad, exactitud, precisión, límite de detección y cuantificación. De la misma forma fue posible evidenciar las distintas ventajas que presenta la aplicación de las estrategias de AQbD en el desarrollo de métodos analíticos frente a las estrategias normalmente usadas, entre las que se incluyen: desarrollo de métodos más robustos, facilidad en la etapa de transferencia del método gracias a un mejor entendimiento del proceso, facilidad regulatoria, entre otros. En resumen, la validación del método respalda la implementación de la metodología AQbD para definir las condiciones cromatográficas más adecuadas en aplicaciones industriales.

9. Recomendaciones

Se recomienda llevar a cabo investigaciones futuras utilizando las condiciones cromatográficas obtenidas mediante la metodología AQbD y los parámetros de validación establecidos para validar la cuantificación de mentol en una matriz biológica o un producto farmacéutico que contenga este compuesto. Es importante señalar que en esta investigación se utilizaron únicamente las materias primas con un alto grado de pureza.

Una limitación importante de este estudio fue la incapacidad de realizar el parámetro de robustez en la validación. Esto es debido a la falta de tiempo para encontrar otro equipo de cromatografía de gases ni con los recursos necesarios para probar las condiciones en una nueva columna cromatográfica. Se recomienda en futuras investigaciones asignar tiempo y recursos adecuados para evaluar este parámetro y mejorar la validez de los resultados.

10. Referencias bibliográficas

- Abualhasan, M. N., Zaid, A. N., Jaradat, N., & Mousa, A. (2017). GC Method Validation for the Analysis of Menthol in Suppository Pharmaceutical Dosage Form. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2017, 1–5. <https://doi.org/10.1155/2017/1728414>
- Aronson, J. K. (Ed.). (2016). Menthol. In *Meyler's Side Effects of Drugs (Sixteenth Edition)* (Sixteenth Edition, pp. 831–832). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53717-1.01040-4>
- Basso, J., Ramos, M. L., Pais, A., Vitorino, R., Fortuna, A., & Vitorino, C. (2021). Expediting Disulfiram Assays through a Systematic Analytical Quality by Design Approach. *Chemosensors*, 9(7). <https://doi.org/10.3390/chemosensors9070172>
- Beg, S., & Rahman, M. (2021). Chapter 11 - Design of experiments application for analytical method development. In S. Beg, M. S. Hasnain, M. Rahman, & W. H. Almalki (Eds.), *Handbook of Analytical Quality by Design* (pp. 191–197). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820332-3.00011-X>
- Bhutani, H., Kurmi, M., Beg, S., Singh, S., & Singh, B. (2014). Quality by Design (QbD) in Analytical Sciences: An Overview. *Pharma Times*, 46, 71–75.
- Castellanos, M. A. M., Costa Monteiro, E., & Louzada, D. R. (2021). Quality by design and failure mode and effects analysis applied to the development of electromedical technology: Preliminary results. *Measurement: Sensors*, 18, 100303. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.measen.2021.100303>
- Elder, D., & Borman, P. (2013). Improving Analytical Method Reliability Across the Entire Product Lifecycle Using QbD Approaches. *Pharmaceutical Outsourcing*, 14, 14–19.
- Forgács, E., & Cserháti, T. (2003). 9 - Gas chromatography. In M. Lees (Ed.), *Food Authenticity and Traceability* (pp. 197–217). Woodhead Publishing. <https://doi.org/https://doi.org/10.1533/9781855737181.1.197>
- Group, I. C. H. E. W., & others. (2009). Pharmaceutical development Q8. *ICH Harmon. Tripart. Guidel*, 8, 1–28.
- Hajigholamreza, H., Sharifzadeh, A., Hassan, J., Shokri, H., Akbaripazouki, A., Pakbin, B., & Tamai, I. A. (2023). Influence of menthol on biofilm formation, ergosterol content, and cell surface hydrophobicity of *Candida glabrata*. *FEMS Microbiology Letters*, 370. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnad065>
- Ho, H. M. K., Sembi, S., Abukhamees, S., Day, R. M., & Craig, D. Q. M. (2022). An analytical quality by design approach towards a simple and novel HPLC-UV method for quantification of the antifibrotic peptide N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline. *Analytical Biochemistry*, 654, 114793. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ab.2022.114793>
- ICH Steering Committee. (2022). ICH Q2 (R2) validation of analytical procedures: method. In *European agency for the evaluation of medicinal products, International commission on harmonisation, (CPMP/ICH/281/95)*.

- Kamatou, G. P. P., Vermaak, I., Viljoen, A. M., & Lawrence, B. M. (2013). Menthol: A simple monoterpene with remarkable biological properties. *Phytochemistry*, *96*, 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.08.005>
- Kokkini, S., Karousou, R., & Hanlidou, E. (2003). HERBS | Herbs of the Labiatae. In *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (pp. 3082–3090). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/00593-9>
- Kumar, A. (2021). *Emerging Business of Menthol Crystal. Best Business Ideas for New Entrepreneur*. . . LinkedIn.
- Kumar, S., Acharya, T. K., Halder, R. R., Mahapatra, P., Chang, Y.-T., & Goswami, C. (2023). Menthol causes mitochondrial Ca²⁺-influx, affects structure-function relationship and cools mitochondria. *Life Sciences*, *331*, 122032. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lfs.2023.122032>
- Marina, M. L., & García, M. A. (2000). CHROMATOGRAPHY: LIQUID | Micellar Liquid Chromatography. In I. D. Wilson (Ed.), *Encyclopedia of Separation Science* (pp. 726–737). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B0-12-226770-2/01811-1>
- McMillan, J. (2016). Principles of Analytical Validation. In *Proteomic Profiling and Analytical Chemistry* (pp. 239–251). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63688-1.00013-6>
- Ornaf, R. M., & Dong, M. W. (2005). 2 - Key Concepts of HPLC in Pharmaceutical Analysis. In S. Ahuja & M. W. Dong (Eds.), *Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC* (Vol. 6, pp. 19–45). Academic Press. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0149-6395\(05\)80046-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0149-6395(05)80046-7)
- Parr, M. K., & Schmidt, A. H. (2018). Life cycle management of analytical methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *147*, 506–517. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.06.020>
- Patel, K. Y., Dedania, Z. R., Dedania, R. R., & Patel, U. (2021). QbD approach to HPLC method development and validation of ceftriaxone sodium. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, *7*(1), 141. <https://doi.org/10.1186/s43094-021-00286-4>
- Peraman, R., Bhadraya, K., & Padmanabha Reddy, Y. (2015). Analytical Quality by Design: A Tool for Regulatory Flexibility and Robust Analytics. *International Journal of Analytical Chemistry*, *2015*, 868727. <https://doi.org/10.1155/2015/868727>
- Pillay, A., & Wang, J. (Eds.). (2003). Chapter 7 Modified failure mode and effects analysis. In *Technology and Safety of Marine Systems* (Vol. 7, pp. 149–177). Elsevier. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1571-9952\(03\)80009-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1571-9952(03)80009-0)
- Pradhan, R., Hejmady, S., Alexander, A., Singhvi, G., & Dubey, S. K. (2021). Chapter 3 - Analytical quality by design for gas chromatographic method development. In S. Beg, M. S. Hasnain, M. Rahman, & W. H. Almalki (Eds.), *Handbook of Analytical Quality by Design* (pp. 45–70). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820332-3.00002-9>
- Ramalinagm, P., Basha, S., Bhadraya, K., & Beg, S. (2021). Risk assessment and design space consideration in analytical quality by design (pp. 167–189). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-820332-3.00008-x>

- Ramalingam, P., & Jahnavi, B. (2019). Chapter 5 - QbD Considerations for Analytical Development. In S. Beg & M. S. Hasnain (Eds.), *Pharmaceutical Quality by Design* (pp. 77–108). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815799-2.00005-8>
- Roy, S. (2012a). Quality by design: A holistic concept of building quality in pharmaceuticals. *International Journal of Pharmaceutical and Biomedical Research (IJPBR)*, 3(2), 100–108.
- Roy, S. (2012b). *Quality by design : A holistic concept of building quality in pharmaceuticals*. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:17122016>
- Satamatis, D. (2003). *Failure Mode and Effect Analysis: FMEA from Theory to Execution* (2nd ed.). American Society for Quality.
- Schweitzer, M., Pohl, M., Hanna-Brown, M., Nethercote, P., Borman, P., Hansen, G., Smith, K., Larew, J., Carolan, J., Ermer, J., Faulkner, P., Finkler, C., Gill, I., Grosche, O., Hoffmann, J., Lenhart, A., Rignall, A., Sokoließ, T., & Wegener, G. (2010). Implications and opportunities of applying QbD principles to analytical measurements. *Pharmaceutical Technology*, 34, 52–59.
- Stauffer, E., Dolan, J. A., & Newman, R. (2008). Gas Chromatography and Gas Chromatography—Mass Spectrometry. In *Fire Debris Analysis* (pp. 235–293). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-012663971-1.50012-9>
- Swartz, M. E., & Krull, I. S. (1998). Validation of chromatographic methods. *Pharmaceutical Technology*, 22(3), 104–120.
- Tazón, F. (2008). *Validación de procesos (2a Parte)*. Asinfarma.
- Tome, T., Žigart, N., Časar, Z., & Obreza, A. (2019). Development and Optimization of Liquid Chromatography Analytical Methods by Using AQbD Principles: Overview and Recent Advances. *Organic Process Research & Development*, 23(9), 1784–1802. <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.9b00238>
- Torbeck, L. (2011). OOS, OOT, OOC, and OOSC. *Pharmaceutical Technology*.
- United States Pharmacopeial Convention, I. (2018). USP 31. *Farmacopea de Los Estados Unidos de América*.
- Vashist, S. K., & Luong, J. H. T. (2018). Bioanalytical Requirements and Regulatory Guidelines for Immunoassays. In *Handbook of Immunoassay Technologies* (pp. 81–95). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811762-0.00004-9>
- Verch, T., Campa, C., Chéry, C. C., Frenkel, R., Graul, T., Jaya, N., Nakhle, B., Springall, J., Starkey, J., Wypych, J., & Ranheim, T. (2022). Analytical Quality by Design, Life Cycle Management, and Method Control. *The AAPS Journal*, 24(1), 34. <https://doi.org/10.1208/s12248-022-00685-2>
- Waters, T. (2020). *Process Gas Chromatographs: Fundamentals, Design and Implementation* (Wiley, Ed.). Wiley.
- Wong, M., Murphy, B., Pease, J., & Dong, M. (2015, June). *Separation Science in Drug Development, Part I: High-Throughput Purification*. LCGC North America.

11. Anexos

Tabla 12. Datos del diseño experimental de los parámetros críticos del método (temperatura de horno y tasa de flujo) para los tiempos de retención.

Flujo (mL/min)	Temperatura (°C)					
	200	170	130	115	95	85
1.0	2,765	3,361	4,879	5,791	7,181	7,911
0.9	2,966	3,608	5,142	6,065	7,464	8,206
0.8	3,208	3,909	5,460	6,398	7,813	8,560
0.7	3,521	4,293	5,854	7,164	8,242	8,996
0.6	3,927	4,781	6,358	7,753	8,791	9,558
0.5	4,485	5,460	7,031	8,557	9,527	10,307
0.4	5,315	6,446	8,021	9,054	10,628	11,446

La medida de los tiempos de retención es en minutos

Tabla 13. Datos del diseño experimental de los parámetros críticos del método (temperatura de horno y tasa de flujo) para la resolución.

Flujo (mL/min)	Temperatura (°C)					
	200	170	130	115	95	85
1.0	3,119	8,288	1,619	1,809	1,780	1,928
0.9	3,244	8,473	1,709	1,873	1,914	1,911
0.8	3,572	8,751	1,764	1,827	1,931	1,935
0.7	3,650	8,726	1,780	1,784	1,976	1,902
0.6	3,818	9,919	1,749	1,704	1,904	1,874
0.5	4,084	9,832	1,678	1,594	1,832	1,807
0.4	4,309	9,531	1,526	1,448	1,583	1,552

Tabla 14. Datos del diseño experimental de los parámetros críticos del método (temperatura de horno y tasa de flujo) para el factor de capacidad.

Flujo (mL/min)	Temperatura (°C)					
	200	170	130	115	95	85
1.0	0,219	0,423	0,423	1,306	1,757	1,973
0.9	0,216	0,420	0,420	1,239	1,654	1,856
0.8	0,213	0,416	0,416	1,170	1,547	1,729
0.7	0,210	0,413	0,413	1,162	1,429	1,592
0.6	0,205	0,406	0,406	1,077	1,300	1,443
0.5	0,201	0,398	0,398	0,980	3,986	1,570
0.4	0,195	0,403	0,403	0,794	1,004	1,103

Tabla 15. Datos del diseño experimental de los parámetros críticos del método (temperatura de horno y tasa de flujo) para los platos teóricos.

Flujo (mL/min)	Temperatura (°C)					
	200	170	130	115	95	85
1.0	31643	51767	99116	119396	144667	223502
0.9	35066	55152	112394	163300	215059	254597
0.8	43352	60528	129597	159383	240087	284607
0.7	47291	62520	159772	163763	279726	330097
0.6	54276	84345	177003	170694	316542	348666
0.5	64166	88820	190725	161778	326260	374728
0.4	75360	91670	185036	181529	274234	318574

Tabla 16. Datos del diseño experimental de los parámetros críticos del método (temperatura de horno y tasa de flujo) para el factor de coleo.

Flujo (mL/min)	Temperatura (°C)					
	200	170	130	115	95	85
1.0	0,886	0,979	0,849	0,813	0,781	0,810
0.9	0,884	0,974	0,888	0,866	0,845	0,829
0.8	0,946	0,972	0,902	0,848	0,864	0,854
0.7	0,914	0,936	0,926	0,848	0,876	0,883
0.6	0,925	1,009	0,948	0,867	0,922	0,911
0.5	0,953	0,982	0,943	0,881	0,943	0,952
0.4	0,977	0,980	0,969	0,906	0,947	0,976