



UNIVERSIDAD CENTRAL "MARTA ABREU" DE LAS VILLAS
VERITATE SOLA NOBIS IMPONETUR VIRILIS TOGA. 1948

Facultad
Química - Farmacia
Centro de Bioactivos Químicos

Trabajo de Diploma

Título: Obtención de un principio activo con acción frente a Ectoparásitos.

Autora: Yaléidi León Simó.

Tutores: Dra. C. Zenaida Rodríguez Negrín.
MSc. Rafael Sosa Martínez.

"Año 52 de la Revolución"
Santa Clara
Curso 2009-2010

El revolucionario verdadero está guiado por grandes sentimientos de amor.



Pensamiento

La ciencia tiene una característica maravillosa, y es que aprende de sus errores, que utiliza sus equivocaciones para reexaminar los problemas y volver a intentar resolverlos, cada vez por nuevos caminos.

Ruy Pérez Tamayo

Dedicatoria

Quiero dedicar este Trabajo de Diploma, el cual fue realizado con tanto empeño y dedicación a las dos personas más importantes en mi vida: mis padres, los que me dieron la vida y me enseñaron a transitar por ella con tanto amor y sacrificio, los que me apoyan siempre dándolo todo de sí incondicionalmente.

Agradecimientos

A mis tutores:

Zenaida, por enseñarme y confiarme la realización de este trabajo.

Sosa, por sus ideas, su sabiduría y su ayuda incondicional para conmigo.

A Josefa y Yaidel por su aliento, dedicación y compromiso en el laboratorio.

A mis compañeros de aula por estar a mi lado a lo largo de estos años de mucho esfuerzo y entrega, a la memoria de Luis Manuel que aunque el destino no permitió que siguiera entre nosotros se que estaría muy orgulloso de vernos lograr este propósito.

A Albany por permitirme entrar en su vida, por su cariño y comprensión, por su amor.

A todos los profesores por hacer posible mi formación profesional a lo largo de la carrera.

Al grupo de Control de la Calidad del CBQ, gracias por su ayuda.

A Mollineda por tenderme la mano cuando lo necesité.

Gracias infinitas a mis padres y abuelos por entregarme todo sin pedir nada, pues sin ellos no sería posible la realización de este sueño.

A toda mi familia y amigos, muchas gracias por su apoyo y motivación.

A todos gracias.

Introducción

INTRODUCCIÓN

El Centro de Bioactivos Químicos, perteneciente a la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, es un centro de investigaciones dedicado al desarrollo, la producción y la comercialización de principios activos, que presentan marcada actividad biológica.

Entre los Ingredientes Farmacéuticos Activos (IFA) que se han sintetizado en el mismo, se encuentra el 2-(2-metil-2-nitrovinil)-furano, más conocido como UC-244, el cuál presenta entre otras propiedades acción garrapaticida y bactericida, las que auguran potenciales aplicaciones en la medicina veterinaria y en la agricultura.

Para la introducción de los procesos de obtención y purificación del principio activo UC-244 en la Planta de Producción del Centro de Bioactivos Químicos es necesario realizar un estudio de las condiciones de síntesis y purificación, como continuación de las investigaciones realizadas por Rodríguez, Z. y otros (2005, 2006), en las cuales se desarrolla el escalado de su síntesis hasta 2 moles, lográndose rendimientos que no cubren las exigencias para este tipo de proceso (Hernández, M.; 2004).

El diseño experimental es un procedimiento que permite determinar la influencia de las diferentes variables y encontrar las condiciones de reacción más factibles que a su vez conlleven a un menor coste del proceso. Dichas técnicas se han aplicado profusamente en la optimización de los procesos de síntesis y purificación de numerosos principios activos desarrollados en el CBQ.

Es necesario contar con técnicas analíticas fiables y factibles que permitan evaluar las funciones respuestas de los diseños de experimentos. Para este fin pueden ser aplicadas la Espectrofotometría UV-VIS combinada con la cromatografía de capa delgada y la Cromatografía Líquida de Alta Resolución, entre otros.

Problema Científico:

El proceso de obtención y purificación del UC-244 se ha realizado a escala de 6 moles pero se obtienen variaciones en los rendimientos por no introducir niveles adecuados de los factores experimentales en ambos procesos.

Hipótesis:

Es posible mejorar la eficiencia del procesos de síntesis y de purificación de UC-244 y alcanzar una pureza de la sustancia bioactiva superior a un 98 %, que es la requerida para su formulación.

Objetivo general:

Alcanzar las mejores condiciones del proceso de síntesis y purificación de UC-244 a escala de 6 moles mediante un aumento del rendimiento y de la pureza del principio activo, que permita elevar la eficiencia total del proceso.

Objetivos Específicos:

- Obtener las mejores condiciones para la síntesis y la purificación del UC-244 a escala de 6 moles en las condiciones de laboratorio, mediante diseños de experimentos. Evaluar los resultados empleando varias funciones respuestas.
- Aplicar la técnica de Espectrofotometría UV-CCD a la determinación de la pureza del producto obtenido en los experimentos de síntesis.
- Utilizar la técnica HPLC para determinar la pureza del principio activo en el proceso de purificación.

Resumen

Resumen:

El Centro de Bioactivos Químicos tiene como misión el desarrollo de ingredientes farmacéuticos activos. El 2-(2-metil-2-nitrovinil)-furano, más conocido como UC-244 presenta propiedades demostradas en Cuba y otros países frente a los ectoparásitos. El presente trabajo se realizó con el objetivo de estudiar la influencia de diversos factores experimentales tanto en el proceso de síntesis y como purificación de este principio activo a escala de 6 moles, empleando diferentes diseños experimentales factoriales. Con los resultados que proporcionan los diseños seleccionados se evaluaron las influencias de diferentes factores experimentales (temperatura, tiempo de contacto, etanol, carbón activado), y se emplearon técnicas analíticas que combinan la espectrofotometría UV-VIS con una separación previa mediante la cromatografía de capa delgada y la Cromatografía Líquida de Alta Resolución para la cuantificación de dicho IFA.

Palabras claves: acción biológica, 2-(2-metil-2-nitrovinil)-furano espectrofotometría UV-VIS, cromatografía de capa delgada, Cromatografía Líquida de Alta Resolución, síntesis química, diseños experimentales factoriales,

Abstract:

Chemical Bioactive Center's mission is the development of active pharmaceutical ingredients. 2 - (2-methyl-2-nitrovinyl)-furan, better known as UC-244 has demonstrated properties in Cuba and other countries against ectoparasites. This work was carried out to study the influence of various experimental factors in both the synthesis and as the purification of this active ingredient at 6 moles, using different experimental designs factor. With the results provided by the selected designs were evaluated the influences of different experimental factors (temperature, contact time, ethanol, activated charcoal), and analytical techniques were used to combine the UV-VIS spectrophotometer with a preliminary separation by layer chromatography thin and high-resolution liquid chromatography for quantification of the IFA.

Keywords: biological action, 2 - (2-methyl-2-nitrovinyl)-furan UV-VIS spectrophotometry, thin layer chromatography, high resolution liquid chromatography, chemical synthesis, factorial experimental designs,

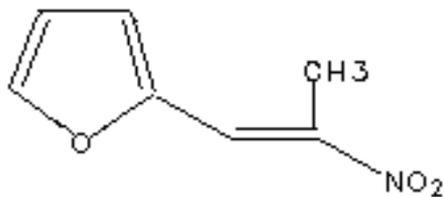
Revisión bibliográfica.

Capítulo I. Revisión Bibliográfica.

1.1 Características del UC-244.

El UC-244 es un compuesto que forma parte de la familia de los derivados nitrovinilfuránicos, de los cuales se han sintetizado y caracterizado algunos productos biológicamente activos.

Las características y estructura de este principio activo han sido determinadas por diferentes métodos químico-físicos:



Nombre químico (según IUPAC): 2-(2-metil-2-nitrovinil)-furano.

Masa molar: 153.137 g/mol.

Fórmula global: C₇H₇O₃N.

1.2 Importancia y utilización del UC-244.

Se ha comprobado que el UC-244 presenta propiedades acaricidas atacando la sarna psoróptica y zarcóptica, garrapatas ninfas, metaninfas y adultas, así como frente a la fasciola hepática. También se ha demostrado su actividad antiinflamatoria, aspecto que le confiere múltiples usos e importancia terapéutica.

Este compuesto se encuentra aun bajo estudio, pero según ensayos realizados se ha demostrado su gran eficacia en la eliminación y el control de plagas muy dañinas, como son los coleópteros de las especies *Dermestes ater* y *Alphitobius diaperinus* evaluados en gallinas ponedoras a concentraciones de 0.5 y 1% en solución acuosa (Rodríguez, R. 1994). Otro insecto al cual también ataca es la mosca (*Musca doméstica*) mostrando su efectividad en concentraciones del 0.1 – 1%. El UC-244 ataca a los ácaros que son

perjudiciales para los granos almacenados, tanto en larvas como adultos. Los vapores se difunden por todo el material logrando eliminar el *Sitophilus oryzae* (gorgojo del arroz), el *Tribolium castaneum* (escarabajo rojo de la harina) y el *Cryptolestos sp* (gorgojo del trigo o gorgojo plano de los granos) obteniéndose los mejores resultados a 5g/m³. Además es activo a concentraciones de 2.5 g/m³ ante el *Zabrotes subfasciatus*, que ataca al frijol Chiclayo o Caupí. Es de destacar que las semillas almacenadas a las cuales se les ha aplicado UC-244 no presentaron afectaciones, en las concentraciones ensayadas, respecto a su posterior germinación y produce un efecto residual que protege al grano durante 30 días aproximadamente. Tampoco afecta su utilización como sustrato para el desarrollo de hongos *trichoderma sp* y *beauveria bassiana* e impide el desarrollo de los entomopatógenos cultivados sobre estos sustratos. Los vapores de este compuesto eliminan con eficacia los gorgojos de la harina almacenada en una semana, incluyendo sus larvas. (Machado, R.).

Fue efectivo además ante ácaros del género *Rhizoglyphus*, los estudios revelan que al ser aplicado el compuesto al 25%, no afecta la brotación de la semilla ni el desarrollo posterior de la planta. (Salazar, E. 1996).

Saucedo 2004, ha reportado estudios sobre la efectividad del UC-244 para el control de plagas de almacén en el cultivo del sorgo (*Sorghum bicolor*). Los insectos (plagas) sobre los cuales se estudió el efecto del producto, fueron del género *Sitophilus spp* (*Sitophilus oryzae*, *Sitophilus zea* mais y *Sitophilus granarius*), así como *Rhizoperta dominica* (polilla de las harinas). Los resultados parciales obtenidos demuestran un efecto general de repelencia y letal, con mayor acción a partir de los 10 días en los insectos del género *Sitophilus spp*.

Por otra parte se estudió la acción del UC-244 contenido en el pienso industrial (en forma sólida), sobre el insecto plaga *Rhizoperta dominica* (polilla de los cereales), presentándose un efecto letal a los 12 días. Además se avaluó el UC-244 ante plagas de *Thrips palmi kany*, en cultivos de habichuelas y frijoles siendo eficaz a concentraciones de 0.1%.

También se estudió el efecto del UC-244 frente a la *Artemia salina* Leach y *Hemisia Tabacci* Genn. La *Artemia* spp es un camarón minúsculo de cuerpo blando, de color carmelita y transparente a la luz. El ensayo se basa en que la mayoría de los compuestos activos son tóxicos a las larvas de *Artemia* spp; el mismo es general de amplio uso, permitiendo determinar el efecto letal de los materiales sobre las larvas de *Artemia* spp y de esta manera predecir su habilidad para producir la muerte de células cancerígenas en cultivo de tejidos, matar insectos y ejercer un amplio rango de efectos farmacológicos. Este estudio mostró que el UC-244 en el rango de concentraciones de 10 a 1000 µg/mL frente la *Artemia salina* posee acción plaguicida potencial e induce a considerar su evaluación en ensayos más específicos. (Cordobés, C. 1993)

La *Hemisia Tabacci* Genn conocida comúnmente como mosca blanca del algodonero o de la batata, ocasiona afectaciones a numerosos cultivos y constituye un problema de vital importancia para la agricultura de un gran número de países a nivel mundial. Como resultado de su ataque pueden reducir el rendimiento de forma directa al alimentarse del tejido de la hojas, proceso en el cual inyectan toxinas a través de la saliva, lo que ocasiona el debilitamiento de la planta, manchas cloróticas, síntomas de deshidratación, detención y disminución del crecimiento; por otra parte la secreción de melaza de las moscas, favorece la aparición del hollín negro o negrilla y posterior asentamiento del hongo (*Cladosporium* sp.) en hojas, flores y frutos, lo que provoca asfixia vegetal, dificultad en la fotosíntesis, disminución en la calidad de la cosecha y se les reconoce su eficacia en la transmisión de enfermedades. El UC-244 produjo una mortalidad superior al 50% de estos hongos a la concentración más baja evaluada a las 48 horas (16 µg/mL). A concentraciones superiores (2000 y 1000 µg/mL) causó la muerte de todas las moscas evaluadas antes de que estas fueran transferidas al vial de las plantas.

En la tabla 1 se muestra un resumen de las principales acciones del UC-244.

| ACCIONES DEL UC-244 FRENTE A: | | EVALUADOS EN: |
|--|---|-------------------------|
| Coleópteros de las especies: <ul style="list-style-type: none"> • <i>Dermester ater deg</i> • <i>Alphitobiusdiaperinus</i> | 0.5% y 1% | Gallinas Ponedoras |
| <i>Thrips palmi kany</i> | 0.1% | Habichuela |
| <i>Thrips palmi kany</i> | 0.1% | Frijoles |
| <i>Musca domestica</i> | 0.1%-0.25% | |
| <i>Sitophilus oryzae</i> (Gorgojo del arroz) | 5g/m ³ | Arroz |
| <ul style="list-style-type: none"> • <i>Rhizopertha dominica</i> • (Bostrico de los granos) | 0.1% No afecta la brotación, ni tamaño de las hojas | Ajo |
| <ul style="list-style-type: none"> • <i>Tribolium casteneum</i> (Escarabajo Rojo de la harina) • <i>Crytolestos sp</i> (Gorgojo del trigo o gorgojo plano de los granos) | 5g/m ³ | Trigo |
| <i>Zabroles subfasciatus</i> | 2.5g/m ³ | Frijol Chiclayo o Caupí |
| <ul style="list-style-type: none"> • <i>Sitophilus sp</i> (<i>Sitophilus oryzae</i>, <i>Sitophilus zea</i>) | | Sorgo (Sorghum) |

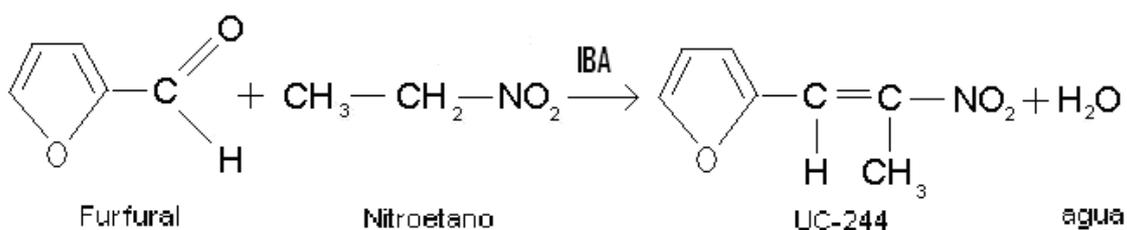
| | | |
|---|-----------------|------------------------------|
| <i>mais y Sitophilus granarius</i>) | | bicolor) |
| <ul style="list-style-type: none"> <i>Hemisia tabacci</i> Genn (mosca blanca del algodón o de la batata) | 16 µg/mL | Plantas |
| <ul style="list-style-type: none"> <i>Artemia spp</i> | 10 a 1000 µg/mL | Larvas de <i>Artemia spp</i> |

Tabla 1.1 Principales acciones del UC-244.

1.3 Síntesis del UC-244.

El UC-244 se sintetiza a partir del furfural y el nitroetano, en presencia de catalizadores (generalmente se utiliza isobutilamina (IBA), aunque se han obtenido buenos resultados con otros como el óxido de aluminio). La reacción que ocurre puede considerarse de condensación según Knoevenagel. (Morrinson, R.T. y Boyd, R.N. 1983)

1.4 Reacción principal de la síntesis de UC-244.



1.5 Materias primas de la síntesis de UC-244

Furfural, o furfuraldehído:

Aldehído orgánico líquido, de fórmula C₅H₄O₂, que se obtiene por la destilación con ácido clorhídrico o sulfúrico del salvado de la cascarilla de arroz y otros productos ricos en pentosas. El grupo de compuestos al que pertenece el

furfural se denominan furanos. El furfural, en estado puro, es un líquido aceitoso incoloro, con un olor a almendras agrias, que expuesto al aire se vuelve pardo rojizo.

Tiene un punto de ebullición de 161,7 °C. Industrialmente se emplea para refinar el disolvente utilizado en la elaboración del caucho o hule sintético y del nylon; en la fabricación de resinas para plásticos y revestimientos metálicos. También es un componente de los insecticidas, de los embalsamamientos y de los líquidos desinfectantes. Ciertos furfurales sensibles a la luz se usan en litografía.

Nitroetano:

El nitroetano es solamente uno de la familia de químicos llamados "nitroparafinas". Es un líquido incoloro, aceitoso, con olor característico.

A continuación se relacionan algunas de sus propiedades:

Fórmula general: $C_2H_5NO_2/CH_3CH_2NO_2$

Masa molar: 75.1 g/mol

Punto de ebullición: 114°C

Punto de fusión: -50°C

Densidad relativa (agua = 1): 1.053 g/cm³

Solubilidad en agua: moderada (4.5 mL/100 mL a 20°C)

Presión de vapor (a 20°C): 2.08 kPa

Punto de inflamación: 28°C

Temperatura de auto ignición: 414°C

Límite de explosividad: 4.0 % en volumen en el aire.

Puede estallar por calentamiento rápido a altas temperaturas. Con álcalis fuertes, ácidos o combinación de aminas y óxidos de metales pesados se forman compuestos inestables frente al choque. En combustión, formación de gases tóxicos (dióxido de nitrógeno).

La sustancia se descompone al calentar intensamente por encima de 300°C, produciendo humos tóxicos (óxidos de nitrógeno) que irrita los ojos, la piel y el tracto respiratorio, además de causar tos y dolor de cabeza. La exposición podría causar disminución de la conciencia. Puede atacar algunos tipos de plástico.

Isobutilamina:

La isobutilamina es un líquido incoloro a temperatura ambiente, de olor característico. Algunas de sus propiedades principales se relacionan a continuación:

Temperatura de ebullición: 68-69 °C

Temperatura de fusión: -85 °C

Densidad relativa (agua = 1): 0.7

Solubilidad en agua: miscible.

Presión de vapor, a 18.8°C: 13.3 kPa

Densidad relativa de vapor (aire = 1): 2.5

Entre sus propiedades se destaca que por combustión, forma gases tóxicos y corrosivos, incluyendo monóxido de carbono y óxidos de nitrógeno. La disolución en agua es moderadamente básica. Reacciona violentamente con oxidantes. La sustancia es corrosiva para los ojos, la piel y el tracto respiratorio.

Es corrosiva por ingestión. La inhalación de la sustancia puede originar edema pulmonar, cuyos efectos pueden aparecer de forma no inmediata. Si bien no se ha encontrado en la literatura algún riesgo específico y directo de esta amina, se conoce que su reacción con nitritos produce nitrosoaminas, sustancias cancerígenas que aumentan el riesgo de cáncer de esófago y estómago. (Catálogo General Panreac, 2001).

1.6 Antecedentes del trabajo.

Investigadores del Centro de Bioactivos Químicos han realizado estudios con el objetivo de mejorar las condiciones de síntesis y purificación, así como encontrar las mejores condiciones para el escalado sucesivo de estos procesos en el UC-244.

Z.Rodríguez y colaboradores, (2005), realizaron un estudio preliminar de las condiciones para la determinación cuantitativa del UC-244, aplicando la espectrofotometría UV, encontrando que los crudos presentaban una pequeña absorción en la región cercana a 350 nm (máximo de absorción de la sustancia purificada). Las impurezas fueron eliminadas mediante una separación previa a partir de la cromatografía de capa delgada, determinando las mejores condiciones para la separación y para el estudio espectral. La aplicación de esta técnica combinada presenta una exactitud, precisión y límite de cuantificación que permiten realizar un estudio de las mejores condiciones de síntesis y purificación del principio activo estudiado. Este trabajo llega hasta un escalado de la síntesis de 0,5 moles.

En otro trabajo, Z.Rodríguez y col. (2006), obtienen las mejores condiciones de síntesis y purificación del UC-244 para un escalado de 2 moles.

Seguido de estos trabajos, Z.Rodríguez y col. (2006), continúan estudios y llegan a la síntesis y purificación del UC-244 para un escalado de 6 moles, pero no es reproducible el rendimiento, bajo las condiciones evaluadas, por lo que es imposible escalar el proceso de síntesis.

1.7 Fundamento de las técnicas analíticas.

Cromatografía de capa delgada:

La cromatografía comprende un grupo de métodos de separación variada e importante que permite al científico separar, identificar y determinar compuestos afines en mezclas complejas que no podrían separarse de otra manera. La cromatografía de capa delgada constituye un método de separación eminentemente físico en el cual los componentes a separar se reparten entre

dos fases no miscibles, una de las cuales es la fase o lecho estacionario, que es un sólido finamente dividido diseminado como una capa delgada sobre un soporte rígido de cristal, de plástico o de aluminio de gran desarrollo superficial y la otra es un fluido que pasa a lo largo del lecho estacionario. A esto podría añadirse que la velocidad de migración de cada componente es función de la distribución de equilibrio de ambas fases (la estacionaria y la móvil).

El instrumental usado es sencillo y barato, presenta alta sensibilidad y gran rapidez. La excelente nitidez y la alta sensibilidad obtenida por este método; así como la amplia gama de adsorbentes y eluyentes existentes permiten la gran adaptabilidad del método y la reproducibilidad de sus resultados, lo que hace que sea adecuado para muchos propósitos analíticos (Randerath, 1969).

La sustancia a separar, disuelta, se aplica a una distancia de 1 a 2 cm del borde inferior de la placa. Después de la selección del disolvente o mezcla de éstos, se colocan las placas en una cámara de separación adecuada que lo contiene; la atmósfera de la cámara deberá estar previamente saturada de éste.

Las diferentes sustancias que componen la muestra serán arrastradas por el eluyente con velocidades diferentes, formándose manchas. Esto se produce por equilibrios de adsorción, reparto, intercambio iónico o combinación de éstos.

Después que el frente del eluyente ha recorrido cerca del 70% de la superficie se saca la placa de la cámara y se procede a su secado y revelado en caso necesario.

Como una medida de la velocidad de desplazamiento se refiere el valor del Rf de la siguiente forma:

$$R_f = D_1/D_2$$

D₁: distancia del centro de la mancha al origen.

D₂: distancia del frente del eluyente al origen.

Debido a las variaciones de Rf producidas por diferentes causas y no siempre controlables, es recomendable correr en el mismo cromatograma una muestra de patrón si es posible.

El valor de R_f depende de muchas variables que deben tenerse en cuenta en la elaboración y valoración del cromatograma para la obtención de resultados reproducibles, algunas de estas variables son: calidad y naturaleza del disolvente, espesor de la capa de soporte, actividad de esta, volumen de muestra aplicada, temperatura, humedad relativa, tiempo de desarrollo del cromatograma y volumen de la cámara.

El comportamiento del cromatograma depende tanto del solvente como del medio de oclusión; se necesita hacer una cromatografía radial para tener información previa sobre el poder de elución de la fase móvil.

Si los componentes de la muestra no se logran separar totalmente se utiliza entonces una cromatografía bidimensional.

Espectrofotometría directa UV-VIS:

Cuando sobre una especie molecular incide energía radiante, la misma absorbe radiación sólo en regiones específicas del espectro, esta energía está cuantizada, lo que conduce a una banda de absorción a la longitud de onda de la energía involucrada.

La región UV se divide en dos sub-regiones, la llamada UV al vacío o lejana, que se extiende desde 100 a 200 nm y la correspondiente al cercano de 200 a 350 nm. La región visible se extiende desde 350 hasta 780 nm. Los espectros UV en estado líquido se determinan utilizando cubetas de cuarzo y a longitudes de onda superiores a los 350 nm se pueden sustituir por cubetas de vidrio. En el ultravioleta lejano hay gran absorción de oxígeno y nitrógeno, por lo que se necesita un material óptico especial y detectores especiales, además en él absorben los solventes más comunes lo que hace más compleja su selección. En el ultravioleta cercano absorben determinados grupos funcionales y requiere de cubetas de cuarzo pues el vidrio absorbe fuertemente en esta región. En el visible absorben fundamentalmente las insaturaciones conjugadas.

Las bandas de absorción que presentan los compuestos orgánicos en las regiones UV- VIS se asocian comúnmente con transiciones electrónicas en la capa de valencia. Estas bandas de absorción son transiciones de tipo $\pi-\pi^*$, que pueden ser muy intensas (permitidas) o débiles (prohibidas); o $n-\pi^*$ que son generalmente prohibidas y por tanto serán débiles.

Siempre que sea posible se deben usar solventes apolares en el estudio de los espectros en disolución, ya que en los solventes polares las bandas $n-\pi^*$ pueden llegar a desaparecer. En particular esto sucede en los compuestos en que las bandas $n-\pi^*$ precedidas por bandas intensas $\pi-\pi^*$.

Las principales características de una banda de absorción son: posición, intensidad y forma.

La posición viene dada por la longitud de onda, cuya energía es la requerida para la transición electrónica según la condición de Bohr.

La intensidad de una banda de absorción puede expresarse como la absorptividad molar en el máximo ($\epsilon_{\text{máx.}}$), depende de la probabilidad de interacción entre los fotones de la radiación y el sistema electrónico de la molécula.

La forma de las bandas depende del número e intensidad relativa de los componentes vibracionales de una transición electrónica. (Delgado, M. 1992-93).

La utilización de la espectroscopía UV en análisis cualitativo es limitada porque las bandas de absorción tienden a ser anchas y por lo tanto carecen de detalles, no obstante se obtiene buena información sobre la presencia o ausencia de sustancias en las que pueden tener lugar las transiciones ya expuestas, las que pueden ser cuantificadas mediante sus señales.

El cumplimiento de la Ley de Lambert – Beer es la base de los métodos de análisis cuantitativos, la cual establece que la absorción de una solución es proporcional a la concentración del soluto.

Esta ley se expresa como:

$$A = a b c$$

Donde:

a: absorptividad.

b: camino óptico.

c: concentración. (Para que la absorptividad sea ϵ la concentración debe ser molar)

El comportamiento de una sustancia respecto a esta ley debe comprobarse construyendo un gráfico de absorbancia como función de la concentración.

En ocasiones los sistemas varían su absorbancia en forma no lineal a altas concentraciones ocurriendo desviaciones de dicha ley. Existen varias causas que provocan estas desviaciones, entre las que se encuentran: falta de monocromaticidad de la radiación empleada, asociaciones moleculares del soluto a altas concentraciones, ionización del soluto, fluorescencia, pobre transmisión del solvente, entre otras.

Esta técnica puede ser aplicada para determinar un componente en presencia de impurezas activas en UV si ambas presentan máximos de absorción con una diferencia aproximada de 100 nm (Skoog, 1997; Skoog, 1990; Willard, 1991).

Método combinado de CCD – Espectrofotometría UV:

Según (Heftmann, 1967) y (Randerath, 1969) el método se basa en puntear en la placa cromatográfica cantidades conocidas de la muestra y desarrollar el cromatograma en el sistema de solventes seleccionado. Una vez revelado el cromatograma se recorta el área de la mancha y se extrae con un solvente adecuado. Posteriormente se lee la solución en el espectrofotómetro e interpolando la absorción de la muestra en la curva de calibración de un patrón o comparando con una muestra patrón tratada de la misma manera se obtiene su concentración (Skoog, 1990; Skoog, 1997; Willard, 1991). (Torres, 2003).

Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

Las técnicas cromatográficas en general se basan en la separación de moléculas por procesos de migración diferencial (diferentes velocidades de transportación de moléculas de una mezcla arrastradas en una fase móvil a lo largo de una fase estacionaria). (Quattrochi, O Abelaira, S. y Laba, R 1992).

La cromatografía líquida de alta resolución es actualmente la técnica de separación más ampliamente utilizada debido a su versatilidad y amplio campo de aplicación. Los componentes de la muestra, previamente disueltos en un disolvente adecuado (fase móvil, FM), son forzados a atravesar la columna cromatográfica gracias a la aplicación de altas presiones. El material interno de la columna (fase estacionaria, FE) está constituido por un relleno capaz de retener de forma selectiva los componentes de la mezcla. La resolución de esta separación depende de la interacción entre la FE y la FM, pudiendo ser manipulada a través de la elección de diferentes mezclas disolventes y distintos tipos de relleno. Como resultado final los componentes de la mezcla salen de la columna separados en función de sus tiempos de retención en lo que constituye el cromatograma. A través del cromatograma se puede realizar la identificación cualitativa y cuantitativa de las especies separadas. (Dierksmeier G, 2005.)

De acuerdo a la polaridad relativa de las dos fases se distinguen dos tipos de cromatografía: cromatografía en fase normal y cromatografía en fase reversa. Los sistemas de solventes empleados constituyen la fase móvil (FM) y deben disolver totalmente la muestra sin destruirla. Además deben ser compatibles con la fase estacionaria (FE) y el sistema de detección. (Heftmann, E. 1967)

1.8 Diseño de experimentos.

El diseño experimental es el procedimiento de selección del número de vías y condiciones suficientes y esenciales para dar solución a un problema planteado con la precisión requerida, brindando un error en la determinación de los efectos de interés mucho menor que otro método.

Es frecuente que los químicos necesiten enfrentarse a numerosos problemas relacionados con la realización de experimentos más o menos costosos y complejos con el objetivo de obtener información sobre el sistema en estudio. Muchos son los ejemplos que pueden citarse al respecto: la síntesis de una reacción, las condiciones de realización de un experimento, la influencia de factores sobre las propiedades químico-físicas de un producto, y otras. En la mayoría de estos problemas químicos, se investiga cómo influyen diferentes condiciones de realización sobre una propiedad o característica del sistema investigado.

Los métodos de diseño de experimentos permiten sistematizar la forma de realización de las corridas experimentales y obtener la máxima información posible con la mínima cantidad de experimentos.

La importancia de un diseño de experimental radica en que disminuye, de forma considerable, la inversión de tiempo, de recursos materiales y humanos, estudia la variación simultánea de las variables determinantes del proceso, utiliza un aparato matemático que formaliza muchas acciones de los experimentos (planificación, preparación y realización) y brinda estrategias claras luego de tomar decisiones sustentadas a partir de cada serie de experimentos.

En Química y Tecnología Química, el diseño experimental se utiliza fundamentalmente en dos direcciones:

- Para el estudio de los mecanismos de procesos complejos y de las propiedades de sistemas multicomponentes.
- Para la optimización de los procesos y de las propiedades de los sistemas multicomponentes.

Para realizar un diseño de experimentos es necesario conocer el objeto de investigación, para lo cual se establece un método cibernético que consta de los parámetros de optimización y de los factores.

Un parámetro de optimización debe ser: efectivo desde el punto de vista investigativo, de naturaleza universal, cuantitativo y expresado mediante un valor

único así como efectivo estadísticamente. (Fernández. 2003).

Algunos conceptos generales relacionados con el diseño factorial experimental:

Factor: Las variables independientes que influyen o pueden influir sobre el proceso investigativo determinado son conocidas con el nombre de factores.

En un proceso químico los factores pueden ser: la temperatura, la presión, el pH, la concentración de un reactivo, el tiempo de reacción, etc. Las variables son designadas con la letra x, o sea: x_1, x_2, \dots, x_n , correspondientes a los factores 1, 2, ... n respectivamente.

Función respuesta: Cuando se realiza un experimento, los resultados se expresan a través de una o más variables dependientes, por ejemplo en Química: el rendimiento de una síntesis, la pureza de un reactivo que se obtiene o se purifica, el coste de un proceso de síntesis, entre otros. Estas propiedades que generalmente constituyen el blanco u objeto de estudio, son conocidas como función respuesta y se representan con la letra Y.

La función respuesta es función de los factores y puede expresarse como:

$$y = f(x_1, x_2, \dots, x_n)$$

Nivel del factor: Es el valor que puede tomar un factor; y el conjunto de factores que condicionan una vía.

Superficie de nivel: La forma geométrica de la función respuesta como función de los factores, es conocida como superficie de nivel.

Espacio factorial: Se denomina así al espacio comprendido por los ejes del sistema de coordenadas en que se representan los valores de los factores (Fernández. 2003).

1.9 Validación de métodos analíticos.

La validación de los métodos analíticos utilizados en las actividades de control desempeñan un papel determinante pues de ellos depende la comprobación confiable y reproducible de los índices de calidad de las materias primas, productos o cualquier resultado de una determinación analítica que se realice, lo

cual contribuye notablemente al aseguramiento de la calidad, seguridad y eficiencia de los mismos.

¿Por qué la validación de los métodos analíticos?

La necesidad de efectuar una validación podría resumirse en:

- Proporcionar un alto grado de confianza y seguridad en el método analítico y en la calidad de los resultados, lo que se traduce en una disminución del número de fallos y repeticiones, con el consiguiente ahorro de los costos asociados.
- Permitir un conocimiento profundo de las características de funcionamiento del método analítico.
- Hacer posible el cumplimiento de las exigencias legales.

1.9.1 Linealidad.

Se entiende como linealidad, la capacidad de un método analítico de obtener resultados linealmente proporcionales a la concentración de analito en la muestra dentro de un intervalo.

Dentro de este término se incluye la proporcionalidad entre la concentración de analito y la respuesta, así como el intervalo o rango de concentraciones de analito para los cuales el método es satisfactorio. Debe definirse la linealidad para concentraciones que cubran el ámbito total de interés.

El ensayo de linealidad puede efectuarse tanto sobre soluciones patrones del analito como sobre muestras problemas que contengan concentraciones crecientes del mismo. Para la realización de este ensayo en primer lugar conviene cerciorarse de que el intervalo lineal dinámico del sistema instrumental sea más amplio que el intervalo de concentraciones a estudiar, para lo cual debe efectuarse un tanteo previo con varios patrones que abarquen un rango de concentraciones más amplio que el intervalo de concentraciones a establecer. Posteriormente se preparan una serie de patrones del analito de concentraciones

crecientes. El número de soluciones patrones puede estar comprendido entre 3 y 10 y el intervalo de concentraciones se selecciona de acuerdo con las cantidades esperadas de analito en la muestra.

Interpretación estadística de la regresión:

a) Por el coeficiente de correlación: El coeficiente de correlación (r) refleja el grado de relación entre las variables "x" (concentración) e "y" (respuesta). Su valor máximo es 1. Si r es cercano a 0, el ajuste es pobre y la relación es débil o no existe; si r es cercano a la unidad, el ajuste es bueno y esto es indicativo de una fuerte relación entre "x" e "y", o sea, significa que existe correlación con una probabilidad elevada. Existen tablas de r que dan el grado de significación del valor obtenido para dicho coeficiente.

En análisis químico se obtienen valores de r elevados, iguales o superiores a 0.999, si bien, en análisis de trazas se aceptan valores más bajos (iguales o superiores a 0.990).

Valores muy elevados de r no deben tomarse erróneamente como indicadores de linealidad; la linealidad se demuestra estadísticamente por otros procedimientos.

No conviene, por tanto, fijarse solo en la ecuación deducida y en el coeficiente de correlación para saber si la relación es lineal o presenta curvatura, sino que resulta recomendable ver la representación gráfica de los diferentes valores y del resultado del ajuste.

b) *Por ensayos de linealidad.* Existen varios procedimientos para verificar la linealidad:

I- Coeficiente de variación de los factores respuesta.

El factor de respuesta es la relación entre la lectura y la concentración. En una calibración lineal los factores de respuesta deben ser semejantes entre sí y cercanos al valor de la pendiente. Se considera que coeficientes de variación superiores al 5 % indican falta de linealidad. El coeficiente de variación de los factores respuestas se obtienen según:

$$CV_f = \frac{S_f}{\bar{f}} \cdot 100$$

II- Significación estadística de la varianza de la pendiente **m** de la recta de regresión, $y=mx+ b$. [37]

La pendiente **m** se llama también coeficiente de regresión. A mayor pendiente, mayor sensibilidad.

El coeficiente de variación de la pendiente CV_m (%) se utiliza como expresión matemática de la linealidad y su criterio de aceptación es: CV_m (%) \leq 2 %. Este parámetro se determina según la ecuación:

$$CV_m = \frac{S_m}{m} \cdot 100$$

Los límites de confianza de la pendiente se hallan a partir de la expresión:

$m \pm \frac{S_{m \cdot t}}{\sqrt{n}}$ siendo t el valor de la distribución t de student para $n-2$ grados de

libertad a la probabilidad escogida (generalmente $p= 0.05$).

Otro test estadístico para **m** es el de la prueba de hipótesis, a partir de la cual, si $t_{exp} > t_{tab}$ ($n-2$, $p=0.05$), entonces existe regresión pues $m \neq 0$.

La t experimental es determinada según:

$$t_{exp} = \frac{|m|}{S_m}$$

c) *Por test de proporcionalidad.*

En el caso ideal el valor de la intersección con el eje de las ordenadas u ordenada en el origen **a** debe ser cero, y cuando no se cumple este criterio indica un error sistemático del método. Los límites de confianza del término

independiente son: $b \pm \frac{S_{b \cdot t}}{\sqrt{n}}$, siendo t el valor de la distribución t de student para

$n-2$ grados de libertad a la probabilidad escogida ($p=0.05$). Si este límite de confianza incluye al cero, entonces se cumple la condición de proporcionalidad.

La significación estadística de b se deduce también de la expresión:

$$t_{\text{exp}} = |b| / S_b.$$

1.9.2 Precisión.

La precisión es el grado de concordancia entre los valores de una serie repetida de ensayos analíticos efectuados sobre una muestra homogénea, o la distribución de los valores analíticos alrededor de su media. Es la estimación de la variabilidad de las mediciones. Expresa la capacidad del método para dar resultados semejantes cuando se aplica repetidamente a una muestra.

Cuando el estudio de precisión requiere la repetición del análisis sobre una muestra incluyendo todo el procedimiento analítico, desde la preparación de la muestra hasta la lectura instrumental, se le denomina precisión del método. Si el estudio consiste en hallar la variabilidad de respuesta de una disolución patrón entonces se le denomina precisión del sistema instrumental.

La precisión mide el error aleatorio, o indeterminado de un análisis. Los parámetros de calidad de la precisión son la desviación estándar absoluta, desviación estándar relativa, coeficiente de variación y varianza. Estos parámetros se definen a continuación:

❖ Desviación estándar absoluta, s $s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$

❖ Desviación estándar relativa, RSD $RSD = \frac{s}{\bar{x}}$

❖ Coeficiente de variación, CV $CV = \frac{s}{\bar{x}} \times 100\%$

❖ Varianza, s^2

❖ Dentro del término precisión del método se pueden distinguir tres tipos de estudios:

1.9.2.1 Repetibilidad: Es la medida de la precisión de un método realizado bajo las mismas condiciones, sobre la misma muestra, por un mismo analista, en el mismo laboratorio, con los mismos aparatos y reactivos y en el curso de la misma serie de análisis realizados en un corto intervalo de tiempo.

Algunos autores plantean que la repetibilidad puede ser evaluada usando:

- I. Un mínimo de 9 determinaciones de la sustancia de interés variando los niveles de concentraciones especificados para el procedimiento, por ejemplo 3 concentraciones diferentes con 3 réplicas cada una.
- II. Un mínimo de 6 determinaciones y calcular la media aritmética (\bar{X}), desviación estándar (S), desviación estándar relativa y coeficiente de variación (CV).

1.9.2.2 Reproducibilidad: es la medida de la precisión de los resultados de un método analítico efectuados sobre una misma muestra pero en condiciones diferentes. Cuando la medida se realiza en laboratorios diferentes se habla de precisión entre laboratorios, por ejemplo en estudios colaborativos, estandarizaciones de metodologías, etc.

Se pueden encontrar reportados en la literatura valores típicos de desviaciones típicas relativas aceptables para la precisión (repetibilidad y reproducibilidad) basadas en las concentraciones del analito (Tabla 1.4).

En la Regulación 41 del CECMED se plantea que los resultados de los estudios de precisión se expresarán en términos de CV(%), cuyo valor para la repetibilidad no excederá el 3% y para la reproducibilidad no excederá el 5% de variabilidad total en ensayos físico-químicos. Generalmente se aceptan variabilidades menores para algunos métodos como los cromatográficos ($\leq 2\%$) y los espectrofotométricos ($\leq 3\%$).

1.9.3 Exactitud.

Según la IUPAC, la exactitud se define como el grado de concordancia de un resultado (o la media aritmética de un grupo de resultados) con el valor verdadero estimado o aceptado del componente químico que se está midiendo. Sobre este parámetro influye cada una de las etapas del proceso analítico, desde la toma de muestra hasta la obtención del resultado, siendo en la mayoría de los casos la propia medida analítica la de menor influencia. Los errores sistemáticos dan lugar a desviaciones, siempre en el mismo sentido de los resultados obtenidos respecto al valor verdadero; se deben a varias causas entre las que se encuentran defectos en el método, prácticas de análisis deficientes, mal funcionamiento de los instrumentos, patrones incorrectos, efectos de matriz, presencia de contaminación, errores en la curva de calibrado, pérdidas del elemento a determinar, etc. El error sistemático es aquel componente del error de medida que permanece constante o varía de una manera predecible, durante el curso de un número de medidas repetidas de la misma muestra.

Matemáticamente la exactitud se expresa en forma de porcentaje de recuperación de la cantidad de analito presente en la muestra, o bien en forma de diferencia entre el valor hallado y el valor verdadero. El criterio de aceptación establecido es: $R = 97-103 \%$.

Estadísticamente suele efectuarse una prueba t de Student para determinar si el valor medio hallado y el valor considerado verdadero no difieren significativamente para un grado de probabilidad determinado.

Si $t_{cal} < t_{(N-1; \alpha)}$ cuando $\alpha = 0.05$ el método puede ser considerado exacto.

La determinación de la exactitud se puede llevar a cabo según:

a) Análisis repetitivo de una muestra de concentración única conocida. Se analiza varias veces la muestra de concentración conocida de analito patrón y se evalúa la exactitud expresando los resultados en porcentaje respecto al teórico (recuperación), además se efectúa una prueba t.

- b) Análisis repetitivo de varias muestras de concentraciones diferentes conocidas.
- c) Método de adición de patrón.
- d) Comparación con otro método analítico ya validado.

Materiales y métodos

CAPÍTULO II: PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Reactivos y Equipamiento.

Reactivos químicos:

Etanol técnico clase A, cloroformo (p.a.), isobutilamina, furfural (recién destilado), nitroetano, carbón activado, acetonitrilo (HPLC), agua destilada.

Utensilios y medios de medición:

Balanza analítica Sartorius.

Placas cromatográficas Merck de silicagel 60 sobre aluminio 6 x 2.5 cm.

Microjeringuilla Hamilton 88000 de 5 μ L.

Espectrofotómetro UV-VIS

Cubetas de cuarzo de 6 mm.

Papel negro

Pipeta graduada de 5 mL y 10 mL

Pipeta aforada de 1 mL y 5 mL

Matraces aforados de 10, 25 y 50 mL.

Cromatógrafo Pharmacia LKB(Suizo) Columna Econocil C18 (largo 250mm, ID 4.6mm)

2.2 Preparación del patrón de UC-244.

Se realiza la síntesis del UC-244 a partir de furfural, nitroetano y utilizando como catalizador la isobutilamina. Posteriormente se filtra el producto crudo que ha sido cristalizado a baja temperatura. Luego se disuelve en etanol calentando y se agrega carbón activado para eliminar impurezas, se filtra y se deja recristalizar a bajas temperaturas. Este proceso de purificación se repite dos veces.

Registro de las señales por HPLC.

Se registra el espectro de HPLC para el patrón de UC-244, para ello se toma una masa de 0.001 g y se enrasa en un matraz aforado de 10 mL (100 ppm) en

acetonitrilo-agua (80:20), de esta disolución se toma una alícuota de 2 mL y se lleva a un matraz aforado de 10 mL (20 ppm). Se compara el tiempo de retención de la señal obtenida con la referida por otros investigadores (Z. Rodríguez, 2005).

Registro del espectro UV.

Se registra el espectro de una disolución de UC-244 de concentración 20 mg/L en la región UV para corroborar la longitud de onda de máxima absorción de dicho compuesto.

2.3 Método combinado de CCD – Espectrofotometría UV-VIS.

Este método se basa en la combinación de la capa delgada con las mediciones espectrofotométricas. Se prepara una muestra y se corre en una placa cromatográfica, con el objetivo de eliminar las posibles impurezas, luego se recorta la mancha amarilla perteneciente al UC-244 y se pasa a la medición de la absorbancia en el espectrofotómetro a la longitud de onda de máxima absorción determinando la concentración de UC-244 presente en la muestra en una curva de calibración.

2.4 Comprobación de algunos parámetros de validación de la técnica analítica.

Aunque esta técnica combinada ha sido validada anteriormente (Z. Rodríguez, 2005), se decidió revalidar el procedimiento teniendo en consideración la variación en algunas de las condiciones para la determinación, tales como el espectrofotómetro empleado, la calidad de las placas de silicagel y el analista.

2.4.1 Preparación de la curva de calibración

Se pesa en balanza analítica 1.0 g de UC-244, se disuelve en etanol y se enrasa en un matraz de 50 mL. De esta disolución se toman alícuotas de 4, 5, 7, 8, 9 y

10 mL y se enrasan en volumétricos de 10 mL. De estas soluciones se aplican 5 μ L en la placa cromatográfica; luego de desarrollado el cromatograma en cloroformo se recorta y se eluye la mancha de color amarillo perteneciente al UC-244 en 5 mL de etanol y se procede a realizar la lectura de la absorbancia a 350 nm.

2.4.2 Determinación de la precisión

La precisión del método se estudió a través del análisis de la repetibilidad y la reproducibilidad intermedia.

Repetibilidad:

Se pesa 1.0 g de UC-244, se disuelve en etanol y se enrasa en un matraz de 50 mL. De este se toma una alícuota de 7 mL y se lleva a un matraz de 10 mL. Luego se toman 5 μ L y se corre el cromatograma en cloroformo, se recorta la mancha, se eluye en 5 mL de etanol y se procede a realizar la lectura de la absorbancia a 350 nm.

Se realizan réplicas de este ensayo.

Se calculó:

La concentración media de los 5 resultados, X_m

La desviación estándar, S

El coeficiente de variación de la repetibilidad (CV_r) de los 5 resultados.

Tomando como criterio de repetibilidad que el CV_r sea menor de un 3%.

Reproducibilidad:

Se realiza el mismo procedimiento anterior en días diferentes pero manteniendo las mismas condiciones.

Se calculó:

La concentración media de los 8 resultados, X_m

La desviación estándar, S

El coeficiente de variación de la repetibilidad (CV_r) de los 8 resultados.

Tomando como criterio de repetibilidad que el CV_r sea menor de un 5%.

2.5 Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

Las técnicas cromatográficas en general se basan en la separación de moléculas por procesos de migración diferencial (diferentes velocidades de transportación de moléculas de una mezcla arrastradas en una fase móvil a lo largo de una fase estacionaria). (Quattrochi, O Abelaira, S. y Laba, R.1992).

2.5.1 Preparación de la curva de calibración.

Se pesa en microbalanza 2mg de UC-244, se disuelve en acetronitrilo y se enrasa en un matraz de 10 mL. De esta disolución se toman alícuotas de 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3 mL y se enrasan en volumétricos de 2 mL. De estas soluciones se inyectan 20 μ L en el cromatógrafo; luego de la corrida a una longitud de onda de 364 nm se obtienen las áreas a diferentes concentraciones.

2.6 Influencia de diferentes factores en el proceso de síntesis a escala de 6 moles.

Se aplica un diseño factorial fraccionado 2^2 que consta de 4 experimentos para seleccionar las mejores condiciones de síntesis a escala de 6 moles como se muestra en la tabla 2.1. Se desarrolló la técnica Espectrofotometría UV-Vis combinada con una previa separación por CCD (Cromatografía de capa delgada) en la cuantificación del crudo obtenido en el proceso de síntesis.

Tabla 2.1 Variables y niveles del diseño 2^2 en la síntesis a escala de 6 moles.

| Niveles | t. contacto(min) | Temperatura($^{\circ}$ C) |
|---------|------------------|----------------------------|
| N.S | 45 | 114 |
| N.I | 30 | 100 |
| N.B | 37.5 | 107 |
| I.V | 7.5 | 7 |

La matriz del diseño se presenta en la tabla 2.2. Las funciones respuestas seleccionadas para evaluar este diseño son: el rendimiento analítico de la síntesis y el % de pureza del UC-244 crudo.

Tabla 2.2 Matriz del diseño 2² aplicado a la síntesis a escala de 6 moles.

| No. Exp | t.contacto | Temperatura |
|---------|------------|-------------|
| 1 | -1 | -1 |
| 2 | +1 | -1 |
| 3 | -1 | +1 |
| 4 | +1 | +1 |
| 1* | -1 | -1 |
| 2* | +1 | -1 |
| 3* | -1 | +1 |
| 4* | +1 | +1 |

Al evaluar los resultados de los experimentos del diseño se aplicó el programa Statgraphics Centurion versión 5 para obtener los coeficientes de las funciones respuestas empleadas y su significación estadística.

2.7 Influencia de diferentes factores en el proceso de purificación.

El procedimiento consiste en pesar la cantidad de carbón adsorbente que ha sido activado durante dos horas a una temperatura de 110 ° C, de acuerdo a la matriz de diseño, después de haber disuelto la cantidad especificada de UC-244 crudo con la cantidad de alcohol etílico caliente a la temperatura indicada por la matriz. Una vez transcurrido el tiempo de contacto establecido se filtra en caliente; el carbón activado impuro se coloca aparte y el licor con el UC-244 purificado se deja cristalizar en una nevera a una temperatura alrededor de 5 °C.

Después de concluido el proceso de cristalización, se filtran los cristales del producto puro, se deja secar, se pesa y se repite a este producto el procedimiento anterior. Luego se somete a análisis químico de pureza una vez que la masa de cristales ha sido secada a una temperatura de 35 °C en estufa durante 40 minutos.

Las variables estudiadas y sus niveles, así como la matriz del diseño se muestran en las tablas 2.3 y 2.4, respectivamente. La función respuesta seleccionada para evaluar este diseño es: el % de UC-244, el cual se determinó aplicando la técnica de HPLC y calculando el área debajo del pico.

Tabla 2.3 Factores y niveles del diseño factorial fraccionado 2³ aplicado al proceso de purificación del UC-244.

| Niveles | X₁ Etanol mL/g UC-244 | X₂ carbón activado g/g UC-244 | X₃ Temperatura (°C) |
|----------------|---|---|---|
| NS | 6 | 0.75 | 40 |
| NI | 4 | 0.5 | 35 |
| NB | 5 | 0.625 | 37.5 |

Tabla 2.4 Matriz del diseño 2³ aplicado al proceso de purificación.

| Exp. | X₁ | X₂ | X₃ |
|-------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| 1 | -1 | -1 | -1 |
| 2 | +1 | -1 | -1 |
| 3 | -1 | +1 | -1 |
| 4 | +1 | +1 | -1 |
| 5 | -1 | -1 | +1 |
| 6 | +1 | -1 | +1 |
| 7 | -1 | +1 | +1 |
| 8 | +1 | +1 | +1 |

Al evaluar los resultados de los experimentos del diseño se aplicó el programa Statgraphics Centurion versión 5 para obtener los coeficientes de la función respuesta % UC-244 y su significación estadística.

Análisis y discusión de los resultados

CAPÍTULO III: ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

3.1 Patrón de UC-244.

En la figura 3.1 aparece el cromatograma realizado por HPLC del patrón de UC-244, su pureza calculada por el área bajo la curva es de 100 %, su tiempo de retención es de 8.050 min y su temperatura de fusión, esta entre los 46.7 y 47.7 °C. Lo anteriormente descrito coincide con lo reportado en trabajos anteriores, con lo que corroboramos la disponibilidad de este producto para ser utilizado como patrón.

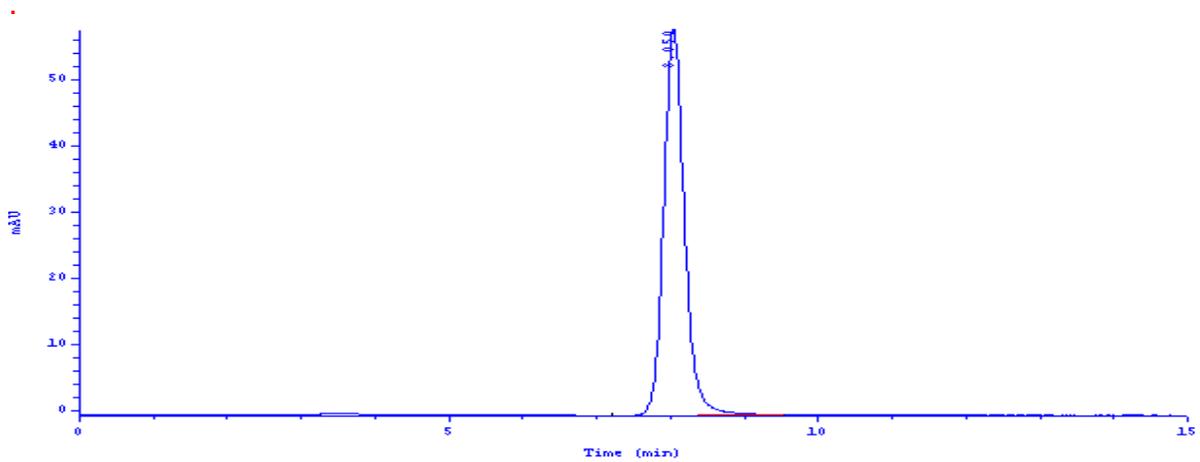


Figura 3.1: Cromatograma por HPLC del patrón de UC-244.

En la figura 3.2 se muestra el espectro realizado en etanol para corroborar la longitud de onda de máxima absorción siendo esta de 350nm.

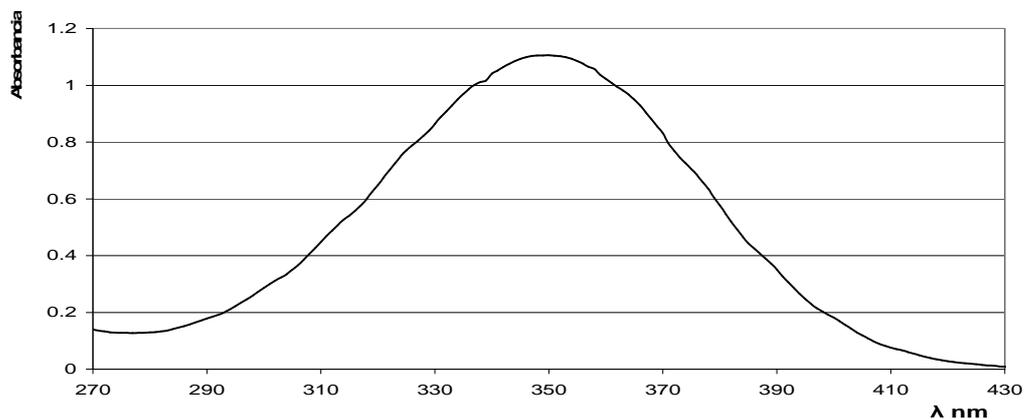


Figura 3.2 Espectro de UC-244.

3.2 Comprobación de algunos parámetros de validación de la técnica analítica CCD- Espectrofotometría UV-Vis.

3.2.1 Linealidad

En la figura 3.3 y la tabla 3.1 se muestran la curva de calibrado y los resultados del estudio de linealidad realizado al patrón de UC-244 respectivamente.

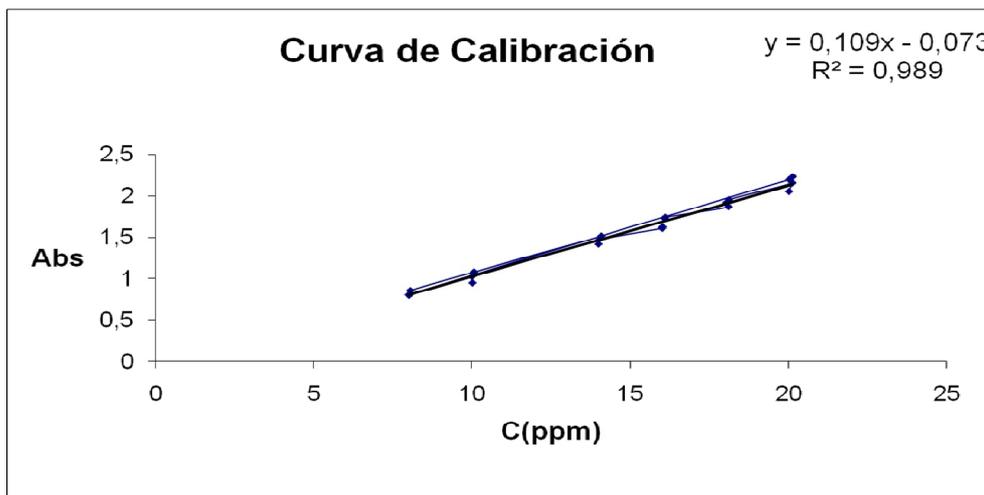


Figura 3.3 Curva de calibración de UC-244

Ecuación de la curva de calibración: **Abs = 0.1098 *Conc - 0.073**

Coeficiente de correlación: 0.989

En la siguiente tabla 3.1 se muestran los valores de absorbancia para cada concentración y los factores respuesta ($F=y/x$).

Tabla 3.1 Resultados del estudio de linealidad en la determinación de UC-244.

| conc(ppm) | Abs1 | Abs2 | Abs3 | F1 | F2 | F3 |
|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 8.014 | 0.797 | 0.807 | 0.815 | 0.099 | 0.101 | 0.102 |
| 10.017 | 1.025 | 1.023 | 1.077 | 0.102 | 0.102 | 0.108 |
| 14.001 | 1.416 | 1.471 | 1.513 | 0.101 | 0.105 | 0.108 |
| 16.017 | 1.604 | 1.661 | 1.622 | 0.100 | 0.104 | 0.101 |
| 18.031 | 1.915 | 1.87 | 1.953 | 0.106 | 0.104 | 0.108 |
| 20.022 | 2.051 | 2.192 | 2.153 | 0.102 | 0.109 | 0.108 |

Tratamiento estadístico:

| | |
|-----------------|-----------------|
| S | 0.003183 |
| F(media) | 0.104 |
| C.V | 3.062846 |

Siendo el coeficiente de variación de la función respuesta 3.06 %, el cual es menor que el 5 %, que es el criterio de aceptación para este parámetro.

3.2.2 Precisión

En la tabla 3.2 y 3.3 se muestran los resultados de la repetibilidad y reproducibilidad respectivamente, realizados con un patrón de UC-244.

Tabla 3.2 Resultados de repetibilidad.

| Réplicas | Conc.(ppm) | Tratamiento estadístico |
|----------|------------|--|
| 1 | 14.235 | Xm =14.200 S = 0.160 CV = 1.127% t _{exp} = 2.713 t _{tab} = 2.776 |
| 2 | 14.107 | |
| 3 | 14.289 | |
| 4 | 13.979 | |
| 5 | 14.389 | |

Tabla 3.3 Resultados de reproducibilidad

| Réplicas | Conc. (ppm) | Tratamiento estadístico |
|----------|-------------|--|
| 1 | 13.597 | Xm =13.742 S = 0.478 CV = 3.483% |
| 2 | 13.033 | |
| 3 | 13.898 | |
| 4 | 13.179 | |

| | | |
|---|--------|--|
| 5 | 13.597 | |
| 6 | 14.171 | |
| 7 | 14.062 | |
| 8 | 14.399 | |

Siendo los coeficientes de variación para la repetibilidad y la reproducibilidad menores que el 3% y el 5 % respectivamente que son los criterios de aceptación para estos parámetros, por tanto el método es preciso. Además el método es exacto ya que se cumple que la $t_{exp} < t_{tab}$.

3.3 Curva de Calibración de UC-244 por la técnica de HPLC.

En la figura 3.4 se muestra la curva de calibración realizada con el patrón de UC-244 por la técnica HPLC, la cual me permite calcular el % de UC-244 de cada muestra en el proceso de purificación.

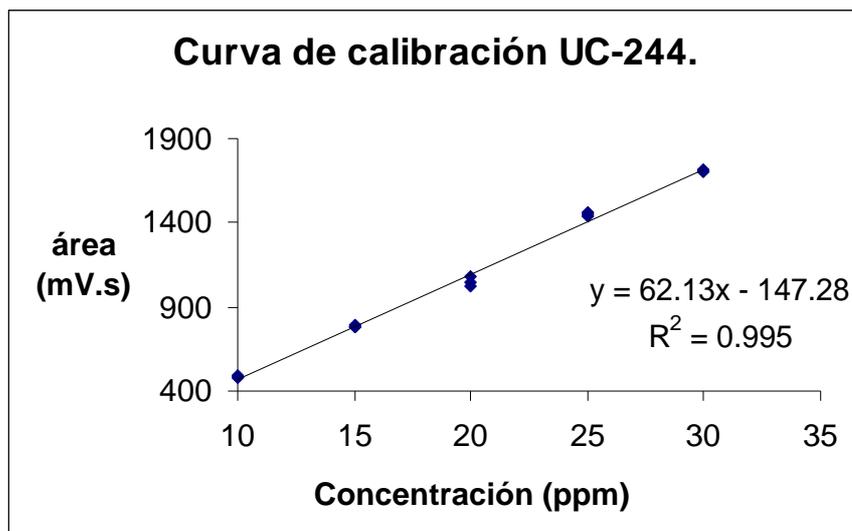


Figura 3.4 Curva de calibración del UC-244 aplicando la técnica HPLC.

Ecuación de la curva de calibración: **Área = 62.13 *Conc - 147.28**

Coeficiente de correlación: **0.995**

3.4 Influencia de diferentes factores en el proceso de síntesis a escala de 6 moles.

En la tabla 3.4 se presentan los resultados de las funciones respuesta: rendimiento y pureza, del diseño 2^2 aplicado en la síntesis a escala de 6 moles.

Tabla 3.4 Resultados obtenidos al aplicar el diseño factorial fraccionado 2^2 en la síntesis del principio activo a escala de 6 moles.

| Exp. | Masa teórica(g) | Masa crudo(g) | Rend. (%) | Pureza (%) | Masa Analítica(g) |
|-------------|------------------------|----------------------|-------------------|-------------------|--------------------------|
| 1 | 918.82 | 837.24 | 91.12 | 93.62 | 783.82 |
| 2 | 918.82 | 864.23 | 94.06 | 92.42 | 798.72 |
| 3 | 918.82 | 832 | 90.55 | 91.15 | 758.37 |
| 4 | 918.82 | 860.2 | 93.62 | 90.79 | 780.98 |
| 1* | 918.82 | 847.72 | 92.26 | 86.2 | 730.73 |
| 2* | 918.82 | 873.18 | 95.03 | 95.75 | 836.07 |
| 3* | 918.82 | 863.18 | 93.94 | 84.35 | 728.09 |
| 4* | 918.82 | 863.08 | 93.93 | 99.22 | 856.35 |

El procesamiento de los datos de la Tabla 3.4 mediante el programa profesional Statgraphic Plus Version 4.1 respecto a la masa de producto crudo aparece en el anexo 1 que contiene el análisis de varianza (ANOVA) del cual resulta que ninguna de las dos variables tiene un efecto significativo sobre esa función respuesta pero, se comprueba que para la variable tiempo de contacto, el valor de la probabilidad P es de 0.0558 mientras que para la variable temperatura ese valor es de 0.9089 por lo cual la mayor influencia es ejercida por la primera variable.

Lo anterior es observado gráficamente y de una manera más explícita en las figuras 3.4 y 3.5, que muestran el efecto de esas interacciones.

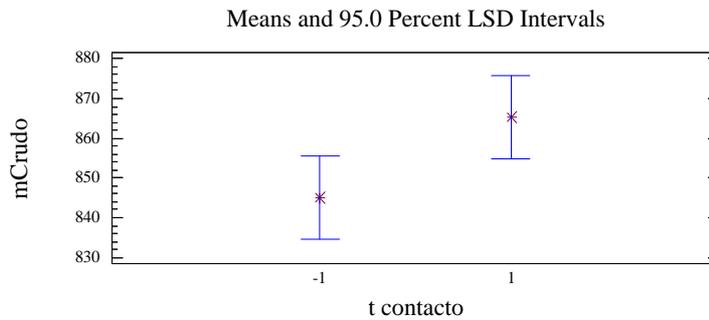


Figura 3.5 Influencia del tiempo de contacto sobre la masa cruda de UC-244

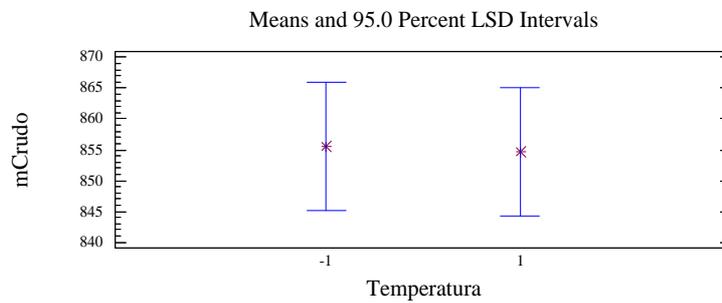


Figura 3.6 Influencia de la temperatura sobre la masa cruda de UC-244

Estos resultados (anexo 3) indican que existe una mayor influencia, no despreciable, del tiempo de contacto sobre la masa del producto de la reacción. Es posible predecir la masa máxima a alcanzar en esta reacción a partir de los datos del anexo No.2 donde se refleja el análisis de medias según los niveles de las dos variables empleadas para la ejecución del diseño.

Los resultados de la regresión múltiple indican, Anexo No. 4 que la ecuación que describe el proceso en las condiciones especificadas es:

$$m \text{ Crudo} = 855.104 + 10.0688 * t \text{ contacto}$$

Al procesar los resultados se obtienen las mejores condiciones que se presentan a continuación en la tabla 3.5.

Tabla 3.5 Mejores condiciones de síntesis a escala de 6 moles

| VARIABLE | NIVEL | VALOR |
|--------------------|-----------|---------|
| Furfural | constante | 497 mL |
| Nitroetano | constante | 456 mL |
| Isobutilamina | constante | 23.5 mL |
| Temperatura | -1 | 100 °C |
| Tiempo de contacto | +1 | 45 min |

Resultados de la función respuesta pureza de UC-244

En el análisis de la función respuesta % de pureza de las masas de crudo obtenidas en el diseño se observa que ninguna de las variables influye de manera significativa sobre dicha propiedad siendo los valores de probabilidad encontrados mucho mayores que para la respuesta precedente, anexo no.5. Del mismo modo el análisis de medias para % de pureza se encuentra en el anexo No. 6 y el análisis de regresión efectuado muestra que la ecuación más probable que describe el proceso se ajusta a la expresión:

$$\text{Pureza} = 91.69 + 2.86 * t \text{ contacto}$$

De la ecuación anterior se puede señalar que la pureza promedio más pequeña que se logra es del orden 91.68 %, ver anexo 6, con un ligero incremento debido al factor tiempo de contacto cuestión que también puede ser ilustrada según los gráficos de los intervalos de medias y LSD anexos 7 y 8.

Resulta de interés estadístico y experimental considerar la homogeneidad de los resultados experimentales de pureza. Lo anterior se manifiesta al procesar los datos con un análisis de varianza simple (One- Way) y observar los resultados en los anexos No.9 y No.10 donde se aprecia que los datos de pureza provienen

de una distribución normal. A continuación pueden observarse los estadígrafos más importantes.

Tabla 3.6 Valores de homogeneidad de resultados de la pureza

| Estadígrafo | Valor |
|--------------------------------|----------------|
| N | 8 |
| Media | 91.68 |
| Varianza | 23.22 |
| Desviación estándar | 4.82 |
| Mínimo | 84.35 |
| Máximo | 99.22 |
| Rango | 14.87 |
| Asimetría estandarizada | -0.1162 |
| Curtosis estandarizada | -0.1451 |

3.5 Influencia de diferentes factores en el proceso de purificación del UC-244.

En este proceso se utilizó la técnica de HPLC para la cuantificación de la materia prima, donde se evidencia que en el proceso de purificación no son eliminadas totalmente las impurezas.

En la tabla 3.7 se presentan los resultados de la función respuesta: % de UC-244, del diseño 2³ aplicado al proceso de purificación.

| Exp. | Área Impureza 1 | Área Impureza 2 | Área UC-244 | Conc.(ppm) UC-244 | % UC-244 | Masa Analítica |
|-------------|------------------------|------------------------|--------------------|--------------------------|-----------------|-----------------------|
| 1 | 302.337 | 103.170 | 632.830 | 12.556 | 62.780 | 0.126 |
| 2 | 303.269 | 142.329 | 791.460 | 15.109 | 75.546 | 0.151 |
| 3 | 179.526 | 10.000 | 264.557 | 6.629 | 33.143 | 0.066 |
| 4 | 299.000 | 131.458 | 694.322 | 13.546 | 67.729 | 0.135 |
| 5 | 133.714 | 134.350 | 526.068 | 10.838 | 54.189 | 0.108 |
| 6 | 295.268 | 138.127 | 742.254 | 14.317 | 71.587 | 0.143 |
| 7 | 269.708 | 100.143 | 607.560 | 12.149 | 60.747 | 0.121 |
| 8 | 340.919 | 122.157 | 688.972 | 13.460 | 67.299 | 0.135 |

Tabla 3.7 Resultados del proceso de purificación.

El procesamiento de los datos de la Tabla 3.7 mediante el programa profesional Statgraphic Centurion Version 5 respecto al % de UC-244 se observa que en el

análisis de varianza (ANOVA) del cual resulta que ninguna de las variables tiene un efecto significativo sobre la función respuesta.

Lo anterior es observado gráficamente y de una manera más explícita en las figuras 3.6 y 3.7, que muestran el efecto de esas interacciones.

Un importante control sobre la purificación del principio activo UC-244, se manifestó al variar diferentes niveles tanto de la temperatura, volumen de etanol, carbón activado, sin que existiera una marcada influencia estadísticamente significativa de cada una de las variables sobre el % de UC-244 obtenido.

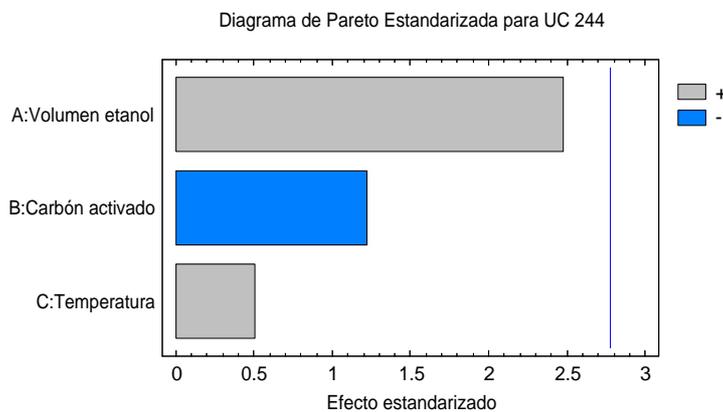


Figura 3.7 Influencia de las variables sobre el proceso de purificación de UC-244.

Al analizar el diagrama de Pareto se puede observar como el etanol tiene una marcada influencia sobre la purificación de UC-244, incrementándose el efecto potenciador con el aumento de los niveles de etanol, en orden le sigue el carbón activado y por último la temperatura.

Al analizar el efecto por separado de cada una de las variables (Volumen de etanol, Carbón activado, Temperatura) se tiene que si bien al aumentar la temperatura tiene influencias positivas aunque no significativa, esto lo hace a expensas de que el proceso de adsorción es un proceso exotérmico y por tanto

un incremento de la temperatura favorece el proceso contrario, o sea la desorción. Lo anterior no resulta del todo favorable si se tiene en cuenta que el carbón activado puede no mostrar selectividad diferenciada entre las impurezas y el principio activo y por consiguiente, la desorción puede también ocurrir tanto para las impurezas como para el UC-244.

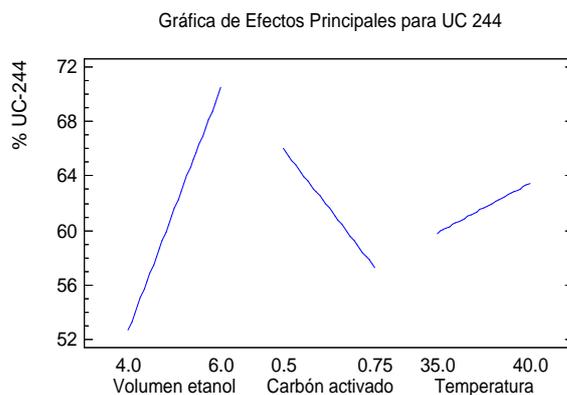


Figura 3.8 Influencia de cada una de las variables sobre el % de UC-244.

Queda claro en la figura anterior que aunque los niveles de carbón activado no tienen influencia significativa sobre la respuesta, este lo hace disminuyendo el % de UC-244 en el proceso de purificación.

Los resultados de la regresión indican que la ecuación del modelo ajustado es:

$$\% \text{ UC-244} = 11.6338 + 8.91275 \cdot \text{Volumen etanol} - 35.184 \cdot \text{Carbón activado} + 0.7312 \cdot \text{Temperatura}$$

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo, así ajustado, explica 66 % de la variabilidad en % UC 244. El estadístico R-cuadrada ajustada, que es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes, es 41.1% y por otro lado, el error estándar del estimado muestra que la desviación estándar de los residuos es 10.1753, lo que indica que el modelo no tiene un buen ajuste pero que sirve como punto de referencia para tomar nuevas decisiones en cuanto a los niveles de los factores.

Conclusiones

CONCLUSIONES

1- Las mejores condiciones obtenidas a partir del diseño factorial 2^2 durante el proceso de síntesis a escala de 6 moles son:

Las cantidades de materias primas son, 497 mL de furfural, 456 mL de nitroetano, 23.5 mL de isobutilamina, el tiempo de contacto de 45 minutos para una temperatura del sistema de 100 °C y un tiempo de reacción de 3.5 horas.

2- El rendimiento en base al UC-244 crudo obtenido puede llegar a 94 % empleando las mejores condiciones durante el proceso de síntesis.

3- Los niveles de los factores utilizados en el proceso de purificación no introdujeron resultados significativos en la pureza del principio activo.

4- La temperatura tiene influencias positivas lo que no resulta del todo favorable si se tiene en cuenta que el carbón activado puede no mostrar selectividad diferenciada entre las impurezas y el principio activo y por consiguiente, la desorción puede también ocurrir tanto para las impurezas como para el UC-244.

Recomendaciones

RECOMENDACIONES

- 1- Continuar los estudios de los factores que intervienen en los procesos de síntesis y purificación del UC-244, con el objetivo de elevar su eficiencia total.
- 2- Aislar y caracterizar las impurezas asociadas al principio activo, lo cual es extremadamente importante para el registro de una forma terminada.
- 3- Estudiar el comportamiento de las isothermas de adsorción en carbón activado tanto para el principio activo como para las impurezas.
- 4- Encontrar los niveles de los factores experimentales que introduzcan cambios significativos en la pureza del UC-244.
- 5- Realizar estudios sobre la desactivación de los licores, los alcoholes y el carbón que constituyen residuales de los procesos de síntesis y purificación.

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

- Alpizar J. M, Albertus F. H., A.(1993), "Métodos Electrométricos de Análisis". Editorial Pueblo y Educación, Cuba.
- Apers S, Theunis M. Validation (ICH). Laboratory of Pharmacognosy. University of Antwerp. Belgium. Monografías de Curso impartido en la UCLV; 2006.
- Calpena Cmpañ, A.C. "Validación de métodos analíticos". Universidad de Barcelona, (1990).
- Castro M, Gascón S, Pujol M, Sans J.M. y Vicente, LI. Validación de Métodos Analíticos. Monografía de la Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI), Sección Catalana. Comisión de Normas de Buena Fabricación y Control de la Calidad. Editada bajo el patrocinio de Hewlett-Packard. Septiembre 1989.
- Caveda, LI., Padrón, JL., (1991). Evaluación de la actividad antiinflamatoria del UC-244. Informe Técnico. Centro de Química Farmacéutica, La Habana.
- Cordobés, C., (1993). Evaluación de la actividad acaricida del UC-244 mediante el test de larvas de Bophilus microplus. Informe técnico. Estación Nacional Experimental de Parasitología (ENEP). La Habana.
- Delgado, M. (1993) "Aplicación de la espectroscopia UV-VIS en la caracterización y cuantificación de los productos G-0 y UC-244". Trabajo de Diploma. UCLV. 1992- 1993. Cuba.
- Enciclopedia Microsoft® Encarta® 2000. © 1993-1999 Microsoft Corporation.
- Estrada, E., (1994). Relación estructura-mutagenicidad de 2- furiletlenos. Informe Técnico. Centro de Bioactivos Químicos. UCLV. Santa Clara.
- Gilbert H Ayres "Análisis Químico Cuantitativo". University of Texas. Austin Harper Row Publisher INC. New York 1970.
- Hoffmann, E.(1967) "Chromatography". Second Edition. pp 179-180. 1967.

- ICH harmonised tripartite guideline: Validation of analytical procedures methodology, <http://www.eudra.org/emea.html>; visitada en octubre 2007.
- Jiménez E, Martínez N. Validación de los métodos cromatográficos para la determinación de pureza de los principios activos G-1, G-0 y UC-244. (Tesis de Maestría), UH; 2003.
- Joachim E, John H. Method Validation in Pharmaceutical Analysis. A Guide to Best Practice. Mc B. Miller (Eds). Copyright. 2005 WILEY-VCH.
- Laboratorios CINFA. Conceptos claves de medicamentos genéricos. Sitio web visitado en abril de 2007. <http://www.cinfa.com/es/>
- Loy, S., Garcia, D., Fernández, Y.,(1998). Evaluación de la actividad antiinflamatoria del compuesto bioactivo UC-244. Informe Técnico. Laboratorio de Farmacología Experimental. Departamento de Farmacia. Facultad de Química y Farmacia . UCLV.
- Machado R. y colaboradores. “Utilización del UC-244 para el control de plagas en granos almacenados destinados a semillas y como sustrato para la la producción de estomopatógenos”. Laboratorio de Sanidad Vegetal Minagri. Comunicación personal 2003.
- Martínez M. T. (1994) “Estudio de purificación y estabilidad del principio activo UC-244”. Trabajo de Diploma. UCLV. Curso 1993 – 1994.
- Masert, D.L., Semyerrs-verbeke, J. ; Vandegins, B. : “An Introduction to method validation”. Anal. Magazine (USA), 22(5), M14-M15, (1994).
- Morrison, R.T. y Boyd, R.N. (1983). Química Orgánica. Universidad de Nueva York, versión en español, 4ta.Edición. Fondo Educativo Interamericano, México.
- NC TS-368:2004. Guía para la validación de métodos de ensayo químicos para alimentos.

- Olazábal, E., (1991). Acción acaricida del UC-244. Informe Técnico. Grupo de Parasitología del Centro de Bioactivos Químicos de la UCLV. Santa Clara.
- Pérez, JA., (1988). Evaluación farmacológica y toxicológica del UC-244 en ratas y conejos de laboratorio. Tesis doctoral. Universidad de Leipzig. Alemania.
- Randerath, K.(1969) "Cromatografía de Capa Fina". Ediciones Urmo. pp 72-78. 1969.
- Regulación No. 41-2007, Validación de métodos analíticos. CECMED, MINSAP; 2007.
- Rodríguez R, Martín E. (1994) "Resultados preliminares a escala de laboratorio de Laboratorio del control de coleópteros de importancia en la agricultura". Comunicación personal 2003. UCLV.
- Rodríguez, Z. (2002) "Intensificación del Proceso de Producción del 2-(2-nitrovinil)-furano". Tesis de doctorado. 2002. Cuba.
- Salazar E y colaboradores (1996). "Uso de un nuevo formulado UC-244 CE 25 % para el control de ácaros en ajo". Comunicación personal 2003. Cuba.
- Saucedo Castillo, O. (2004). Resultados parciales de los estudios sobre la efectividad del UC 244 CE 25% sobre el control de granos almacenados. Comunicación personal. UCLV.
- Skoog, A.D.(1997) "Análisis instrumental". McGrau-Hill 4ta edición. pp 6-10. 1997.
- Skoog, A.D.(1990), West D.M. "Análisis Instrumental". McGrau-Hill 2da edición. pp 157-213, 739-740. 1990.
- Torres L. (2003) "Desarrollo de una técnica combinada por CCD-UV para la cuantificación del 2-(2-nitrovinil)-furano". Trabajo de diploma. UCLV. Curso 2002-2003. Cuba.
- Ugalde, M. (1993) "Estudios Preliminares de la estabilidad de las materias primas G-0 y UC-244". Trabajo de Diploma. UCLV. 1992-1993. Cuba.

- Willard, H.(1991) "Métodos Instrumentales de Análisis". Grupo editorial Ibero América. pp 115-190. 1991.

Anexos

ANEXOS

Anexo 1. Análisis de varianza del diseño de síntesis.

Analysis of Variance for mCrudo - Type III Sums of Squares

| Source | Sum of Squares | Df | Mean Square | F-Ratio | P-Value |
|-------------------|----------------|----|-------------|---------|---------|
| MAIN EFFECTS | | | | | |
| A:t contacto | 811.038 | 1 | 811.038 | 6.15 | 0.051 |
| B:Temperatura | 1.91101 | 1 | 1.91101 | 0.01 | 0.901 |
| RESIDUAL | 659.325 | 5 | 131.865 | | |
| TOTAL (CORRECTED) | 1472.27 | 7 | | | |

All F-ratios are based on the residual mean square error.

The StatAdvisor

The ANOVA table decomposes the variability of mCrudo into contributions due to various factors. Since Type III sums of squares (the default) have been chosen, the contribution of each factor is measured having removed the effects of all other factors. The P-values test the statistical significance of each of the factors. Since no P-values are less than 0.05, none of the factors have a statistically significant effect on mCrudo at the 95.0% confidence level.

Anexo 2. Análisis de medias de la función respuesta masa de crudo del diseño de síntesis.

Table of Least Squares Means for mCrudo
with 95.0 Percent Confidence Intervals

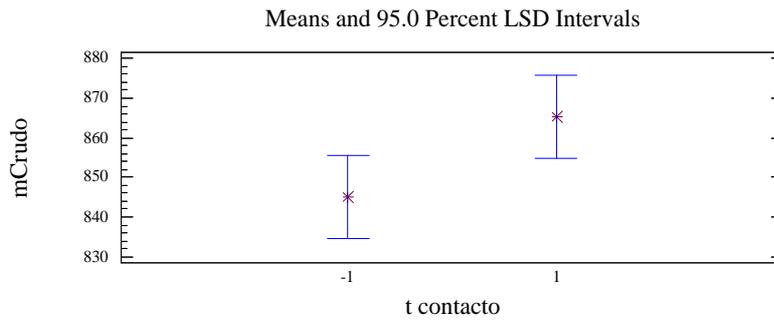
| Level | Count | Mean | Std. Error | Lower Limit | Upper Limit |
|-------------|-------|---------|---------------|----------------|----------------|
| GRAND MEAN | 8 | 855.104 | | | |
| t contacto | | | | | |
| -1 | 4 | 845.035 | 5.74163 | 830.276 | 859.794 |
| 1 | 4 | 865.173 | 5.74163 | 850.413 | 879.932 |
| Temperatura | | | | | |
| -1 | 4 | 855.592 | 5.74163 | 840.833 | 870.352 |
| 1 | 4 | 854.615 | 5.74163 | 839.856 | 869.374 |

The StatAdvisor

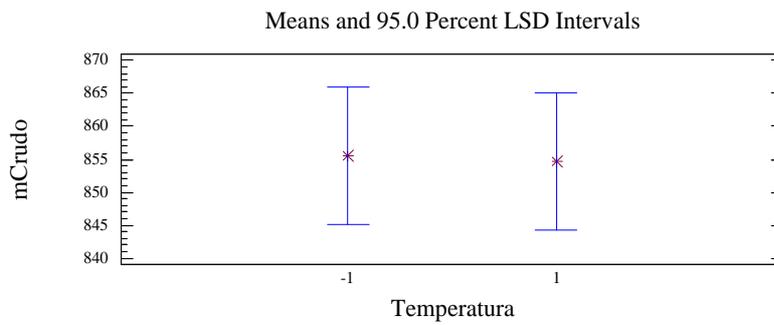
This table shows the mean mCrudo for each level of the factors. It also shows the standard error of each mean, which is a measure of its sampling variability. The rightmost two columns show 95.0% confidence intervals for each of the means. You can display these means and intervals by selecting Means Plot from the list of Graphical Options.

Anexo 3. Influencias de las variables empleadas en el diseño de síntesis.

Influencia del tiempo de contacto.



Influencia de la temperatura



Anexo 4. Análisis de regresión de la función respuesta masa del crudo del diseño de síntesis.

Multiple Regression Analysis

Dependent variable: mCrudo

| Parameter | Estimate | Standard Error | T Statistic | P-Value |
|-------------|----------|----------------|-------------|---------|
| CONSTANT | 855.104 | 4.05994 | 210.62 | 0.0000 |
| t contacto | 10.0688 | 4.05994 | 2.48002 | 0.0558 |
| Temperatura | -0.48875 | 4.05994 | -0.120383 | 0.9089 |

Analysis of Variance

| Source | Sum of Squares | Df | Mean Square | F-Ratio | P-Value |
|---------------|----------------|----|-------------|---------|---------|
| Model | 812.949 | 2 | 406.474 | 3.08 | 0.1342 |
| Residual | 659.325 | 5 | 131.865 | | |
| Total (Corr.) | 1472.27 | 7 | | | |

R-squared = 55.2172 percent

R-squared (adjusted for d.f.) = 37.3041 percent

Standard Error of Est. = 11.4833

Mean absolute error = 7.08719

Durbin-Watson statistic = 1.27639

The StatAdvisor

The output shows the results of fitting a multiple linear regression model to describe the relationship between mCrudo and 2 independent variables. The equation of the fitted model is

$$\mathbf{mCrudo = 855.104 + 10.0688 * t\ contacto - 0.48875 * Temperatura}$$

Since the P-value in the ANOVA table is greater or equal to 0.10, there is not a statistically significant relationship between the variables at the 90% or higher confidence level.

The R-Squared statistic indicates that the model as fitted explains 55.2172% of the variability in mCrudo. The adjusted R-squared statistic, which is more suitable for comparing models with different numbers of independent variables, is 37.3041%. The standard error of the estimate shows the standard deviation of the residuals to be 11.4833. This value can be used to construct prediction limits for new observations by selecting the Reports option from the text menu. The mean absolute error (MAE) of 7.08719 is the average value of the residuals. The Durbin-Watson (DW) statistic tests the residuals to determine if there is any significant correlation based on the order in which they occur in your data file. Since the DW value is less than 1.4, there may be some indication of serial correlation. Plot the residuals versus row order to see if there is any pattern which can be seen.

In determining whether the model can be simplified, notice that the highest P-value on the independent variables is 0.9089, belonging to Temperature. Since the P-value is greater or equal to 0.10, that term is not statistically significant at the 90% or higher confidence level. Consequently, you should consider removing Temperatura from

the model.

Anexo 5 Análisis de varianza (FR. Pureza) del diseño de síntesis.

Analysis of Variance for Pureza - Type III Sums of Squares

| Source | Sum of Squares | Df | Mean Square | F-Ratio | P-Value |
|-------------------|----------------|----|-------------|---------|---------|
| ----- | | | | | |
| MAIN EFFECTS | | | | | |
| A:t contacto | 65.3225 | 1 | 65.3225 | 3.39 | 0.1251 |
| B:Temperatura | 0.7688 | 1 | 0.7688 | 0.04 | 0.8496 |
| RESIDUAL | 96.4683 | 5 | 19.2937 | | |
| ----- | | | | | |
| TOTAL (CORRECTED) | 162.56 | 7 | | | |
| ----- | | | | | |

All F-ratios are based on the residual mean square error.

The StatAdvisor

The ANOVA table decomposes the variability of Pureza into contributions due to various factors. Since Type III sums of squares (the default) have been chosen, the contribution of each factor is measured having removed the effects of all other factors. The P-values test the statistical significance of each of the factors. Since no P-values are less than 0.05, none of the factors have a statistically significant effect on Pureza at the 95.0% confidence level.

Anexo 6 Análisis de medias de la función respuesta Pureza del diseño de síntesis.

Table of Least Squares Means for Pureza
with 95.0 Percent Confidence Intervals

| Level | Count | Mean | Std. Error | Lower Limit | Upper Limit |
|-------------|-------|---------|------------|-------------|-------------|
| ----- | | | | | |
| GRAND MEAN | 8 | 91.6875 | | | |
| t contacto | | | | | |
| -1 | 4 | 88.83 | 2.19623 | 83.1844 | 94.4756 |
| 1 | 4 | 94.545 | 2.19623 | 88.8994 | 100.191 |
| Temperatura | | | | | |
| -1 | 4 | 91.9975 | 2.19623 | 86.3519 | 97.6431 |
| 1 | 4 | 91.3775 | 2.19623 | 85.7319 | 97.0231 |
| ----- | | | | | |

The StatAdvisor

This table shows the mean Pureza for each level of the factors. It also shows the standard error of each mean, which is a measure of its sampling variability. The rightmost two columns show 95.0% confidence intervals for each of the means. You can display these means and intervals by selecting Means Plot from the list of Graphical Options.

Anexo7. Análisis de Medias. F.R Pureza.

Table of Least Squares Means for Pureza
with 95.0 Percent Confidence Intervals

| Level | Count | Mean | Std. Error | Lower Limit | Upper Limit |
|-------------|-------|---------|------------|-------------|-------------|
| ----- | | | | | |
| GRAND MEAN | 8 | 91.6875 | | | |
| t contacto | | | | | |
| -1 | 4 | 88.83 | 2.19623 | 83.1844 | 94.4756 |
| 1 | 4 | 94.545 | 2.19623 | 88.8994 | 100.191 |
| Temperatura | | | | | |
| -1 | 4 | 91.9975 | 2.19623 | 86.3519 | 97.6431 |
| 1 | 4 | 91.3775 | 2.19623 | 85.7319 | 97.0231 |
| ----- | | | | | |

The StatAdvisor

This table shows the mean Pureza for each level of the factors. It also shows the standard error of each mean, which is a measure of its sampling variability. The rightmost two columns show 95.0% confidence intervals for each of the means. You can display these means and intervals by selecting Means Plot from the list of Graphical Options.

Anexo 8 Rangos de masas (FR. Pureza).

Multiple Range Tests for Pureza by t contacto

Method: 95.0 percent LSD

| t contacto | Count | LS Mean | Homogeneous Groups |
|------------|-------|---------|--------------------|
| -1 | 4 | 88.83 | X |
| 1 | 4 | 94.545 | X |

| Contrast | Difference | +/- Limits |
|----------|------------|------------|
| -1 - 1 | -5.715 | 7.98408 |

* denotes a statistically significant difference.

The StatAdvisor

This table applies a multiple comparison procedure to determine which means are significantly different from which others. The bottom half of the output shows the estimated difference between each pair of means. There are no statistically significant differences between any pair of means at the 95.0% confidence level. At the top of the page, one homogenous group is identified by a column of X's. Within each column, the levels containing X's form a group of means within which there are no statistically significant differences. The method currently being used to discriminate among the means is Fisher's least significant difference (LSD) procedure. With this method, there is a 5.0% risk of calling each pair of means significantly different when the actual difference equals 0.

Anexo9. Análisis de Regresión múltiple (FR. Pureza) del diseño de síntesis.

Multiple Regression Analysis

Dependent variable: Pureza

| Parameter | Estimate | Standard Error | T Statistic | P-Value |
|-------------|----------|----------------|-------------|---------|
| CONSTANT | 91.6875 | 1.55297 | 59.0402 | 0.0000 |
| t contacto | 2.8575 | 1.55297 | 1.84003 | 0.1251 |
| Temperatura | -0.31 | 1.55297 | -0.199618 | 0.8496 |

Analysis of Variance

| Source | Sum of Squares | Df | Mean Square | F-Ratio | P-Value |
|---------------|----------------|----|-------------|---------|---------|
| Model | 66.0913 | 2 | 33.0456 | 1.71 | 0.2713 |
| Residual | 96.4683 | 5 | 19.2937 | | |
| Total (Corr.) | 162.56 | 7 | | | |

R-squared = 40.6566 percent

R-squared (adjusted for d.f.) = 16.9193 percent

Standard Error of Est. = 4.39245

Mean absolute error = 3.2475

Durbin-Watson statistic = 2.43404

The StatAdvisor

The output shows the results of fitting a multiple linear regression model to describe the relationship between Pureza and 2 independent variables. The equation of the fitted model is

$$\text{Pureza} = 91.6875 + 2.8575 * \text{t contacto} - 0.31 * \text{Temperatura}$$

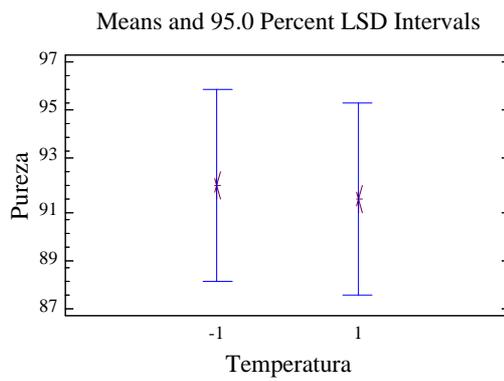
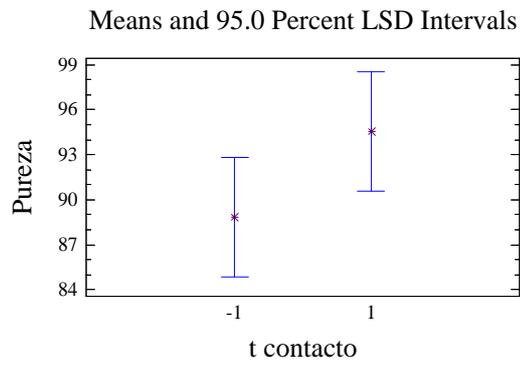
Since the P-value in the ANOVA table is greater or equal to 0.10, there is not a statistically significant relationship between the variables at the 90% or higher confidence level.

The R-Squared statistic indicates that the model as fitted explains 40.6566% of the variability in Pureza. The adjusted R-squared statistic, which is more suitable for comparing models with different numbers of independent variables, is 16.9193%. The standard error of the estimate shows the standard deviation of the residuals to be 4.39245. This value can be used to construct prediction limits for new observations by selecting the Reports option from the text menu. The mean absolute error (MAE) of 3.2475 is the average value of the residuals. The Durbin-Watson (DW) statistic tests the residuals to determine if there is any significant correlation based on the order in which they occur in your data file. Since the DW value is greater than 1.4, there is probably not any serious autocorrelation in the residuals.

In determining whether the model can be simplified, notice that the highest P-value on the independent variables is 0.8496, belonging to Temperatura. Since the P-value is greater or equal to 0.10, that term is not statistically significant at the 90% or higher confidence level. Consequently, you should consider removing Temperatura from

the model.

Anexo 10 Análisis gráfico de los Intervalos LSD (FR. Pureza) proceso de síntesis.



Anexo 11 Análisis de Varianza para UC 244

| Fuente | Suma de Cuadrados | GI | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|-------------------|-------------------|----|----------------|---------|---------|
| A:Volumen etanol | 635.497 | 1 | 635.497 | 6.14 | 0.0684 |
| B:Carbón activado | 154.739 | 1 | 154.739 | 1.49 | 0.2886 |
| C:Temperatura | 26.7327 | 1 | 26.7327 | 0.26 | 0.6381 |
| Error total | 414.143 | 4 | 103.536 | | |
| Total (corr.) | 1231.11 | 7 | | | |

R-cuadrada = 66.3602 porciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 41.1304 porciento

Error estándar del est. = 10.1753

Error absoluto medio = 5.987

Estadístico Durbin-Watson = 0.716825 (P=0.0453)

Autocorrelación residual de Lag 1 = 0.42601

El StatAdvisor

La tabla ANOVA particiona la variabilidad de UC 244 en piezas separadas para cada uno de los efectos. entonces prueba la significancia estadística de cada efecto comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental. En este caso, 0 efectos tienen un valor-P menor que 0.05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95.0%.

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo, así ajustado, explica 66.3602% de la variabilidad en UC 244. El estadístico R-cuadrada ajustada, que es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes, es 41.1304%. El error estándar del estimado muestra que la

desviación estándar de los residuos es 10.1753. El error medio absoluto (MAE) de 5.987 es el valor promedio de los residuos. El estadístico de Durbin-Watson (DW) prueba los residuos para determinar si haya alguna correlación significativa basada en el orden en que se presentan los datos en el archivo. Debido a que el valor-P es menor que 5.0%, hay una indicación de posible correlación serial al nivel de significancia del 5.0%. Grafique los residuos versus el orden de fila para ver si hay algún patrón que pueda detectarse.

Anexo 12 Coeficientes de regresión para Pureza

| <i>Coeficiente</i> | <i>Estimado</i> |
|----------------------|-----------------|
| constante | 11.6338 |
| A:Volumen etanol | 8.91275 |
| B:Carbón activado | -35.184 |
| C:Temperatur a | 0.7312 |

El StatAdvisor

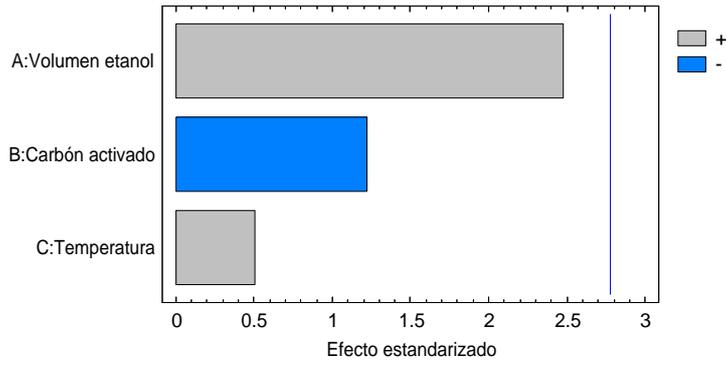
Esta ventana despliega la ecuación de regresión que se ha ajustado a los datos.

La ecuación del modelo ajustado es

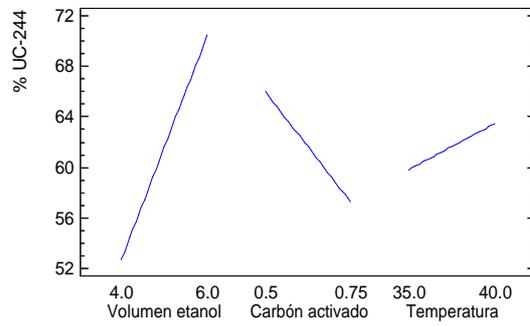
$$\% \text{ UC-244} = 11.6338 + 8.91275 * \text{Volumen etanol} - 35.184 * \text{Carbón activado} + 0.7312 * \text{Temperatura}$$

en donde los valores de las variables están especificados en sus unidades originales. Para hacer que STATGRAPHICS evalúe esta función, seleccione Predicciones de la lista de Opciones Tabulares. Para graficar la función, seleccione Gráficas de Respuesta de la lista de Opciones Gráficas.

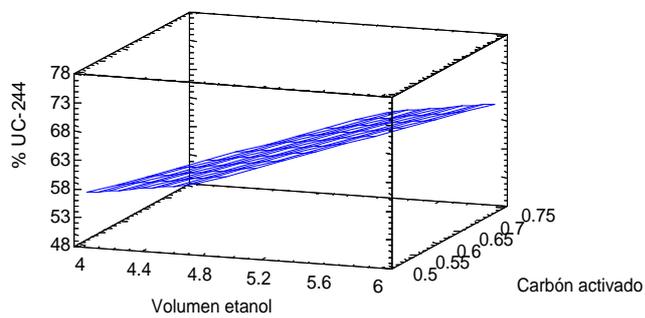
Diagrama de Pareto Estandarizada para UC 244

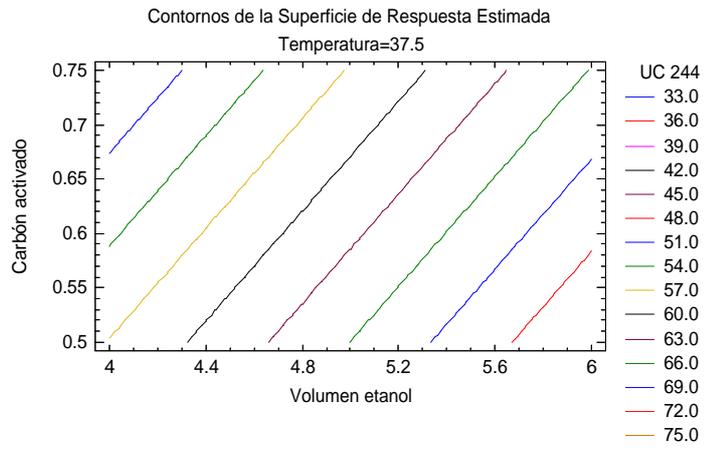


Gráfica de Efectos Principales para UC 244



Superficie de Respuesta Estimada
Temperatura=37.5





Índice

Índice.

| | |
|--|----|
| Introducción | 9 |
| Resumen | 11 |
| Capítulo I: Parte Teórica | 14 |
| 1.1 Características del UC-244 | 14 |
| 1.2 Importancia y utilización del UC-244 | 14 |
| 1.3 Síntesis del UC-244 | 18 |
| 1.4 Reacción principal de la síntesis de UC-244 | 18 |
| 1.5 Materias primas de la síntesis del UC-244 | 18 |
| 1.6 Antecedentes del trabajo | 20 |
| 1.7 Fundamentos de las técnicas analíticas | 21 |
| 1.8 Diseño de experimentos | 26 |
| 1.9 Validación de métodos analíticos | 28 |
| 1.9.1 Linealidad | 29 |
| 1.9.2 Precisión | 32 |
| 1.9.2.1 Repetibilidad | 33 |
| 1.9.2.2 Reproducibilidad | 33 |
| 1.9.3 Exactitud | 33 |
| Capítulo II: Materiales y Métodos | 37 |
| 2.1 Reactivos y equipos | 37 |
| 2.2 Preparación del patrón de UC-244 | 37 |
| 2.3 Método combinado de CCD-espectrofotometría UV-VIS | 38 |
| 2.4 Comprobación de algunos parámetros de validación de la técnica analítica | 38 |
| 2.4.1 Preparación de la curva de calibración | 38 |
| 2.4.2 Determinación de la precisión | 39 |
| 2.5 Cromatografía Líquida de Alta Resolución | 40 |
| 2.5.1 Preparación de la curva de calibración | 40 |
| 2.6 Influencia de diferentes factores en el proceso de síntesis a escala de 6 moles. | 40 |
| 2.7 Influencia de diferentes factores en el proceso de purificación. | 41 |
| Capítulo III: Discusión de los resultados | 45 |
| 3.1 Preparación del patrón de UC-244 | 45 |
| 3.2 Comprobación de algunos parámetros de validación de la técnica analítica CCD- Espectrofotometría UV-Vis. | 46 |
| 3.2.1 Linealidad | 46 |
| 3.2.2 Precisión | 47 |
| 3.3 Curva de Calibración de UC-244 por la técnica de HPLC. | 48 |
| 3.4 Influencia de diferentes factores en el proceso de síntesis a escala de 6 moles. | 48 |
| 3.5 Influencia de diferentes factores en el proceso de purificación del UC-244. | 52 |
| Conclusiones | 56 |
| Recomendaciones | 58 |
| Bibliografía | 60 |
| Anexos | 64 |

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.