

Universidad Central “Marta Abreu” de las Villas
Facultad de Química-Farmacia
Departamento de Lic. Química



Trabajo de Diploma

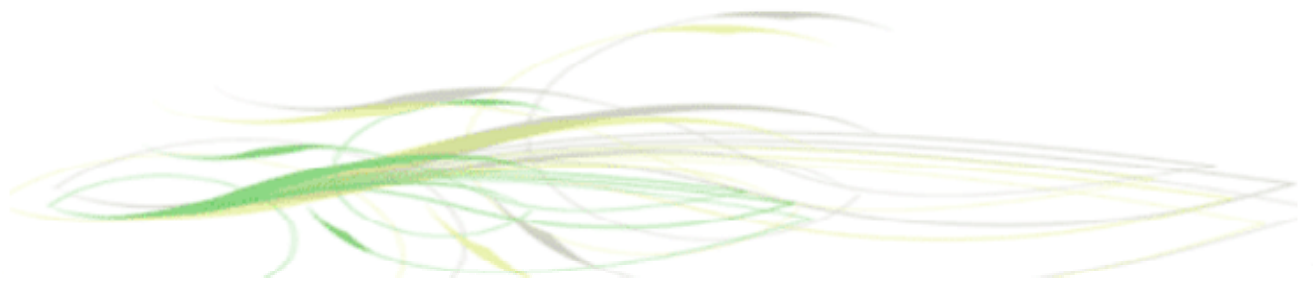
Título: “Estudio Químico-Farmacéutico del ingrediente activo UC-244”.

Autora: Yoslainy Echevarría Valdés.

Tutoras: Dra.C. Zenaida Rodríguez Negrín.

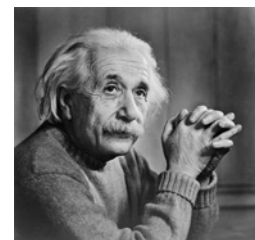
MSc. Gisela Peralta Meseguer.

Curso 2008-2009

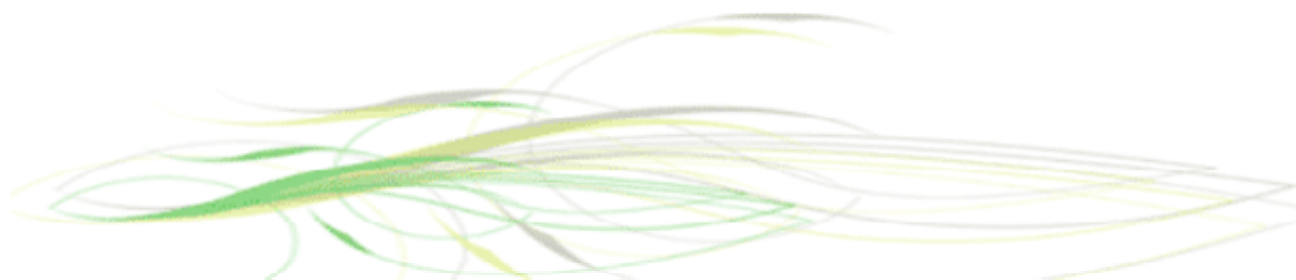


Pensamiento

La mayoría de las ideas fundamentales de la ciencia son esencialmente sencillas y, por regla general pueden ser expresadas en un lenguaje comprensible para todos.



Albert Einstein



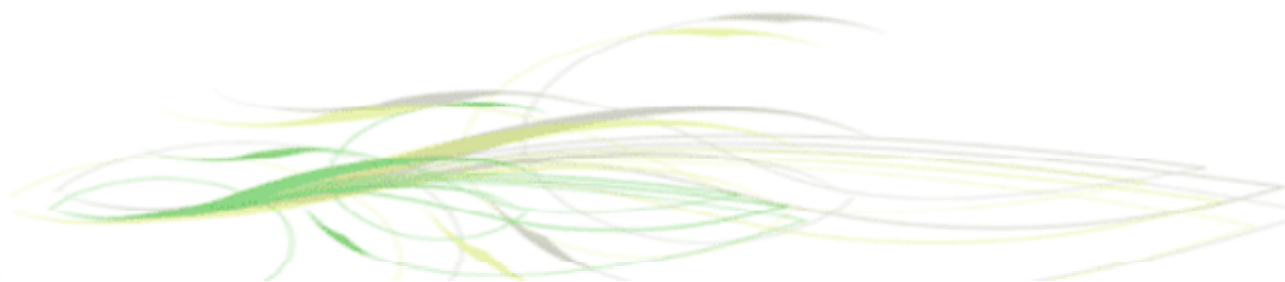
Dedicatoria

*Este trabajo de diploma realizado con tanto esfuerzo y dedicación se lo quisiera dedicar primeramente a la mujer que me dio la vida, la que en todos los momentos buenos y malos ha estado a mi lado apoyándome y dándome todo su cariño y comprensión, esa mujer es mi madre **Marisol Valdés González** a la cual quiero más que a mi vida.*

*También quisiera dedicársela a mi papito **Riderto Echevarría Bermúdez** que lo quiero con la vida ya que ha estado a mi lado en los momentos que lo he necesitado.*

*Por último, y no por que sea el último deja de ser importante en mi vida quisiera dedicársela al hombre que se a pasado los cinco años de mi carrera a mi lado dándome todo el apoyo y el amor que me a hecho falta, ese hombre se llama **Luis Manuel Peralta González** .*

A todos quisiera decirles que los quiero demasiado y que gracias por ayudarme tanto.



Agradecimientos

En el curso de mi carrera, mi dedicación a la investigación se la debo a todas aquellas personas que de una forma u otra han contribuido a mi formación.

*A mi tutora **Zenaida Rodríguez Negrín**.*

Primero que todo decirle que con usted he aprendido a enfrentar todos o casi todos los problemas a los cuales estamos expuestos en un laboratorio químico, decirle que me llevo la mejor opinión de usted tanto como profesora y persona. Bueno muchas gracias por brindarme todo su apoyo y estar ahí cada vez que lo necesité.

*A mi tutora **Gisela Peralta**.*

Gracias por el enorme apoyo que me ha brindado y por su dedicación en el transcurso de este trabajo.

*A **Gaytán***

Que fue mi tutor en tercer año y que actualmente puedo contar con todo su apoyo.

*A **Mollineda***

Gracias por ayudarme y apoyarme en todos los momentos que necesité de tu ayuda.

*A **Edel***

Gracias por prestarme atención y brindarme su apoyo para poder desarrollar una parte de este trabajo.

*A **todos mis profesores***

Darles las gracias en general por contribuir cada día de una forma u otra a mejorar mi formación.

*A **Tania***

Muchas gracias de verdad por brindarme todo su apoyo de forma incondicional.

No me puede faltar mencionar la gran ayuda que he recibido durante el transcurso de este trabajo de los técnicos de laboratorio como Francisco, Josefa, Adalberto, y las muchachitas de control de la calidad del CBQ.

Existen otras personas que no puedo dejar de agradecerles todo el apoyo y la ayuda que me han brindado durante estos cinco años de mi carrera.

*Primero que todo agradecer a mi mamá **Marisol Valdés González**.*

Por darme la oportunidad de vivir, para poder llegar a ser lo que soy ahora y mucho más, por darme todo el cariño que de verdad he necesitado en todos estos años.

*A mi papá **Riderto Echevarría Bermúdez**.*

Por impulsarme para poder llegar donde estoy en estos momentos y por estar aquí a mi lado en este momento tan importante para mi vida.

*A mi chiquitico **Luis Manuel Peralta González**.*

Por quererme tanto como yo nunca pensé que me podrían llegar a querer en la vida, por aguantarme todas las malacrianzas mías y en fin por todo lo hermoso que hemos vivido juntos.

*A mis suegros **Luis Manuel Peralta Suárez y Susana González Pérez**.*

Por ayudarme tanto en el transcurso de mi carrera y especialmente a mi suegra a la cual quiero muchísimo y no quisiera cambiarla nunca por ninguna otra.

*A mis compañeros de aula: **Yoan Hidalgo Rosa, Luis M Peralta Glez, Manuel A Treto Suárez, Lisdefys Glez Rdguez, Reinier Tumbarell Silva y Oscar Martínez Santiago**.*

Por ser como mis hermanos y ayudarnos tanto durante el transcurso de estos cinco años, y más que todo eso por ser un grupo con el cual yo sé que puedo seguir contando aunque estemos apartados unos de otros.

*A la memoria de mi otro papá **Orestes Valdés Bermúdez**.*

Papá aunque yo se que desde hace mucho tiempo no estas aquí conmigo, desde el cielo me has apoyado mucho en todo, no faltara mas decir que quisiera que estuvieras aquí a mi lado aunque yo siempre te tengo muy presente y por todo eso muchas gracias mi querido abuelito.

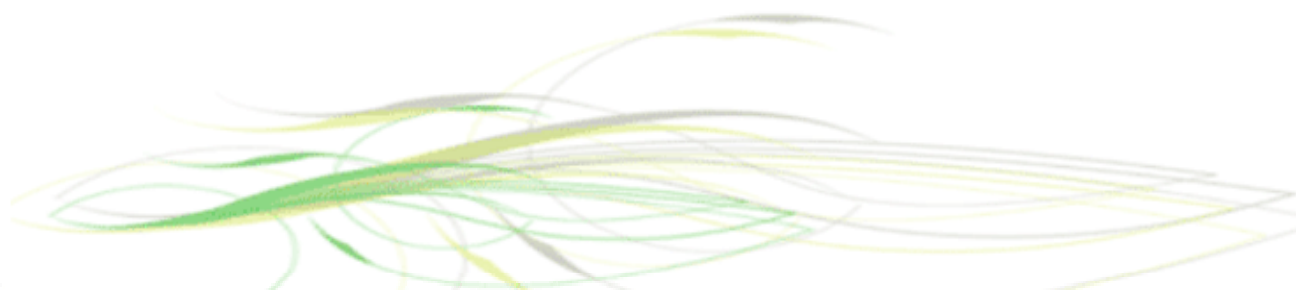
*A mis abuelos **María González Ferreiro y Reinerio Echevarría**.*

A mi abuelita gracias por quererme y apoyarme tanto cada vez que lo he necesitado, a mi abuelo gracias por darme todo el apoyo que ha estado a tu alcance.

A mis Tías y mi Tío.

Por quererme tanto y ayudarme cada ves que los necesito.

A todos, darles mis más sinceros agradecimientos.



Índice

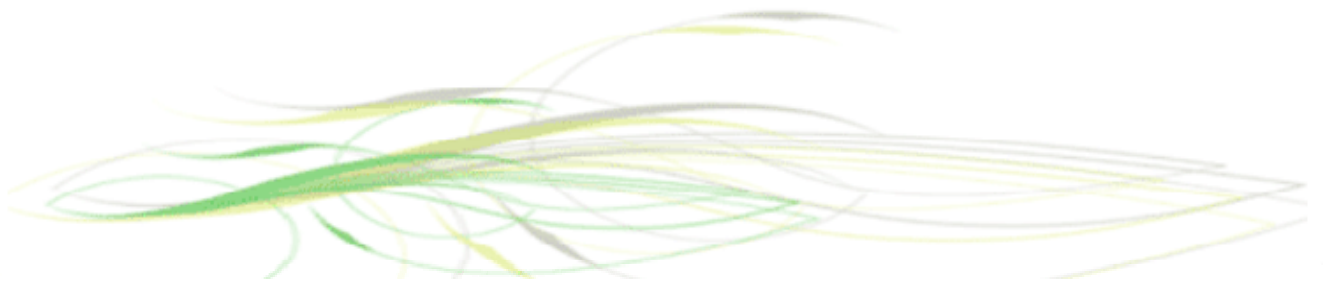
Índice

Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
Capítulo I: Revisión bibliográfica.	5
1.1 Parámetros para el análisis de la materia prima.	5
1.1.1 Solubilidad.	6
1.1.2 Pérdidas por desecación.	6
1.1.3 Cenizas.	7
1.1.4 Identificación del compuesto. Reacciones de identificación.	8
1.1.5.1 Punto de fusión.	8
1.1.5.2 Absorción en el UV.	8
1.1.5.3 Absorción en el IR.	9
1.1.5.4 Cromatografía de capa de delgada (CCD).	9
1.1.6 Identificación y determinación de impurezas.	9
1.1.6.1 Determinación del contenido de metales pesados por espectrometría de absorción atómica.	10
1.1.7 Ensayos para la determinación cuantitativa de la pureza del producto.	11
1.2 Características del UC-244.	12
1.3 Materias Primas de la síntesis del UC-244.	12
1.4 Importancia y utilización del UC-244.	14
1.5 Aspectos fármacos- toxicológicos de la molécula del UC-244.	18
1.6 Estudios anteriores de síntesis y purificación del UC-244.	19
1.7 Técnicas analíticas.	20
1.7.1 Cromatografía de Capa Delgada (CCD).	20
1.7.2 Cromatografía de gases (GC).	22
1.7.3 Espectrofotometría directa UV-VIS.	23
1.7.4 Método combinado de CCD- Espectrofotometría UV-VIS.	25
1.7.5 Técnicas analíticas realizadas al UC-244.	25
1.8 Parámetros estadísticos.	26

1.8.1 Algunos conceptos generales relacionados con el diseño factorial experimental.	27
1.9 Parámetros de validación de una técnica analítica.	27
1.9.1 Linealidad.	28
1.9.2 Precisión.	31
1.9.3 Exactitud.	32
1.9.4 Límite de detección y límite de cuantificación.	33
1.9.5 Selectividad y especificidad.	35
Capítulo II: Materiales y métodos.	37
2.1 Reactivos y Equipamiento.	37
2.1.1 Preparación de disoluciones.	37
2.2 Proceso de obtención de la muestra de referencia de UC-244.	39
2.2.1 Purificación del producto.	39
2.3 Determinación de los Parámetros de Calidad del UC-244 como materia prima.	40
2.3.1 Descripción.	40
2.3.2 Perdidas por desecación.	40
2.3.3 Residuos de ignición.	41
2.3.4 Metales pesados.	42
2.3.5 Punto de fusión.	43
2.3.6 Absorción en el UV.	43
2.3.7 Absorción en el IR.	43
2.3.8 Registro cromatográfico gaseoso.	43
2.4 Método combinado de CCD-Espectrofotometría UV-VIS.	43
2.5 Evaluación de los parámetros de validación de la técnica por CCD-Espectrofotometría UV-VIS.	44
2.5.1 Linealidad.	44
2.5.2 Precisión.	44
2.5.3 Exactitud.	46
2.6 Condiciones operacionales del cromatógrafo de gases con detector de espectrometría de masas (GC-MS).	47

2.7 Procedimiento general para la determinación de UC-244 por (GC-MS).	47
2.8 Evaluación de los parámetros de validación de la técnica por (GC-MS) para la determinación de UC-244.	48
2.8.1 Linealidad.	48
2.8.2 Precisión.	48
2.8.3 Exactitud.	49
2.8.4 Límite de detección (LD) y Límite de cuantificación (LC).	49
2.8.5 Especificidad.	50
2.9 Condiciones operacionales del cromatógrafo de gases con detector de ionización de llamas (GC-FID).	51
2.10 Procedimiento general para la determinación de UC-244 por (GC-FID).	52
2.11 Evaluación de los parámetros de validación de la técnica por (GC-FID) para la determinación de UC-244.	52
2.11.1 Linealidad.	52
2.11.2 Precisión.	53
2.11.3 Exactitud.	53
2.11.4 Límite de detección (LD) y Límite de cuantificación (LC).	54
2.11.5 Especificidad.	54
2.12 Comparación de los resultados obtenidos por GC-FID y GC-MS.	55
Capítulo III: Análisis y discusión de los resultados.	56
3.1 Muestra de referencia de UC-244.	56
3.2 Parámetros de calidad del UC-244.	57
3.2.1 Descripción.	57
3.2.2 Pérdidas por desecación.	57
3.2.3 Residuos de ignición.	58
3.2.4 Metales pesados.	58
3.2.5 Punto de fusión.	60
3.2.6 Absorción en el UV.	60
3.2.7 Absorción en el IR.	61

3.3 Validación de la técnica por CCD-Espectrofotometría UV-VIS para la determinación de UC-244.	62
3.3.1 Linealidad.	62
3.3.2 Precisión. Repetibilidad y Reproducibilidad intermedia.	65
3.3.3 Exactitud.	67
3.4 Validación de la técnica por (GC-MS) para la determinación de UC-244.	68
3.4.1 Linealidad.	68
3.4.2 Precisión. Repetibilidad y Reproducibilidad intermedia.	71
3.4.3 Exactitud.	73
3.4.4 Límite de detección y Límite de cuantificación.	74
3.4.5 Especificidad.	75
3.5 Validación de la técnica por (GC-FID) para la determinación de UC-244.	77
3.5.1 Linealidad.	77
3.5.2 Precisión. Repetibilidad y Reproducibilidad intermedia.	80
3.5.3 Exactitud.	82
3.5.4 Límite de detección y Límite de cuantificación.	83
3.5.5 Especificidad.	84
3.6 Comparación de los resultados obtenidos por GC-FID y GC-MS.	85
Conclusiones.	86
Recomendaciones.	88
Bibliografía.	89
Anexos.	

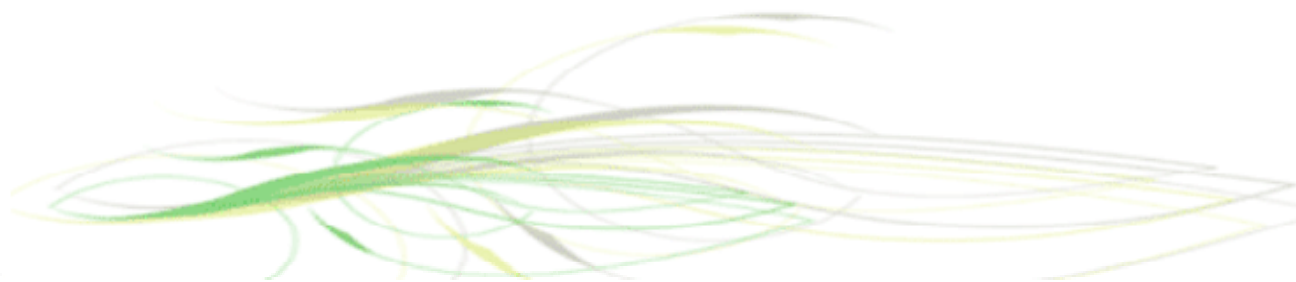


Resumen

Resumen

El 2-(2-metil-2-nitrovinil)-furano, conocido por UC-244, es una sustancia sintetizada en el Centro de Bioactivos Químicos de la Universidad Central de Las Villas, que presenta propiedades bioactivas como bactericida y fungicida, cuya acción ha sido estudiada por otros investigadores (Rodríguez R., 1994; Salazar E., 1996 y Saucedo, 2004;). Su tecnología de producción ha sido mejorada y actualmente se trabaja en el estudio del producto obtenido en las nuevas condiciones, a fin de realizar los estudios químico-farmacéuticos, determinando algunos parámetros de calidad, entre ellos la temperatura de fusión, el contenido de impurezas de metales pesados, pérdidas por desecación y cenizas. Se evalúan algunos parámetros de validación de las técnicas analíticas para su cuantificación por cromatografía de capa delgada combinada con espectrofotometría UV y cromatografía de gases con detectores de ionización por llama y espectrometría de masa. Se demuestra que las técnicas estudiadas son lineales, precisas y exactas, refiriéndose los valores obtenidos para los parámetros de validación. Se comprueba que no existen diferencias significativas en los resultados obtenidos por las técnicas cromatográficas gaseosas.

Palabras claves: 2-(2-metil-2-nitrovinil)-furano, cromatografía de gases, cromatografía de capa delgada, validación, parámetros químico-farmacéuticos.

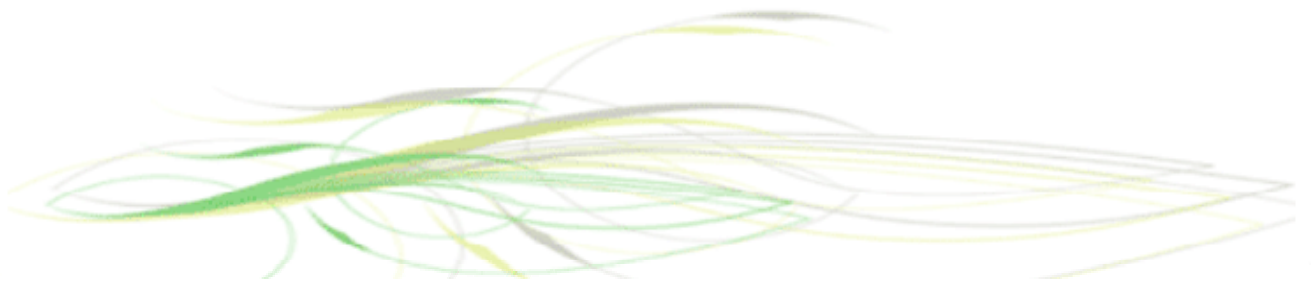


Abstract

Abstract

The 2-(2-metil-2-nitrovinil)-furan, known by UC-244, it is a substance synthesized in the Bioactive Chemical Center at Central University of Las Villas. The compound present bioactive properties like germicide and fungicide whose action has been established by other investigators (Rodriguez R., 1994; Salazar E., 1996 and Saucedo, 2004.). Their production technology has been improved and at present we works on the study of the product properties obtained under the new conditions, in order to carry out the chemical-pharmacists studies, determining some parameters of quality, among them the melting point temperature, content of impurities of heavy metals, losses for drying and totals ash. Some parameters of validation of the analytic techniques were evaluated by quantification with thin layer chromatography combined with ultraviolet spectrometry and also employing gas chromatography of gases with ionization and mass detector. In our paper has been demonstrated that the studied techniques are linearly, precise and accurate, referring the values obtained for the validation parameters. Analytics results obtained demonstrated that don't exist significant differences in the results by gaseous chromatographic methods employed.

Key words: 2-(2-metil-2-nitrovinil)-furan, chromatography of gases, thin layer chromatography, validation, chemical-pharmacist parameters.



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 posee una serie de propiedades bactericidas y fungicidas que son importantes desde el punto de vista veterinario y agrícola.

El desarrollo de un nuevo fármaco pasa por varias fases, tales como, los estudios químicos-farmacéuticos del principio activo y sus formulados, que incluye la validación de métodos analíticos indicadores de estabilidad, la identificación de las impurezas en el principio activo y en el producto final propuesto, así como el estudio de su estabilidad en condiciones extremas que pudieran degradar el principio activo y el producto final propuesto (condiciones de stress). Todos estos aspectos se relacionan con la calidad y la seguridad del futuro medicamento.

Las técnicas analíticas aplicadas en dichos estudios tienen que ser confiables y apropiadas; dentro de ellas se encuentran la Cromatografía de Gases (GC) con empleo de diferentes detectores como ionización de llama o espectrometría de masa, la que resulta costosa pero muy adecuada para estos estudios. Otras técnicas más asequibles son la Cromatografía de Capa Delgada (CCD) y la Espectrofotometría UV-VIS, las cuáles a su vez también garantizan la confiabilidad de los resultados.

En investigaciones anteriores se han establecido las mejores condiciones de síntesis y purificación del referido principio activo a escala de 6 moles y se han desarrollado técnicas de cuantificación por CCD-UV y HPLC, por lo que resulta imprescindible para lograr el registro de cualquier formulado del principio activo determinar parámetros químicos farmacéuticos del IFA, así como contar con técnicas analíticas alternativas que permitan realizar estudios de estabilidad y de evaluación del perfil de impurezas.

Problema científico

En el CBQ es necesario determinar los parámetros químicos-farmacéuticos del UC-244 que se obtiene bajo las condiciones actuales que se emplean en el proceso de síntesis y purificación del IFA y desarrollar técnicas alternativas a las realizadas anteriormente.

Hipótesis

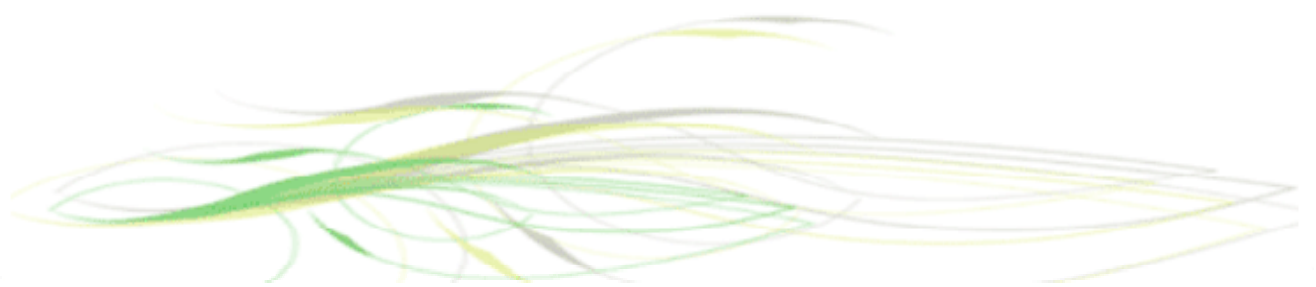
Es posible realizar los estudios químico-farmacéuticos del IFA así como desarrollar y evaluar parámetros de validación de las técnicas analíticas cromatografía de gases con detectores de ionización de llama (FID) y espectrometría de masas.

Objetivo general

Realizar los estudios químico-farmacéuticos del UC-244 obtenido con la tecnología actual de producción, desarrollar y evaluar algunos parámetros de validación de las técnicas analíticas por cromatografía de gases.

Objetivos específicos

- 1-** Determinar los siguientes parámetros químico-farmacéuticos al UC-244:
 - Temperatura de Fusión.
 - Pérdidas por desecación
 - Cenizas
 - Metales pesados
- 2-** Realizar ensayos de identificación al UC-244 puro aplicando espectrometría UV-VIS e IR, así como, métodos cromatográficos.
- 3-** Revalidar la técnica para la determinación de UC-244 por cromatografía de capa delgada combinada con espectrofotometría UV.
- 4-** Validar las técnicas analíticas por cromatografía de gases con detectores FID y Espectrometría de masa, comparando sus resultados.



Revisión Bibliográfica

Capítulo I

Revisión Bibliográfica

Para la aprobación de entidades farmacéuticas, los procesos regulatorios y requerimientos varían de país a país. La Conferencia Internacional de Armonización (ICH), la cual está conformada por la Comunidad Europea (CE), Japón y los Estados Unidos, se organizó para proporcionar oportunidades e iniciativas importantes para ser desarrolladas por autoridades reguladoras de diferentes países, así como asociaciones de la industria farmacéutica, para la promoción de una armonización internacional de exigencias reguladoras en los procesos de registros de medicamentos o normas regulatorias (USP XXX, 2008; Farmacopea de los E.U.M, 2003 ; British Pharmacopea, 2002).

1.1 Parámetros para el análisis de la materia prima.

La USP es una norma para evaluar la calidad de medicamentos y productos afines, y en la edición USP XXX, 2008 se enumeran las principales determinaciones analíticas que deben realizarse a una materia prima en la industria farmacéutica, ellos son:

- 1.- Descripción: Color, olor, sabor (No uso humano por ingestión).
- 2.- Solubilidad.
- 3.- Pérdidas por desecación.
- 4.- Cenizas.
- 5.- Identificación: reacciones de desarrollar color, reacciones de precipitación, determinación de constantes físicas, absorción en el UV y el IR, identificación por métodos cromatográficos.
- 6.- Identificación y determinación de impurezas.
 - Determinación de metales pesados.
 - Determinación de arsénico.
 - Otros contaminantes: Fe, SO_4^{2-} , Cl^- , etc.
- 7.- Ensayos para determinar cuantitativamente la pureza del producto y conocer si esta adentro de los límites establecidos.

1.1.2 Solubilidad.

Esta una de las propiedades de los compuestos orgánicos que más se utiliza desde el punto de vista de su caracterización e identificación. A continuación se muestra cómo se establece la solubilidad de los diversos compuestos (Colectivo de autores, 1984; USP XXX, 2008).

SOLUBILIDAD	SOLUTO	DISOLVENTE
Muy soluble	1 g	En menos de 1 parte
Fácilmente Soluble	1 g	En menos de 10 partes
Soluble	1 g	De 10 a 30 partes
Escasamente Soluble	1 g	De 30 a 100 partes
Poco Soluble	1 g	De 100 a 1000 partes
Muy poco Soluble	1 g	De 1000 a 10 000 partes
Casi insoluble	1 g	En más de 10 000 partes.

1.1.3 Pérdidas por Desección.

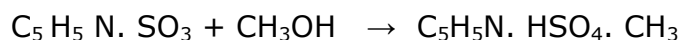
En todos los métodos de análisis cuantitativos es imprescindible que el contenido del componente analizado quede expresado de manera uniforme.

El ser utilizado el análisis de una misma sustancia por diferentes laboratorios no será posible llegar a resultados comparables si el contenido de la materia objeto de ensayo no se expresara siempre en materia seca. Esta cuestión es importante, principalmente en nuestro país donde se presenta una alta humedad atmosférica, ya que los productos que se reciben y se analizan en otros países podrían tener un mayor o menor porcentaje de agua. Por eso, antes de empezar cualquier análisis cuantitativo se debe determinar por desecación la humedad de las muestras problemas.

La desecación de las sustancias que se descompone por debajo de 100 grados se realiza en desecadoras con algunos agentes deshidratantes como el H_2SO_4 (ac.), CaCl_2 , etc. o en desecadoras especiales a las cuales se les realiza vacíos previamente con el objetivo de disminuir la temperatura de desecación.

Determinación de agua por Karl Fischer.

Se basa en la reacción cuantitativa que se produce entre el agua y un reactivo constituido por SO_2 y I_2 en disolución anhidra en metanol, de acuerdo con las siguientes reacciones:



Después de que el agua ha reaccionado con el I_2 libre, en las disoluciones se produce un cambio de color y además el punto final de la titulación se puede determinar eléctricamente utilizando un microamperímetro. Para llevar a cabo esta titulación es indispensable tomar las precauciones adecuadas para evitar que los reactivos y el recipiente donde se efectúe la reacción tengan contacto con la humedad atmosférica.

La estequiometría de la reacción no es exacta y la reproducibilidad de una determinación depende de factores tales como los ingredientes del reactivo, la naturaleza del solvente utilizado para disolver el producto de prueba y la técnica utilizada en la determinación particular (Farmacopea de los E.U.M, 2003).

1.1.4 Cenizas.

Un ensayo oficial, considerado un índice importante en el análisis de la sustancia es el residuo de ignición. Los compuestos inorgánicos a excepción de algunos que arden o se subliman, siempre dejan un mayor o menor residuo de ignición. Los compuestos orgánicos se carbonizan previamente y no dejan residuo alguno. Si en una sustancia orgánica hay presentes otros elementos además de carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno y azufre (tales como compuestos orgánicos que contienen metales o impurezas de estos), por ejemplo arsénico, mercurio, plomo; queda después de la combustión un residuo de ignición o cenizas correspondientes a estos últimos.

1.1.5 Identificación del compuesto. Reacciones de identificación.

En muchas ocasiones las reacciones de identificación responden al análisis de los grupos funcionales presentes en la estructura, por lo que sus resultados no se deben a la estructura completa sino a parte de ella. En las farmacopeas más modernas las pruebas de identificación vienen acompañadas de ensayos de identificación cromatográficos, para confirmar claramente la presencia de la estructura como tal y la no degradación de la misma (Castiñeiras M., 1986).

1.1.5.1 Punto de Fusión.

De las constantes físicas que se deben ser determinadas a un compuesto ninguna otra debe ser tan utilizada por el analista para identificar a un compuesto sólido como el punto de fusión. Desde el punto de vista práctico la temperatura de fusión de un sólido cristalino se puede definir como la temperatura a la que el sólido se transformara en líquido a una atmósfera de presión. En una sustancia pura el cambio de estado es muy rápido debido a que el punto de fusión se altera por algunas impurezas, estas constantes constituyen un valioso criterio de pureza cuando una sustancia se mezcla con otra ya que el punto de fusión disminuye a la vez que aumenta el intervalo del mismo. Basado en este hecho se observará un aumento progresivo del punto de fusión a medida que las impurezas disminuyen y alcanzará su valor máximo cuando estos hayan desaparecido mediante la aplicación de los métodos de purificación. Existe para determinarlo desde un equipo de Rhiel rutinario hasta un microscopio (British Pharmacopea, 2002).

1.1.5.2 Absorción en el UV.

Las aplicaciones analíticas de la espectrometría UV tratan principalmente de la determinación de compuestos orgánicos y especialmente de sustancias orgánicas aromáticas o compuestos con enlaces conjugados.

Los aspectos fundamentales que caracterizan las señales en este método se detallan más adelante en este trabajo.

1.1.5.3 Absorción en el IR.

La región IR del espectro electromagnético se extiende entre las regiones visibles y de microonda. Este método constituye una herramienta de trabajo muy utilizada para la investigación y análisis de sustancias puras o mezclas de sustancias. Aunque la espectroscopía IR puede utilizarse en determinaciones analíticas cuantitativas basadas en la ley de Beer, la dificultad de obtener espectros reproducibles, en el campo del análisis, limita su utilización y se remite su empleo en análisis cualitativo.

Unas de las ventajas de este método radican en la facilidad del trabajo con las muestras ya que es posible utilizarlas en estado sólido, líquido o gaseoso (Rubinson J., 2000).

1.1.5.4 Cromatografía de capa delgada (CCD).

Está demostrado que tiene un valor particular ya que ha sido posible aplicarla en estructuras orgánicas como los alcoholes, aminoácidos y péptidos, esteroides, hidratos de carbono, colorantes, pigmentos vegetales, vitaminas, etc. Asimismo ha sido posible aplicarla en otros campos.

La cromatografía en capa delgada tiene grandes ventajas:

- ✓ Rapidez.
- ✓ Estabilidad de la capa respecto a los reveladores agresivos y al calentamiento.
- ✓ El equipamiento que se utiliza es generalmente simple.
- ✓ Es posible, debido a su gran sensibilidad, utilizar algunos agentes reveladores que permitan descubrir masas mínimas (0.01 – 0.005g) de sustancias.
- ✓ Los absorbentes inorgánicos no fluorescentes empleados permiten un mayor contacto de las manchas que sobre papel (Castiñeiras M., 1986).

1.1.6 Identificación y determinación de impurezas.

Para cada fármaco o materia prima existen límites oficiales sobre el contenido de impurezas permisibles, como por ejemplo los expuestos a continuación (Castiñeiras M., 1986).

FÁRMACO	CONTAMINANTES	MÁXIMO ADMISIBLE (%)
Ácido acetil salicílico	Ácido salicílico	0.75
Epinefrina	Arteronol	4
Ergocarciferol	Hidroquinona	0.1
Fenatęcina	p-cloroacetanilida	0.03
Sodio amobarbitol	Amobarbitol	0.5

Algunas impurezas como metales pesados y el arsénico son altamente tóxicos y pueden producir trastornos graves aún en concentraciones pequeñas, la mezcla de partículas extrañas puede alterar la concentración del medicamento produciendo la precipitación de los insolubles y disminuyendo su efecto. Cuando al realizar estos ensayos la muestra tiene más del límite establecido como norma, este tiene que ser desechado y no puede ser utilizado en la preparación de la formulación. La cromatografía de capa delgada es de gran valor en trabajos como medio de asignación de bajas concentraciones de impurezas en medicamentos. Para este propósito la sustancia se aplica y se corre el cromatograma; cualquier mancha secundaria que aparezca después de el relevado se compara en tamaño e intensidad con los correspondientes a las impurezas esperadas y que simultáneamente han sido presentados en la placa.

1.1.6.1 Determinación del contenido de metales pesados por espectrometría de absorción atómica.

La espectrometría de absorción atómica se define como un método analítico basado en la absorción de energía radiante por átomos no combinados químicamente (átomos neutros) del elemento que se analiza, y en la correlación cuantitativa entre esta absorción y la concentración de los iones originalmente presentes en la disolución de la muestra en cuestión.

La producción de átomos libres a partir de un compuesto requiere una cierta cantidad de energía que es suministrada a partir de una lámpara, la cual es construida del propio elemento que se analiza, por lo que emite radiación de longitudes de onda características del elemento en cuestión (Harris D., 2001; Robinson J., 2000).

1.1.7 Ensayos para la determinación cuantitativa de la pureza del producto.

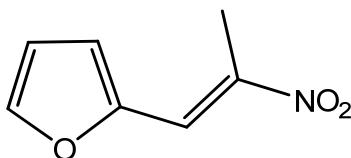
Teniendo en cuenta las estructuras de los compuestos Baez, R y Bernal, N., 1988 refieren diferentes métodos a utilizar en la determinación de su pureza:

Producto	Métodos Cuantitativos
G-0	1. – Métodos volumétricos Determinación del nitrógeno total (Kjedhal). Reducción del grupo nitro y posterior valoración. 2. – Espectrofotometría UV 3. – Cromatografía gaseosa 4. – Calorimetría de exploración diferencial 5. – Polarografía
G-1	1. – Métodos volumétricos Reflujo con KOH y valoración con Ag NO ₃ Determinación de N ₂ total. 2. - Espectrofotometría UV 3. - Cromatografía gaseosa 4. – Calorimetría de exploración diferencial 5. – Polarografía 6. – Métodos de combustión en balón de oxígeno.

1.2 Características del UC-244.

El UC-244 es un compuesto que se encuentra bajo estudio. Este principio activo forma parte de la familia de derivados nitrovinilfuránicos, de los cuales se han sintetizado y caracterizado algunos productos en el Centro de Bioactivos Químicos

En estudios realizados a este principio activo se han determinado su estructura y características:



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

Masa molar: 153.137 g/mol

Fórmula global: C₇H₇O₃N

1.3 Materias Primas de la síntesis del 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 denomina 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.

Nitroetano.

El nitroetano es solamente uno de la familia de químicos llamado (nitroparafinas). Es un líquido incoloro, aceitoso, con olor característico. A continuación se relacionan algunas de sus propiedades.

Fórmula general: $C_2H_5NO_2$

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/100ml 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 que forman compuestos inestables frente al choque. En combustión, forman 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 tacto 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 (aire=1): 2.5

Entre sus propiedades se destaca que por combustión, forma gases tóxicos y corrosivos, incluyendo monóxido de carbono y óxido de nitrógeno. La disolución en agua es moderadamente básica. Reacciona violentamente con oxidantes. La sustancia es corrosiva para los ojos, la piel, el tacto respiratorio y 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 relación con nitritos produce nitrosoaminas, sustancias cancerígenas que aumentan el riesgo de cáncer de esófago (Catálogo General Panreac, 2001).

1.4 Importancia y utilización del UC-244.

Este compuesto aún bajo estudio, ha demostrado su 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 domestica*) mostrando su efectividad a 0.1-1%, aunque el G-0, otro compuesto furánico también sintetizado en el Centro de Bioactivos Químicos, mostró mayor efectividad. El UC-244 también ataca a ácaros que son perjudiciales para los granos almacenados, tanto en larvas como adultos. Los vapores logran difundirse por todo el material y logran eliminar el *Sitophilus oryzae* (Gorgojo del arroz), el *Tribolium castaneum* (Escarabajo rojo de la harina) y el *Cryptolestes* 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* el cual ataca al frijol Chiclayo o Caupí.

En las concentraciones ensayadas no presentaron afectaciones las semillas almacenadas ante su posterior germinación y produjo 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. La harina almacenada también es atacada por los gorgojos a los que los vapores del compuesto eliminan con eficacia en la semana, incluyendo sus larvas (Machado R y Colaboradores, 2003). Fue efectivo además ante ácaros del género Rhizoglyphus, los estudios revelan que al ser aplicado al compuesto al 25%, no afecta la brotación de la semilla ni el desarrollo posterior de la planta Salazar E., 1996 y Saucedo, 2004; han 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 a los cuales se les estudió el efecto del producto, fueron del género *Sitophilus* spp (*Sitophilus oryzae*, *Sitophilus zeamais* y *Sitophilus granarius*), así como *Rhizoperta dominica* (polilla de las harinas).

Los resultados parciales obtenidos demuestran un efecto de repelencia y letal sobre los insectos, con mayor acción a partir de los 10 días en los insectos del género *Sitophilus* spp. Se estudió el efecto sobre el pienso industrial del insecto plaga *Rhizoperta dominica* (polilla de los cereales), mediante el producto UC-244 (en forma sólida), presentándose un efecto letal a los 12 días.

Además se evaluó el UC-244 en cultivos de habichuelas y frijoles ante plagas de *Thrips palmi* kany siendo eficaz a concentraciones de 0.1%. También se estudió el UC-244 frente a *Artemia salina* Leach y *Hemisia tabacci* Genn. La *Artemia* spp son camarones minúsculos de cuerpo blando, de color carmelita y transparentes a la luz. El ensayo se basa en que la mayoría de los compuestos activos son tóxicos a las larvas de *Artemia* spp. Es un ensayo general de amplio uso, que determina el efecto letal de los materiales sobre las larvas de *Artemia* spp, y de esta manera se predice su habilidad para producir la muerte de células cancerígenas en cultivos 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 a la *Artemia salina* posee acción plaguicida potencial e induce a considerar su evaluación en ensayos más específicos.

La *Hemisia tabacci* Genn conocida comúnmente como mosca blanca del algodón 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 disminuir el rendimiento de forma directa al alimentarse del tejido de las 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 de 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% a la concentración mas baja evaluada a las 48 horas (16µg/ml). A concentraciones superiores (2000 y 1000µg/ml) causó la muerte de todas las moscas evaluadas antes de que estas fueran transferidas al vial de las plantas.

En la Tabla 1.1 se muestran unas de las principales acciones del UC-244 frente a diferentes especies de coleópteros.

Tabla 1.1 Principales acciones del UC-244.

ACCIONES DEL UC-244 FRENTE A:		EVALUADOS EN:
Coleópteros de las especies: ➤ <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
Musca doméstica	0.1% y 0.25%	
➤ <i>Sitophilus oryzae</i> (Gorgojo del arroz)	5g/m ³	Arroz
➤ <i>Rhizopertha dominica</i> ➤ <i>Bostrico de los granos</i>	0.1% No afecta la brotación, ni tamaño de las hojas.	Ajo
➤ <i>Triboliumcasteneum</i> (Escarabajo rojo de la harina). ➤ <i>Crystolestos sp</i> (Gorgojo del trigo o gorgojo plano de los granos).	5 g/m ³	Trigo
<i>Zabroles subfasciatus</i>	2.5 g/m ³	Frijol Chiclayo o Caupí
➤ <i>Sitophilus sp</i> (<i>Sitophilus oryzae</i> <i>Sitophilus zea</i> <i>mais</i> y <i>Sitophilus granaries</i>).		Sorgo(<i>Sorghum</i> <i>bicolor</i>)
➤ <i>Hemisia tabacci Genn</i> (mosca blanca del algodonero o de la batata).	16 µg/ml	Plantas
➤ <i>Artemia spp</i>	10 a 1000 µg/ml	Larvas de <i>Artemia spp</i>

1.5 Aspectos fármaco- toxicológicos de la molécula del UC-244.

Los estudios farmacológicos que sustentan, desde el punto de vista científico, el empleo de la molécula del UC-244 en el campo de la terapéutica se refieren a sus acciones antiinflamatoria y acaricida fundamentalmente. La actividad antiinflamatoria de esta molécula ha sido demostrada mediante ensayos farmacológicos desarrollados en el Departamento de Farmacia de la Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas (UCLV) (Loy S., 1998), así como en el Centro de Química Farmacéutica (CQF) de la Habana (Caveda L., 1991). La acción acaricida se determinó por el Grupo de Parasitología de la Estación Nacional Experimental de Parasitología (ENEP) y el Grupo de Parasitología del Centro de Bioactivos Químicos (CBQ) de la UCLV, (Cordobés, 1993; Olazábal, 1991).

Los estudios toxicológicos de esta molécula la clasifican como de toxicidad moderada, ya que su dosis letal media oral (DL_{50}) es de 561.6 y 448 mg/Kg de masa corporal (m.c.) para ratas Wistar de sexo masculino y femenino respectivamente. El criterio técnico toxicológico no considera esta molécula con limitaciones para ser empleada como medicamento, puesto que en este rango es común encontrar la inmensa mayoría de los medicamentos. En estudios desarrollados en la Universidad de Leipzig, Alemania, se demostró que el órgano diana en caso de intoxicación aguda por sobredosis es el hígado, donde se produce la biotransformación de la molécula. En estudio subcrónico de 90 días de aplicación por vía oral la molécula de UC-244 a ratas de laboratorio Wistar no se apreciaron efectos tóxicos a la dosis más baja y sí se apreció un aumento de los niveles de las enzimas A1AT y fosfatasa alcalina (FA) para el resto de las dosis. Estos aumentos enzimáticos sin daños celulares marcados, indican que las dosis relativamente altas, no ejercen un considerable efecto tóxico para la vía y especie estudiada. En lo referente al contacto con estructuras oculares, piel y mucosa se debe evitar el contacto con la sustancia pura, así como en concentraciones altas por ser muy irritante (Pérez JA., 1988).

Estudios teóricos basados en las características electrónicas moleculares de los grupos nitro en compuestos furiletilénicos, han demostrado acción mutagénica atribuida a la presencia del grupo nitro en el anillo furánico, donde se favorece la reducción del mismo. Sin embargo, en el UC-244 estos grupos no son susceptibles a sufrir la reducción antes referida y por tanto la acción mutagénica no se manifiesta marcadamente (Estrada E., 1994). El desarrollo de una nueva molécula, es un largo y costoso camino en el cual muchas no llegan a la meta anhelada, la salida al mercado farmacéutico. El UC-244 debe completar su ruta crítica para el desarrollo de medicamentos y a medida que se cumplimenten los requisitos regulatorios, será posible ampliar los criterios de efectividad terapéutica e inocuidad. Hasta el momento, esta molécula muestra perspectivas en la terapéutica y no existen limitaciones toxicológicas que invaliden su posible uso en algunos campos de la industria farmacéutica.

1.6 Estudios anteriores de síntesis y purificación del UC-244.

Estudios anteriores de caracterización químico-farmacéuticos realizados por Martínez, M (1994), al UC-244, fueron sin estandarizar la tecnología de obtención, lo que traía como consecuencia que el mismo se comportara como un sólido de una calidad variable, trayendo consigo que no se le realizaran los estudios de composición y pureza al producto. En estudios posteriores, se estandarizó el método de obtención del UC-244, lo que condujo a que se realizaran estudios preliminares de las condiciones para la determinación cuantitativa del UC-244, mediante la aplicación de la espectrofotometría UV, cromatografía de capa delgada y polarografía de onda cuadrada (Rodríguez Z., 2007).

1.7 Técnicas analíticas.

En este centro se cuenta con equipamiento fundamentalmente para determinadas técnicas analíticas como son: Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), Cromatografía de Gases (GC), y Polarografía Diferencial de Pulso (PDP). Las dos primeras son rápidas y de gran sensibilidad pero demasiado costosas para pequeñas industrias además de que las impurezas del UC-244 pueden obstruir la columna, y la tercera es sencilla, confiable y rápida pero en el centro sólo se cuenta con un equipo destinado a la investigación, es decir la fábrica como parte del control de la calidad no cuenta con esas técnicas para su aplicación.

De acuerdo con su estructura, es decir por la presencia de un grupo nitro el que permite reacciones de oxidación –reducción, el UC-244 también se pudiera determinar por Potenciometría.

Una técnica de separación sencilla es la Cromatografía de Capa Delgada (CCD), la que se puede combinar con las anteriormente mencionadas para la optimización del proceso de análisis, lo que la hace más selectiva.

1.7.1 Cromatografía de Capa Delgada (CCD).

La cromatografía comprende un grupo de métodos de separación variados que permiten 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 (estacionaria y 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 (Rubinson J., 2000).

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 este. 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 relevado en caso necesario.

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

$$R_f = D_1/D_2$$

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 patrón si es posible. El valor del Rf 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 de 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.

1.7.2 Cromatografía gaseosa (GC).

En cromatografía de gases se hace pasar el analito en forma gaseosa a través de la columna, arrastrado por una fase móvil gaseosa, llamada **gas portador**. En cromatografía gas-líquido de reparto, la fase estacionaria es un líquido que recubre la pared interior de una columna o un soporte sólido. En cromatografía gas-sólido de adsorción, el analito se adsorbe directamente sobre las partículas sólidas de la fase estacionaria.

La muestra de un líquido volátil o de un gas se inyecta, a través de un septo (un disco de goma), en un portador caliente, en el que se evapora rápidamente. El vapor es arrastrado a través de la columna por el gas portador, que puede ser He, N₂ o H₂, y los analitos después de separados llegan al detector, cuya respuesta aparece en la pantalla de un ordenador o en un registrador. La columna debe estar suficientemente caliente a fin de que los analitos alcancen una presión de vapor suficiente para que se eluyan en un tiempo razonable. El detector se mantiene a una temperatura más alta que la columna, de forma que los analitos se encuentran en forma gaseosa (Harris D., 2001).

Entre los detectores más usados están: Detector de ionización por llama y Detector por Espectrometría de masa.

El detector por ionización se basa en una llama de hidrógeno que produce la ionización de las moléculas gaseosas que la rodean. Si esta llama se encuentra en un campo eléctrico fuerte, los iones migran de acuerdo con sus cargas respectivas hacia los electrodos de carga opuesta, estableciéndose una corriente, la cual es débil. Sin embargo cuando un compuesto carbonado se quema en esta llama, la formación de iones es grande y la corriente producida es perfectamente medible y dentro de ciertos límites proporcional a la cantidad de compuesto que ha pasado por el detector.

El detector de masas registra el espectro de masa de cada compuesto eluido a la salida de una columna gascromatográfica. En un acople GC-MS, las moléculas eluidas de la columna, libres de las moléculas del gas portador por el efecto del paso a través de la interfase, son ionizadas en la fuente, pues el espectrómetro de masa solo es capaz de detectar especies iónicas.

Los iones formados en la fuente, así como los fragmentos de esta son separados y enfocados hacia el detector mediante el analizador de masas. Los haces de iones de igual relación m/z impactan en el detector, el cual determina su intensidad (Dierksmeier, G., 2005).

1.7.3 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 UV lejano hay gran absorción de oxígeno y nitrógeno, por lo que se necesita un material óptico especial y detectores especiales, además en el absorben los solventes mas comunes lo que hace mas compleja su selección. En el UV 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 $n-\pi^*$ son 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., 1992-1993). 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 cuantitativo, la cual establece que la absorción de una solución es proporcional a la concentración del soluto.

Expresión de la ley:

$$A = a b c$$

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 mediante una curva de calibración, en la cual queda la absorbancia en 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; Willard., 1991).

1.7.4 Método combinado de CCD- Espectrofotometría UV.

Según (Heftmann E., 1967) y (Rubinson J., 2000) 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 relevado 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, 1997; Willard, 1991; Torres L., 2003).

1.7.5 Técnicas analíticas realizadas al UC-244.

En estudios realizados por Rodríguez M., 2005, se emplea la técnica espectroscópica UV-VIS a una longitud de onda máxima de absorción de 350 nm combinada con una separación previa de cromatografía de capa delgada, empleando como fase móvil éter de petróleo-cloroformo (2:1). Esta técnica combinada resultó ser lineal, exacta, específica, con un límite de cuantificación que se encuentra en los 4 mg/L y un límite de detección en 0.4 mg/L. Estudios posteriores realizados por Pérez D., 2006, emplean la misma técnica espectroscópica UV-VIS demostrando que la misma es lineal y reproducible en las condiciones en las cuales se llevó a cabo. Las señales analíticas del UC-244 por cromatografía de capa delgada, con un $R_f = 0.54$ y por HPLC con un tiempo de retención de 7.660, en las condiciones de separación referidas permite un reconocimiento cualitativo del producto. Luego estos estudios fueron seguidos por Echevarría W., 2007 mejorando aún más los resultados ya que la técnica por CCD-UV sigue siendo lineal, específica y exacta pero ahora con un límite de cuantificación que se encuentra en los 6 mg/L. Estos mismos estudios se llevaron a cabo por Pérez M., 2008 mejorando aún más los resultados por una técnica analítica de cromatografía HPLC y Voltametría SQV resultando ser lineales en los intervalos de concentración de 5 a 40 mg/L y de 6.62 a 50.64 mg/L respectivamente.

1.8 Parámetros estadísticos.

Diseño de experimentos (Hald A, 2000).

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

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 propiedades de los sistemas multicomponentes.

Para realizar un diseño de experimento 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, cuantitativa y expresada mediante un valor único así como efectivo estadísticamente.

1.8.1 Algunos conceptos generales relacionados con el diseño factorial experimental (Freud, 1983).

Factor.

Las variables independientes que influyen o pueden influir sobre un 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 designados con la letra X_i , 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 costo 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 depende 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 la variable dependiente en el diseño y este puede ser expresado en coordenadas reales o muy a menudo en parámetros codificados.

Superficie de nivel.

Es la forma geométrica de la función respuesta en el espacio multifactorial.

Espacio factorial.

Se denomina así al espacio delimitado por los ejes del sistema de coordenadas en que se representan los valores de los factores.

1.9 Parámetros de validación de una técnica analítica.

Para realizar la cuantificación de los crudos del proceso de producción hay que contar con una técnica analítica previamente validada para garantizar resultados confiables.

La necesidad de aplicar una validación se resume en:

- Proporciona un alto grado de confianza al método analítico y a la calidad de los resultados.
- Permite un alto conocimiento de las características del funcionamiento del método analítico.
- Hace posible el cumplimiento de las normas establecidas (Castro M., 1989).

Los métodos analíticos a utilizar deben ser prácticos, es decir si son fáciles de aplicar; idóneo y fiable.

Criterios numéricos para seleccionar métodos analíticos (Castro M., 1989; Skoog, 1997).

- Linealidad
- Precisión
- Exactitud
- Límite de detección y límite de cuantificación
- Sensibilidad
- Especificidad

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 (ICH, 2000; Castro M., 1989).

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. Este se calcula según la siguiente fórmula:

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

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

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 **b** debe ser cero pues indica el error sistemático del método. Si los límites de confianza del término independiente incluyen al cero, se cumple la condición de proporcionalidad. 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 ($p=0.05$) (Apers S., 2006; Jiménez E., 2003; Trygg J., 2002; Castro M., 1989; NC TS-368:2004).

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

$$t_{exp} = \frac{|b|}{S_b}$$

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.

Dentro de la precisión se incluyen:

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 nueve determinaciones de la sustancia de interés variando los niveles de concentraciones especificados para el procedimiento, por ejemplo tres concentraciones diferentes con tres réplicas cada una (Apers S., 2006).
- II) Un mínimo de seis determinaciones y calcular la media aritmética ($\bar{X}$), desviación estándar (S), y desviación estándar relativa o coeficiente de variación (CV).

Precisión intermedia:(*reproducibilidad intralaboratorio*) Precisión en condiciones intermedias entre repetibilidad y reproducibilidad. Por ejemplo, precisión con el mismo método, diferentes operadores, diferentes instrumentos y durante un intervalo de tiempo largo en el mismo laboratorio. El procedimiento estándar se basa en analizar seis muestras diarias durante tres días (Apers S., 2006).

Reproducibilidad.

Es la medida de la precisión de los resultados de un método analítico efectuado sobre una misma muestra pero en condiciones diferentes. Cuando la medida se realiza en laboratorios diferentes se habla de precisión inter laboratorios. Para este tipo de estudio igual que para la repetibilidad se recomienda hacer un mínimo de seis determinaciones de la sustancia de interés al 100% del nivel normal del procedimiento y calcular el coeficiente de variación (CV) siguiendo el criterio de la ecuación de Horwitz ($CV\% = 2^{(1-0.5*\log C)}$), donde el CV_{teor} obtenido mediante la fórmula anterior es mayor que el CV_{exp} obtenido por el análisis de la reproducibilidad (Crosby, N. 1997).

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 (AOAC International, 2002; NC ISO 5725-1:2005).

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 (Apers S., 2006).

La determinación de la exactitud se puede llevar a cabo según (Apers S., 2006; Jiménez E., 2003):

- a) Análisis repetitivo de una muestra de concentración única conocida. Se analiza varias veces (6-10) 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.

1.9.4 Límite de detección y límite de cuantificación.

Estos parámetros se relacionan con la cantidad de analito requerida para dar un resultado significativo, cualitativo o cuantitativo.

El límite de detección

Es la menor concentración de analito en una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones experimentales establecidas.

El límite de cuantificación o determinación

Es la menor concentración o cantidad de analito de una muestra que puede ser determinada con aceptable precisión y exactitud bajo las condiciones experimentales establecidas. Numéricamente es mayor el límite de cuantificación y representa la menor cantidad de analito que puede analizarse con un coeficiente de variación aceptable.

Concentraciones menores pueden detectarse pero no cuantificarse. La determinación de los límites de detección y cuantificación cobra mayor importancia cuando el nivel inferior del rango del método analítico se acerca a estos límites (Morales S., 2006).

Varios son los procedimientos que, según la literatura consultada, pueden utilizarse para la determinación de los límites de detección y cuantificación (Apers S., 2006; NC TS-368:2004):

Basado en la evaluación visual

El límite de detección es determinado por el análisis de muestras con concentraciones decrecientes conocidas del analito, estimando el nivel mínimo al cual puede ser detectado. El límite de cuantificación es generalmente determinado por este procedimiento evaluando la menor cantidad del analito que puede ser cuantificado con aceptable precisión y exactitud.

Basado en la relación señal-ruido

Este procedimiento es solo aplicado a técnicas analíticas que presentan línea base de ruido. La determinación de la relación señal ruido puede ser llevada a cabo por comparación de la señal de una muestra con una baja concentración conocida del analito con la respuesta de muestras blanco y estabilizando la concentración mínima a la cual puede ser detectado el analito.

Una relación señal ruido entre 3 ó 2:1 es generalmente considerada aceptable para estimar el límite de detección. Por su parte el límite de cuantificación se establece para una relación señal ruido 10:1.

Basado en el valor de la ordenada en el origen expresado en unidades de concentración

Si la recta de calibración del ensayo de linealidad se ha confeccionado con un rango de concentraciones bajo, se admite utilizar el término independiente **b** para estimar, aproximadamente, el límite de detección. El límite inferior de la respuesta se toma como $3 |b|$ y el límite de detección expresado en las mismas unidades que las abscisas en la recta de calibración es $3 |b| / m$.

Basado en la desviación estándar de la respuesta (del blanco) y en la pendiente de calibrado

El límite de detección (LD) o cuantificación (LC) puede ser expresado como:

$$C_l = \frac{K * S_{bl}}{b}$$

Donde:

C_L = límite de detección o cuantificación.

K = constante (K = 3 para límite de detección y K = 10 para límite de cuantificación).

S_{bl} = desviación estándar de la respuesta de los n blancos.

b = pendiente de la recta de calibración.

La pendiente puede ser estimada por la curva de calibración del analito. La estimación de la desviación estándar puede ser desarrollada de varias formas, por ejemplo (Apers S., 2006; ICH, 2000; NC TS-368:2004):

Basada en la desviación estándar del blanco

Analizando un número apropiado (al menos 10) de muestras blanco y calculando la desviación estándar de la respuesta.

Este procedimiento es utilizado en métodos con corrección de lectura frente al blanco como por ejemplo la espectrofotometría UV-VIS, espectrofluorimetría, etc. en los que la lectura del problema se obtiene por comparación con un blanco.

Basada en la curva de calibración

Realizando una curva de calibración específica para este estudio usando muestras que contengan al analito en el intervalo del límite de detección y cuantificación. La desviación estándar residual de una línea de regresión o la desviación estándar del intercepto y de la línea de regresión pueden ser usadas como desviación estándar.

1.9.5 Selectividad y especificidad.

La selectividad describe la capacidad de un método analítico para diferenciar varias sustancias en la muestra. Este concepto es aplicable a métodos en los que se separan y cuantifican dos o más componentes.

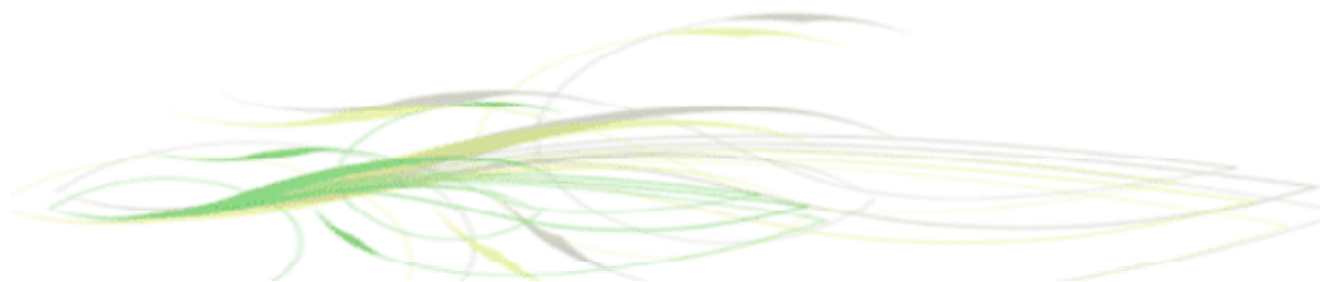
En contraste con la selectividad, la especificidad describe la capacidad del método para medir inequívocamente el componente de interés en presencia de todos los demás constituyentes que se espera que puedan estar presentes. En este caso, este término se aplica a técnicas analíticas en las que se puede medir un único parámetro, selectividad, es decir, se basa en la suposición de que no pueden producirse interferencias.

Ambos términos se usan frecuentemente de forma indistinta, y su conexión se ve claramente en la siguiente definición de especificidad: es la capacidad de medir exactamente y específicamente el componente a determinar en presencia de otros constituyentes que se espera que puedan estar presentes (NC-TS-368: 2004).

Existen varios procedimientos que permiten demostrar la especificidad de un método (NC TS-368:2004):

- A) Se prepara un blanco de la muestra problema y se determina el analito en las condiciones del método.
- B) Se adiciona una cantidad de un patrón del analito a una porción del blanco recién preparado y se compara la respuesta con la de una disolución patrón del analito. En ambas la concentración del analito será similar a la concentración teórica del mismo en el producto.
- C) Se añade una cantidad de una disolución patrón de analito cargado con impurezas en concentraciones adecuadas a una porción del blanco recién preparado y se compara la respuesta con una disolución patrón del analito. La concentración del analito será similar a la concentración teórica del mismo.

Las referencias más actualizadas consultadas plantean que la especificidad será sólo estimada cuando sea posible, o lo que es igual, cuando la técnica usada para el análisis de la muestra permita investigar la especificidad, por ejemplo HPLC-DAD o GC/MS; en caso contrario, el estudio de la especificidad podrá ser reforzado a través de la comparación con otro método ya validado (Apers S., 2006; Regulación No. 41 CECMED, 2007).



Materiales y métodos

Capítulo II

Materiales y Métodos

2.1 Reactivos y Equipamiento.

Reactivos químicos y disoluciones.

Etanol (clase A), cloroformo (p.a.), éter dietílico, éter de petróleo (40 - 60°C), tetracloruro de carbono, metanol, isobutilamina, furfural, nitroetano, carbón activado, ácido sulfúrico (p.a), ácido clorhídrico (p.a), benzoato de etilo (p.a).

2.1.1 Preparación de disoluciones.

Preparación del estándar interno.

Se pipetearon 0.25 mL de benzoato de etilo (p.a, $d_4^{20}=1.046$) y se enrasaron en un frasco volumétrico con 100 mL de etanol, con lo que se obtuvo una concentración de 0.013 mol/L.

De esa disolución se toman 10 mL y se enrasan en un frasco volumétrico de 100 mL con etanol, quedando la misma con una concentración de 0.0013 mol/L. (Disolución A)

Disolución de furfural 1000 mg /L.

Se midió 0.02 mL de furfural y se añadió en un frasco volumétrico de 25 mL, se completó hasta el enrase con la disolución A, con lo que se obtuvo una concentración de 1000 mg/L.

Disolución de nitroetano 1000 mg /L.

Se midió 0.02 mL de nitroetano y se añadió en frascos volumétricos de 25 mL, se completaron hasta el enrase con disolución A, con lo que se obtuvo una concentración de 1000 mg/L.

Disolución de isobutilamina 1000 mg /L.

Se midió 0.03 mL de IBA y se añadió en un frasco volumétrico de 25 mL, se completó hasta el enrase con disolución A, con lo que se obtuvo una concentración de 1000 mg/L.

Equipamiento.

Balanza analítica Sartorius.

Baño ultrasónico marca Bandelin Sonorex TK 52.

Estufa Binder

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

Microjeringuilla Hamilton 88000 de 5µL.

Microjeringuilla Hamilton Bonaduz de 10 µL.

Espectrofotómetro UV-VIS Camspec.

Espectrofotómetro IR Rayleigh WQF-510 FTIR

Espectrofotómetro de Absorción Atómica PYE Unicam SP9 Philips.

Cromatógrafo de gases DANI GC 1000 DPC

Cromatógrafo de gases-espectrómetro de masas GC-MS-QP5050A SHIMADZU

Cubetas de cuarzo de 6 mm.

Crisoles de porcelana.

Desecadora con sílica gel activada

Pinzas

Pesafiltros

Pipeta graduada de 0.1 mL, 1 mL, 5 mL.

Pipeta aforada de 1 mL, 10 mL.

Beaker de 10, 20, 75, 100 mL

Probeta de 100 mL.

Mortero

Matraces aforados de 10 mL, 25 mL, 50 mL y 100 mL.

Microplatina Barnstead Electrothermal BI 9100

2.2 Proceso de obtención de la muestra de referencia de UC-244.

Para obtener una muestra de UC-244 de una pureza elevada que pueda ser empleada como referencia en los procedimientos de calibración de las técnicas analíticas, se tomaron las condiciones de síntesis obtenidas por Echevarría W., 2007, las que se refieren a continuación en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1 Condiciones para la síntesis a escala de 6 moles.

Variables	Condiciones
Nitroetano (mL)	456.4 (6.4 mol)
Isobutilamina (mL)	23.5 (0.225 mol)
Furfural (mL)	497 (6 mol)
Tiempo de contacto (h)	0.5
Temperatura (°C)	120
Tiempo de reacción (h)	3.5

2.2.1 Purificación del producto.

Se pesan 100g de UC-244 y se disuelven en etanol a 50°C. Se pone en contacto el UC-244 disuelto en etanol con el carbón activado durante de 10 min. Se filtra y se enfría a bajas temperaturas. Posteriormente se lleva a cabo un proceso de recristalización para ello se disuelve el UC-244 en etanol a 50°C, se filtra y se deja enfriar a bajas temperaturas. El UC-244 obtenido se seca en una estufa a 30°C. En la Tabla 2.2 se muestran las condiciones bajo las cuales se lleva a cabo la purificación.

Tabla 2.2 Condiciones óptimas para la purificación.

Variables	Condiciones
Etanol (ml/g de UC-244)	4
Carbón activado (g/g de UC-244)	0.5
Tiempo de Contacto (min)	10
Temperatura (°C)	50

La recristalización se lleva a cabo con el mismo procedimiento pero la mitad de la cantidad de carbón activado, las condiciones se representan en la Tabla 2.3.

Tabla 2.3 Condiciones óptimas para la recristalización.

Variables	Condiciones
Etanol (ml/g de UC-244)	4
Carbón activado (g/g de UC-244)	0.25
Tiempo de Contacto (min)	10
Temperatura (°C)	50

2.3 Determinación de los Parámetros de Calidad del UC-244 como materia prima.

2.3.1 Descripción.

➤ Color.

➤ Olor.

2.3.2 Pérdidas por desecación.

Este procedimiento se basa en la determinación de la variación de la masa, mediante un proceso de secado de la muestra de ensayo en estufa a presión atmosférica y 30° C.

Primeramente se colocan los pesafiltros en una estufa a 30° C durante una hora, posteriormente se pasan a una desecadora hasta que alcancen la temperatura ambiente, se pesan y se introducen nuevamente en la estufa durante 15 minutos, este procedimiento se repite hasta que se logre peso constante, o sea que la diferencia entre dos pesadas consecutivas sea inferior a 0,5 mg.

Cuando los pesafiltros sean llevados a peso constante se pesa 1.0 g de UC-244. Se tapa el pesafiltro y se agita suavemente a uno y otro lado distribuyendo el contenido tan uniformemente como sea posible, de modo que el espesor de la capa en el fondo del envase no sea mayor de 2 mm. Se colocan los pesafiltros con la muestra de ensayo en la estufa durante 4 h a 30° C y a presión atmosférica, (se vira la tapa del pesafiltro).

Pasado este tiempo se sacan los pesafiltros de la estufa, y se colocan en una desecadora hasta que adquiera la temperatura ambiente. Se pesan y se repite el procedimiento anterior reduciendo los intervalos de tiempo a 2 h, hasta que la sustancia adquiera peso constante (US Pharmacopoeia XXX, 2008).

La pérdida por desecación (%Ps), expresada en por ciento, se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\%Ps = \frac{(Pf + Msd) - (Pf + Md)}{(Pf + Msd) - (Pf \text{ vacío})} \cdot 100$$

Donde:

(Pf + Msd): peso del pesafiltro que contiene la muestra sin desecar.

(Pf + Md): peso del pesafiltro que contiene la muestra desecada.

(Pf vacío): peso del pesafiltro vacío.

2.3.3 Residuos de ignición.

Este procedimiento se basa en la determinación de la cantidad de materia no volátil presente en la muestra, mediante un proceso de incineración de la misma a 800 °C.

Inicialmente se colocan los crisoles en una mufla a 900 °C durante una hora, posteriormente se transfieren a una desecadora con sílica gel hasta que los mismos alcancen la temperatura ambiente, se pesan y se introducen nuevamente en la mufla siguiendo este procedimiento hasta que la diferencia entre dos pesadas consecutivas sea inferior a 0.5 mg. Una vez tarados los crisoles se pesa 1.0 g de UC-244. Se calienta en una plancha hasta su total carbonización y luego se humedece el residuo con 1 mL de ácido sulfúrico y se calienta suavemente hasta que no se observen humos densos blancos. Se incinera entonces en una mufla 2 h a 800 °C, el residuo se coloca en una desecadora con sílica gel hasta que alcance temperatura ambiente. Posteriormente se pesa y se vuelve a introducir nuevamente en la mufla durante 30 min y se repite el mismo procedimiento hasta que la diferencia entre dos pesadas consecutivas sea menor a 0.5 mg (US Pharmacopoeia XXX, 2008).

Los residuos de ignición (%R), expresados en por ciento, se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\%R = \frac{(Pf - Pi)}{Pt} \cdot 100$$

Donde:

Pi: peso inicial del crisol.

Pf: peso final del crisol tarado más residuo.

Pt: peso de muestra.

2.3.4 Metales pesados.

Este procedimiento se basa en la determinación del contenido de metales pesados presentes en la muestra de UC-244 mediante el método de absorción atómica.

Inicialmente se le llevó a cabo a la muestra una digestión en medio ácido, para la misma se pesa en un crisol 1.0 g de UC-244. Se calienta en una plancha hasta su total carbonización, cuando termina de desprender todos los vapores se incinera en una mufla a 500 °C por 4 h, el residuo se disuelve en una solución de HCl (1:1) y se transfiere a un frasco volumétrico de 50 mL, a esta solución se le determinaron metales como: (plomo, cobalto, manganeso, hierro y estaño), fijando las siguientes condiciones representadas en la Tabla 2.4.

Tabla 2.4 Condiciones de trabajo

Metales	Condiciones				
	Línea princ (nm)	Paso de banda (nm)	Llama	Corriente lámpara (mA)	Presión de acetileno (L/min)
Co	240.7	0.2	Aire-acetileno	13	0.9-1.2
Pb	217.0	0.2	Aire-acetileno	13	0.9-1.2
Fe	248.3	0.2	Aire-acetileno	12	0.9-1.2
Sn	224.6	0.2	Aire-acetileno	10	1.1-1.5
Mn	279.5	0.2	Aire-acetileno	10	0.9

2.3.5 Punto de fusión.

Se toman unos cristales pequeños de UC-244 purificado y se introducen en una microplatina para determinar la temperatura a la cual la sustancia en estado sólido se encuentra en equilibrio con el estado líquido.

2.3.6 Absorción en el UV.

Se registran los espectros de una disolución de UC-244 de concentración 20 mg/L en la región UV con diferentes solventes como: etanol, metanol, éter dietílico, tetracloruro de carbono y éter de petróleo (40 - 60°C) para verificar los máximos de absorción del compuesto en cuestión.

2.3.7 Absorción en el IR.

Se registra el espectro de UC-244 en su estado sólido formando una pastilla con el KBr para verificar la presencia de los grupos funcionales que constituyen bandas características de esta sustancia en la región IR.

2.3.8 Registro comatográfico gaseoso.

Se registran los cromatogramas gaseosos con detector de ionización de llamas y espectrometría de masas del UC-244 en las condiciones descritas en los epígrafes 2.7 y 2.10, a fin de comprobar su pureza.

2.4 Método combinado de CCD-Espectrofotometría UV-VIS.

Preparación de la curva de calibración.

Se pesan en una balanza analítica 1g (con precisión de 0.1mg) 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 cada una de estas soluciones se toman 5 µL para aplicarlos en una placa cromatográfica y correr el cromatograma en cloroformo, luego de desarrollado el mismo se recorta la mancha de color amarillo correspondiente al UC-244 y se eluye en 5 mL de etanol y se pasa a determinar espectrofotométricamente a una longitud de onda máxima de 350 nm la absorbancia.

2.5 Evaluación de los parámetros de validación de la técnica por CCD-Espectrofotometría UV-VIS.

Se revalida la técnica referida mediante la determinación de algunos parámetros, a fin de ser aplicada en el control de la calidad del UC-244 en los procesos de síntesis y purificación.

2.5.1 Linealidad.

El estudio de linealidad de este método fue realizado en el intervalo de concentraciones de 8.001 mg/L a 20.126 mg/L de UC-244.

Fueron determinados los parámetros de la ecuación de la recta de mejor ajuste $y=mx+b$ así como los referidos en el epígrafe 1.9.1 pertenecientes al estudio de linealidad. Como son:

El coeficiente de correlación lineal, r .

El coeficiente de variación de la función respuesta, CV_f .

La desviación estándar relativa de la pendiente, S_m .

El intervalo de confianza del intercepto.

También se realizó una prueba t de Student para evaluar la sensibilidad de calibrado.

Los criterios de aceptación que se siguieron fueron los siguientes (NC TS-368:2004):

Coeficiente de correlación lineal: $r \geq 0,99$.

Pendiente: $m \neq 0$.

Coeficiente de variación de los factores de respuesta: $CV_f \leq 5 \%$.

Desviación estándar relativa de la pendiente: $S_m \leq 2\%$.

Intervalo de confianza del intercepto: (que contenga al cero).

2.5.2 Precisión.

Para el estudio de la precisión se llevó a cabo un análisis de la repetibilidad y la reproducibilidad intermedia.

Repetibilidad.

Para este estudio de repetibilidad se realizaron 6 determinaciones de un punto intermedio de la curva de calibración (14.007 mg/L) en un mismo día, bajo las mismas condiciones y por el mismo analista.

Se calculó:

La concentración media de los 6 resultados, X_m

La desviación estándar, S

El coeficiente de variación de la repetibilidad (CV) de los 6 resultados.

Tomando como criterio de repetibilidad que el $CV < 3\%$ (Regulación No. 41 CECMED, 2007).

Reproducibilidad intermedia.

Para este estudio de reproducibilidad se realizaron 8 determinaciones de un punto intermedio de la curva de calibración (14.002 y 14.001 mg/L) en diferentes días, diferentes condiciones y diferentes analistas.

También se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar el efecto de cada uno de los factores (día y analista) por separado.

Se calculó:

La concentración media de los 8 resultados, X_m

La desviación estándar, S

El coeficiente de variación de la repetibilidad (CV_{exp}) de los 8 resultados.

Se determinó el valor de F_{cal} a partir de un análisis de varianza para conocer si existieron o no diferencias significativas entre los resultados de los diferentes analistas.

Cálculo del estadígrafo de Fisher (F) (Regulación No. 41 CECMED, 2007).

$$F = S_1^2 / S_2^2$$

Para el análisis de la precisión intermedia del método propuesto se consideraron como:

Si $F_{cal} < F_{tab}$, se puede concluir que los resultados obtenidos en los diferentes

analistas no difieren entre si y el método es preciso.

Se tomó como criterio de reproducibilidad que el $CV_{teor} > CV_{exp}$ (Crosby, N. 1997).

$$CV_{teor} (\%) = 2^{(1-0.5*\log C)}$$

2.5.3 Exactitud.

Para la determinación de la exactitud del método se realizaron 5 determinaciones de una disolución de referencia de 14.007mg/L comprendida en el rango de concentraciones de la curva de calibración.

Luego se comparó el valor experimental de t con el valor tabulado a través del cálculo:

$$t_{exp} = \frac{|C_t - C_m| \sqrt{n}}{S}$$

Donde:

C_m : Concentración media experimental, C_t : Concentración teórica, n : Número de réplicas y S : Desviación estándar.

Si $t_{cal} < t_{(n-1; \alpha)}$ cuando $\alpha = 0.05$ el método puede ser considerado exacto (Apers S., 2006).

Se comparó el valor medio encontrado con el esperado en cada caso, a través del cálculo del recobro.

$$\frac{\bar{C}_x}{C_{TEOR}} = \frac{R}{100\%}$$

Donde:

$\bar{C}_x$: Concentración media experimental, C_{TEOR} : Concentración teórica o valor esperado, R : valor de recobro obtenido.

El criterio de aceptación establecido es: $R = 97-103 \%$ (Apers S., 2006).

2.6 Condiciones operacionales del cromatógrafo de gases con detector de espectrometría de masas (GC-MS).

Temperatura de la columna —→ 100 °C/2min, 50 °C/1min, hasta 260 °C

Temperatura del inyector —→ 250 °C

Temperatura de la interface (detector) —→ 290 °C

Detector —→ Detector específico de masa (MSD)

Tipo de ionización —→ Impacto electrónico

Voltaje aplicado —→ 70 eV

Fase móvil —→ He_(g)

Tipo de columna —→ DB-5ms

Flujo de la fase móvil —→ 1.5 mL/min

Tiempo de corrida —→ 5.2 min

Estándar interno —→ Benzoato de etilo

2.7 Procedimiento general para la determinación de UC-244 por (GC-MS).

Preparación del estándar interno.

Se pipetearon 0.25 mL de benzoato de etilo (p.a, $d_4^{20}=1.046$) y se enrasaron en un frasco volumétrico con 100 mL de etanol, con lo que se obtuvo una concentración de 0.013 mol/L.

De esa disolución se toman 10 mL y se enrasan en un frasco volumétrico de 100 mL con etanol, quedando la misma con una concentración de 0.0013 mol/L. (Disolución A)

Preparación de la muestra de referencia de UC-244.

Se pesó 10.092 mg de UC-244 en una pequeña lámina de aluminio y se disolvieron en un volumen de 10 mL de la disolución A, con lo que se obtuvo una concentración de 1009.2 mg/L y se registró el cromatograma correspondiente con las condiciones obtenidas para el mismo.

2.8 Evaluación de los parámetros de validación de la técnica por (GC-MS) para la determinación de UC-244.

2.8.1 Linealidad.

El estudio de linealidad de esta técnica se llevó a cabo en el intervalo de concentraciones de 100.65 a 403.30 mg/L de UC-244, donde se construyeron dos curvas de calibración. *Procedimiento:* En una serie de frascos volumétricos de 10 mL se le añadieron alícuotas de 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, y 4.0 mL de la disolución de trabajo de 1008.24 mg/L para la primera curva y 1006.48 mg/L para la segunda curva, donde se obtuvieron concentraciones de UC-244 de 100.82, 151.24, 201.65, 252.06, 302.47, 352.88 y 403.30 mg/L para la primera curva y 100.65, 150.97, 201.30, 251.62, 301.94, 352.27 y 402.59 mg/L para la segunda curva. Luego se completaron hasta el enrase con la disolución A y seguidamente se inyectaron las muestras en el equipo, registrándose los cromatogramas correspondientes a cada una.

Al realizar la integración de los picos resultantes se obtiene como señal analítica el área bajo la curva, cuyo valor se corrige mediante la siguiente expresión:

$$A_{\text{patrón}} / A_{\text{std.interno}} = A_{\text{corregida}}$$

Representando gráficamente las áreas corregidas en función de las concentraciones de cada disolución, se obtiene la curva de calibración.

Con los valores de las áreas de los cromatogramas obtenidos se determinan los parámetros de la ecuación de la recta de mejor ajuste $y=mx+b$ así como los parámetros descritos en el epígrafe 2.5.1 pertenecientes al estudio de linealidad.

2.8.2 Precisión.

Para el estudio de la precisión se llevó a cabo un análisis de la repetibilidad y la reproducibilidad intermedia.

Repetibilidad.

Para este estudio de repetibilidad se realizaron 7 determinaciones de un punto intermedio de la curva de calibración (251.62 mg/L) en un mismo día, bajo las mismas condiciones y por el mismo analista.

Reproducibilidad intermedia.

Para este estudio de reproducibilidad intermedia se realizaron 12 determinaciones de un punto intermedio de la curva de calibración (251.62 mg/L) en diferentes días, diferentes condiciones y un mismo analista.

Los criterios de aceptación correspondientes al estudio de la precisión y los parámetros que fueron calculados en ambos casos se encuentran referidos en el epígrafe 2.5.2.

2.8.3 Exactitud.

Para la determinación de la exactitud del método se realizaron 7 determinaciones de una disolución de referencia de (251.62mg/L) comprendida en el rango de concentraciones de la curva de calibración. Se comparó el valor medio encontrado con el esperado en cada caso, a través del cálculo del recobro y una prueba de hipótesis t de Student para comprobar si la concentración media obtenida difiere significativamente de la teórica, los criterios de aceptación se encuentran referidos en el epígrafe 2.5.3.

2.8.4 Límite de detección (LD) y Límite de cuantificación (LC) (Morales S., 2006).

La concentración mínima evaluada fue seleccionada como el nivel inferior de concentración estudiado que no cumple con el parámetro de aceptación para la exactitud.

El límite de detección estimado se calculó utilizando los parámetros de la recta de regresión lineal a través de la siguiente fórmula: $3 \cdot |b| / m$.

El límite de cuantificación experimental fue determinado evaluando la precisión y exactitud de distintos puntos de concentración inferior a la más baja de la curva de calibración: 80.52, 60.39, 40.26, 20.13, 15.10, 10.07 mg/L. En cada nivel de concentración se realizaron 5 réplicas y se determinó el coeficiente de variación y el recobro de las mismas. Con estos datos se seleccionó como límite de cuantificación el nivel de concentración que cumple con los criterios de aceptación de ambos parámetros.

2.8.5 Especificidad.

Se aplicó un diseño de experimento factorial total 2^3 , cuyos factores y niveles se muestran en la Tabla 2.5.

La función respuesta seleccionada fue la concentración de UC-244 en la corrida experimental correspondiente.

Tabla 2.5 Factores y niveles del diseño.

Variables	V(Nitroetano), mL	V(Furfural), mL	V(IBA), mL
C(UC-244), mg / L	250		
Factores	X_1	X_2	X_3
N.I	0.025	0.025	0.0025
N.S	0.125	0.125	0.025

Para preparar las disoluciones correspondientes para cada corrida experimental se fijó la concentración de UC-244 en 250 mg/L, el 1% de nitroetano y furfural y el 0.1% de IBA para el nivel inferior y para el nivel superior el 5 % de nitroetano y furfural y el 1% de IBA. Para preparar concentraciones del 0.1, 1 y 5 % con respecto a 250 mg/L de UC-244, se midieron los volúmenes señalados en la tabla anterior a partir de las disoluciones patrones de furfural 1000 mg/L, nitroetano 1000 mg/L, e IBA 1000 mg/L respectivamente descritas en el epígrafe 2.1.1, se añadieron en frascos volumétricos de 10 mL y se enrasaron con la disolución A. Cada corrida experimental se ajusta a la matriz representada en la Tabla 2.6.

Tabla 2.6 Matriz del diseño factorial total 2^3 .

Experimentos	X_1	X_2	X_3
1	-	-	-
2	+	-	+
3	-	+	+
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	-
7	-	+	-
8	+	+	+

2.9 Condiciones operacionales del cromatógrafo de gases con detector de ionización de llama (GC-FID).

Temperatura del horno $\longrightarrow$ 160 °C

Temperatura del inyector $\longrightarrow$ 230 °C

Temperatura del detector $\longrightarrow$ 280 °C

Detector $\longrightarrow$ Ionización de llamas (FID)

Fase móvil $\longrightarrow$ N_2 (g)

Flujo de la fase móvil $\longrightarrow$ 5 mL/min

Tiempo de corrida $\longrightarrow$ 8 min

Tipo de columna $\longrightarrow$ Capilar VB-5

Estándar interno $\longrightarrow$ Benzoato de etilo

2.10 Procedimiento general para la determinación de UC-244 por (GC-FID).

Preparación del estándar interno.

Para la preparación del mismo se pipetearon 0.25 mL de benzoato de etilo (p.a, $d_4^{20}=1.046$) y se enrasaron en un frasco volumétrico con 100 mL de etanol, con lo que se obtuvo una concentración de 0.013 mol/L.

De esa disolución se toman 10 mL y se enrasan en un frasco volumétrico de 100 mL con etanol, quedando la misma con una concentración de 0.0013 mol/L. (Disolución A)

Preparación de la muestra de referencia de UC-244.

Se pesó 10.001 mg de UC-244 en una pequeña lámina de aluminio y se disolvieron en un volumen de 10 mL de la disolución A, con lo que se obtuvo una concentración de 1000.1 mg/L y se registró el cromatograma correspondiente con las condiciones obtenidas para el mismo.

2.11 Evaluación de los parámetros de validación de la técnica por (GC-FID) para la determinación de UC-244.

2.11.1 Linealidad.

El estudio de linealidad de esta técnica se realizó en el intervalo de concentraciones de 100.29 a 403.25 mg/L de UC-244, donde se construyeron dos curvas de calibración. *Procedimiento:* En una serie de frascos volumétricos de 10 mL se le añadieron alícuotas de 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, y 4.0 mL de la disolución de trabajo de 1002.92 mg/L para la primera curva y 1008.12 mg/L para la segunda curva, donde se obtuvieron concentraciones de UC-244 de 100.29, 150.44, 200.59, 250.73, 300.88, 351.02 y 401.17 mg/L para la primera curva y 100.81, 151.22, 201.62, 252.03, 302.44, 352.84 y 403.25 mg/L para la segunda curva. Luego se completaron hasta el enrase con la disolución A y seguidamente se inyectaron las muestras en el equipo, registrándose los cromatogramas correspondientes a cada muestra.

Al realizar la integración de los picos resultantes se obtiene como señal analítica el área bajo la curva cuya corrección se hace mediante la siguiente expresión:

$$A_{\text{patrón}} / A_{\text{std.interno}} = A_{\text{corregida}}$$

Representando gráficamente las áreas corregidas en función de las concentraciones de cada disolución, se obtiene la curva de calibración.

Con los valores de las áreas de los cromatogramas obtenidos se determinan los parámetros de la ecuación de la recta de mejor ajuste $y=mx+b$, así como los parámetros descritos en el epígrafe 2.5.1 pertenecientes al estudio de linealidad.

2.11.2 Precisión.

Para el estudio de la precisión se llevó a cabo un análisis de la repetibilidad y la reproducibilidad intermedia.

Repetibilidad.

Para este estudio de repetibilidad se realizaron 6 determinaciones de un punto intermedio de la curva de calibración (251.75 mg/L) en un mismo día, bajo las mismas condiciones y por el mismo analista.

Reproducibilidad intermedia.

Para este estudio de reproducibilidad intermedia se realizaron 10 determinaciones de un punto intermedio de la curva de calibración (251.75 mg/L) en diferentes días, diferentes condiciones y un mismo analista.

Los criterios de aceptación correspondientes al estudio de la precisión y los parámetros que fueron calculados en ambos casos se encuentran referidos en el epígrafe 2.5.2.

2.11.3 Exactitud.

Para la determinación de la exactitud del método se realizaron 6 determinaciones de una disolución de referencia de (251.75mg/L) comprendida en el rango de concentraciones de la curva de calibración. Se comparó el valor medio encontrado con el esperado en cada caso, a través del cálculo del recobro y una prueba de hipótesis t de Student para comprobar si la concentración media obtenida difiere significativamente de la teórica, los criterios de aceptación se encuentran referidos en el epígrafe 2.5.3.

2.11.4 Límite de detección (LD) y Límite de cuantificación (LC).

La concentración mínima evaluada fue seleccionada como el nivel inferior de concentración estudiado que no cumple con el parámetro de aceptación para la exactitud.

El límite de detección teórico se calculó utilizando los parámetros de la recta de regresión lineal a través de la siguiente fórmula: $3 \cdot |b| / m$.

El límite de cuantificación fue determinado evaluando la precisión y exactitud de distintos puntos de concentración incluyendo a la más baja de la curva de calibración: 100.29, 80.56, 60.42, 40.28, 20.14, 10.07 mg/L. En cada nivel de concentración se realizaron 4 réplicas y se determinó el coeficiente de variación y el recobro de las mismas. Con estos datos se seleccionó como límite de cuantificación el nivel de concentración que cumple con los criterios de aceptación de ambos parámetros.

2.11.5 Especificidad.

Se aplicó un diseño de experimento factorial total 2^3 , cuyos factores y niveles se muestran en la Tabla 2.7.

La función respuesta seleccionada fue la concentración de UC-244 en cada corrida experimental.

Tabla 2.7 Factores y niveles del diseño.

Variables	V(Nitroetano), mL	V(Furfural), mL	V(IBA), mL
C(UC-244), mg / L	250		
Factores	X₁	X₂	X₃
N.I	0.025	0.025	0.0025
N.S	0.125	0.125	0.025

Para preparar las disoluciones correspondientes para cada corrida experimental se fijó la concentración de UC-244 en 250 mg/L, el 1% de nitroetano y furfural y el 0.1% de IBA para el nivel inferior y para el nivel superior el 5 % de nitroetano y furfural y el 1% de IBA.

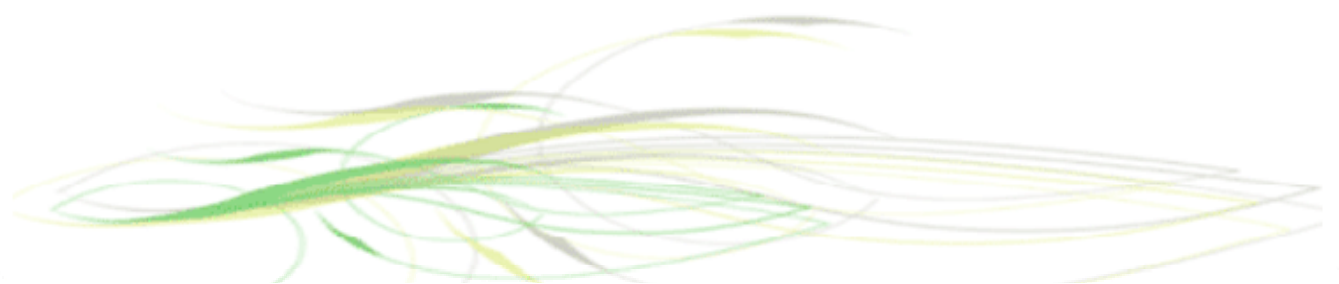
Para preparar concentraciones del 0.1, 1 y 5 % con respecto a 250 mg/L de UC-244, se midieron los volúmenes señalados en la tabla anterior a partir de las disoluciones patrones de furfural 1000 mg/L, nitroetano 1000 mg/L, e IBA 1000 mg/L respectivamente descritas en el epígrafe 2.1.1, se añadieron en frascos volumétricos de 10 mL y se enrasaron con una solución de benzoato de etilo. Cada corrida experimental se ajusta a la matriz representada en la Tabla 2.8.

Tabla 2.8 Matriz del diseño factorial total 2³.

Experimentos	X₁	X₂	X₃
1	-	-	-
2	+	-	+
3	-	+	+
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	-
7	-	+	-
8	+	+	+

2.12 Comparación de los resultados obtenidos por GC-FID y GC-MS.

Se realizó un análisis de varianza de los resultados obtenidos por ambos métodos cromatográficos en columna, a fin de determinar si existen diferencias significativas entre los mismos. Se aplica el estadígrafo t de student mediante el programa estadístico Statgraphics ver.4.1, para determinar si existen diferencias entre las medias de ambos grupos de resultados y se determina el estadígrafo F de Fisher para determinar la precisión de ambos métodos.



Análisis y discusión de los resultados

Capítulo III

Análisis y discusión de los resultados

3.1 Muestra de referencia de UC-244.

En la Figura 3.1 aparece el registro por GC con detector de espectrometría de masas del UC-244 que es empleado como muestra de referencia.

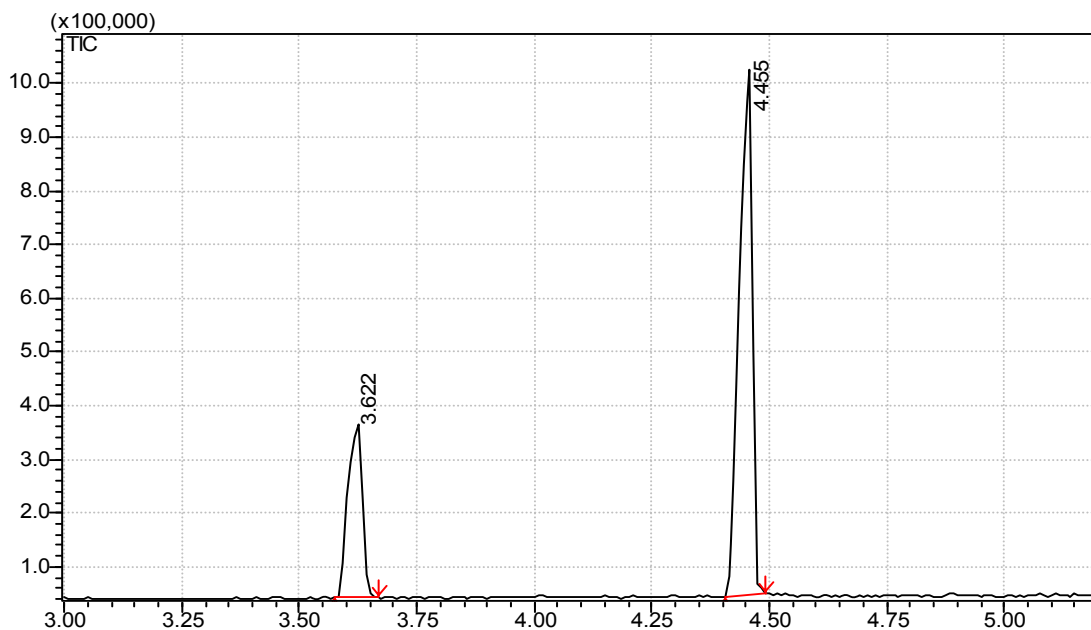


Figura 3.1 Cromatograma de gases del UC-244 puro.

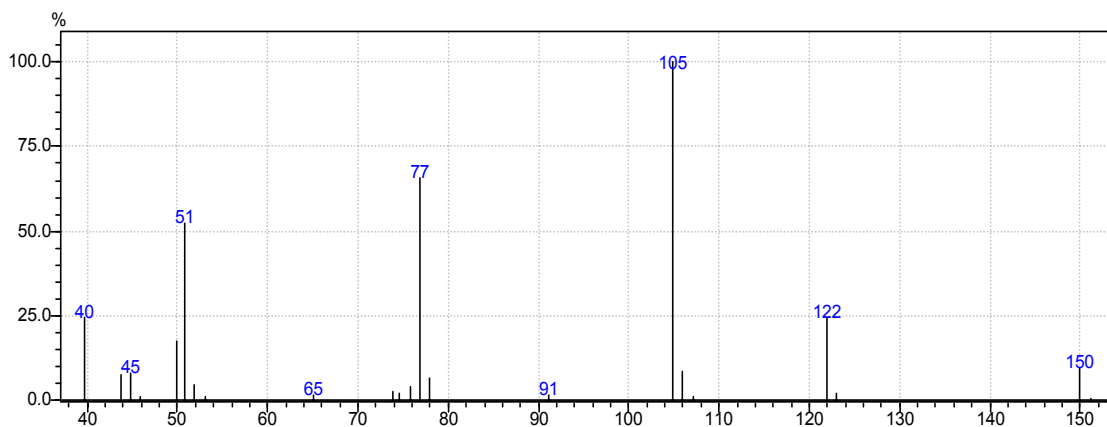


Figura 3.2 Espectro de masas correspondiente al Benzoato de etilo (tr. 3.622 min).

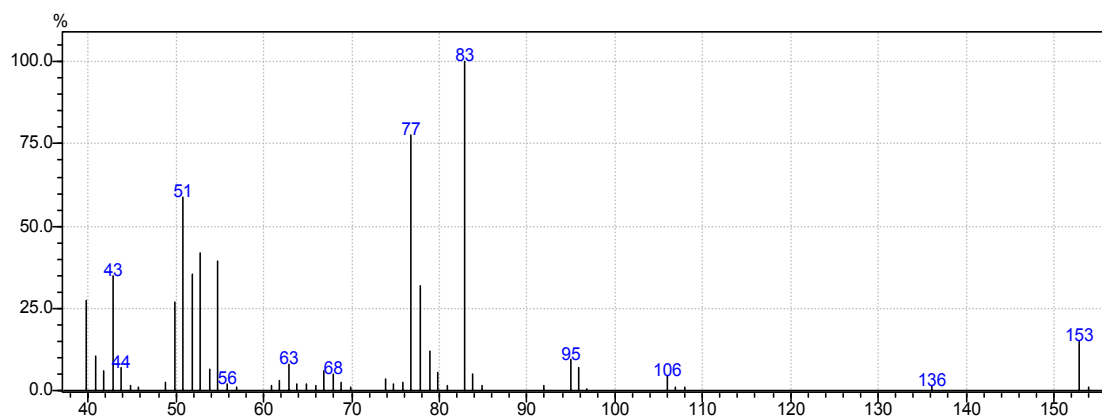


Figura 3.3 Espectro de masas correspondiente al UC-244 (tr. 4.455 min).

Como se observa en la Figura 3.1 solamente existen dos picos uno en un tiempo de retención de 3.622min correspondiente al estándar interno y otro en 4.455 min correspondiente al UC-244, lo que nos indica que el producto con el que estamos trabajando se encuentra puro. Como se puede apreciar en la Figura 3.2 y 3.3 aparecen los espectros de masa del estándar interno y del UC-244 respectivamente, con sus fragmentaciones. En el Anexo 1 se muestra el cromatograma de gases con detector FID, en el cual se aprecian dos señales correspondientes al estándar interno y al UC-244.

3.2 Parámetros de Calidad del UC-244.

3.2.1 Descripción.

El UC-244 en estado cristalino es un sólido de olor penetrante y de color amarillo.

3.2.2 Pérdidas por desecación.

En la Tabla 3.1 aparecen los valores de los % de pérdidas por desecación determinados al UC-244 puro.

Tabla 3.1 Valores del porcentaje de pérdidas por desecación.

Muestras	Pérdida de masa para 1 g de muestra	%Ps	Tratamiento estadístico
1	$5 \cdot 10^{-5}$	0.005	%Ps_m =0.005 S =0.0006
2	$5 \cdot 10^{-5}$	0.005	
3	$6 \cdot 10^{-5}$	0.006	

De los resultados anteriores se tiene que el promedio del por ciento en peso de pérdidas por desecación de las muestras es menor que el 0.50% el cual cumple el criterio de aceptación para este parámetro de calidad.

3.2.3 Residuos de ignición.

En la Tabla 3.2 aparecen los valores de los % de residuos de ignición presentes en el UC-244 puro.

Tabla 3.2 Valores del porcentaje de residuos de ignición.

Muestras	%R	Tratamiento estadístico
1	0.009	%R_m = 0.009 S = 0.0006
2	0.009	
3	0.008	

De los resultados anteriores se tiene que el promedio del porcentaje de residuos de ignición es menor que el 0.1% el cual cumple el criterio de aceptación para este parámetro de calidad.

3.2.4 Metales pesados.

En las Tablas 3.3, 3.4, 3.5, 3.6 y 3.7 se presentan los valores del contenido de metales pesados determinados al UC-244 puro.

Tabla 3.3 Resultados de la determinación de plomo.

<u>Plomo</u>		
Muestras	%Pb	Tratamiento estadístico
1	0.0003	%Pb_m = 0.0003 S = 0.00006
2	0.0003	
3	0.0004	

Tabla 3.4 Resultados de la determinación de cobalto.

<u>Cobalto</u>		
Muestras	%Co	Tratamiento estadístico
1	0.0000	%Co_m =0.0001 S = 0.0001
2	0.0002	
3	0.0001	

Tabla 3.5 Resultados de la determinación de manganeso.

<u>Manganeso</u>		
Muestras	%Mn	Tratamiento estadístico
1	0.0002	%Mn_m = 0.0001 S = 0.00006
2	0.0001	
3	0.0001	

Tabla 3.6 Resultados de la determinación de hierro.

<u>Hierro</u>		
Muestras	%Fe	Tratamiento estadístico
1	0.002	%Fe_m = 0.002 S = 0
2	0.002	
3	0.002	

Tabla 3.7 Resultados de la determinación de estaño.

<u>Estaño</u>		
Muestras	%Sn	Tratamiento estadístico
1	0.000	%Sn_m = 0 S = 0
2	0.000	
3	0.000	

De las Tablas 3.3 a la 3.7 se tiene como resultados que las medias de los porcentajes de cada uno de los metales pesados son menores o iguales que 0.002%, por lo que cumplen el criterio de aceptación para este parámetro de calidad.

3.2.5 Punto de fusión.

El UC-244 purificado tiene una temperatura promedio de fusión de 47°C (para n=5, CV=1.80%).

3.2.6 Absorción en el UV.

En la Tabla 3.8 aparecen los valores de las longitudes de ondas de máxima absorción del UC-244 en los diferentes solventes. Ver espectros en el Anexo 2.

Tabla 3.8 Valores de longitudes de onda máximas del UC-244 en diferentes solventes.

SOLVENTES	UC-244 λ (nm)
Éter de petróleo (40-60°C)	330
Éter dietílico	340
Tetracloruro de carbono	341
Metanol	349
Etanol	350

Como se aprecia a medida que aumenta la polaridad del solvente hay un desplazamiento batocrómico de la banda de absorción.

3.2.7 Absorción en el IR.

En la Figura 3.4 aparece el espectro IR realizado al UC-244 puro.

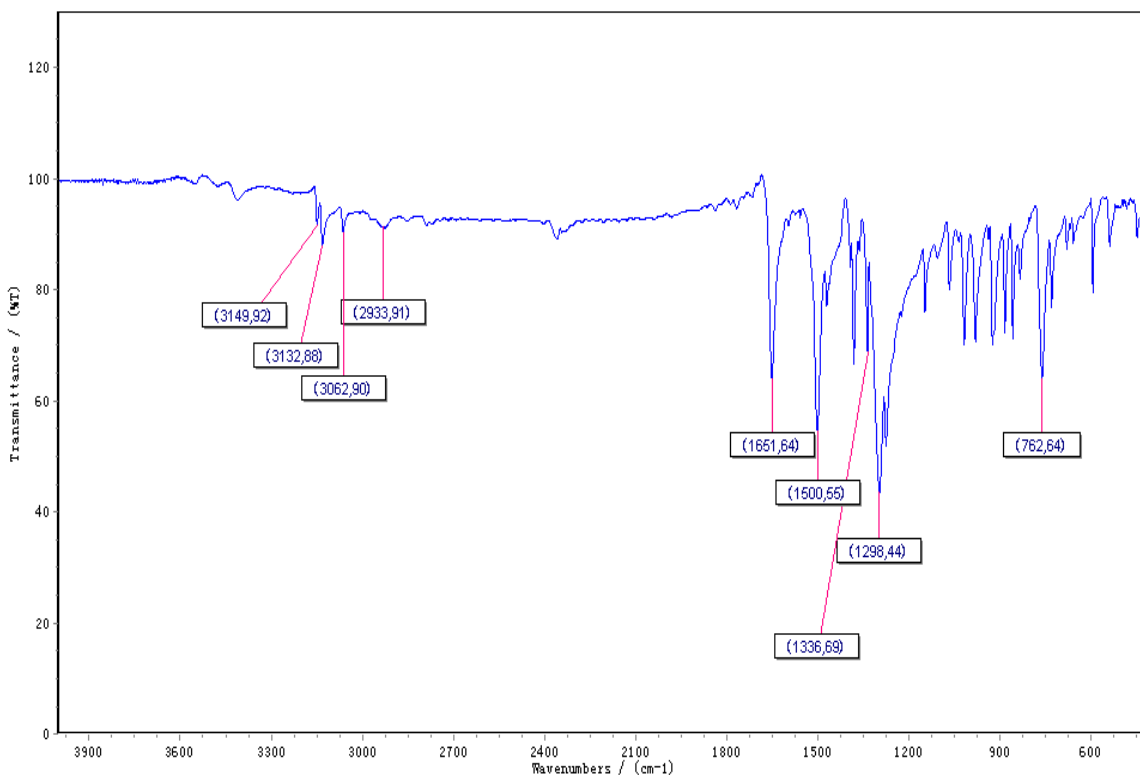
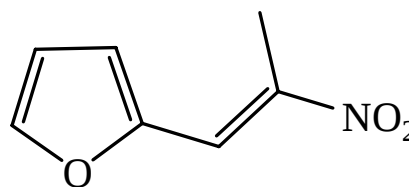


Figura 3.4 Espectro IR correspondiente al UC-244 puro.

La figura anterior correspondiente al espectro infrarrojo del UC-244 exhibe las bandas correspondientes a los grupos funcionales presentes en las moléculas lo cual permite su identificación. Estas bandas son:

ν C=C	1651 cm^{-1}
ν NO ₂	1500 y 1336 cm^{-1}
ν C-O-C	1298 cm^{-1}
ν C=C	762 cm^{-1}
ν C-H(sp ³)	2933 cm^{-1}
ν C-H(sp ²)	>3000 cm^{-1}



3.3 Validación de la técnica por CCD-Espectrofotometría UV-VIS para la determinación de UC-244.

3.3.1 Linealidad.

Los resultados del estudio de linealidad de la técnica antes mencionada se muestran en la Tabla 3.9 .Su representación gráfica se muestra en la Figura 3.5.

Tabla 3.9 Resultados del estudio de linealidad

Conc. (mg/L)	Absorbancia	F(Y-b)/X
8.001	0.807	9.956
8.050	0.815	9.918
8.055	0.859	9.416
10.063	1.077	9.374
10.069	1.077	9.380
10.001	1.023	9.809
14.001	1.416	9.911
14.024	1.471	9.556
14.088	1.513	9.333
16.101	1.721	9.375
16.110	1.742	9.267
16.017	1.604	10.006
16.001	1.610	9.959
16.027	1.622	9.902
18.113	1.870	9.704
18.124	1.953	9.297
18.031	1.915	9.433
20.034	2.192	9.155
20.022	2.051	9.778
20.126	2.153	9.363
Tratamiento Estadístico	n	20
	X_{mF(Y/X)}	9.595
	S	0.284
	CV_f (%)	2.96

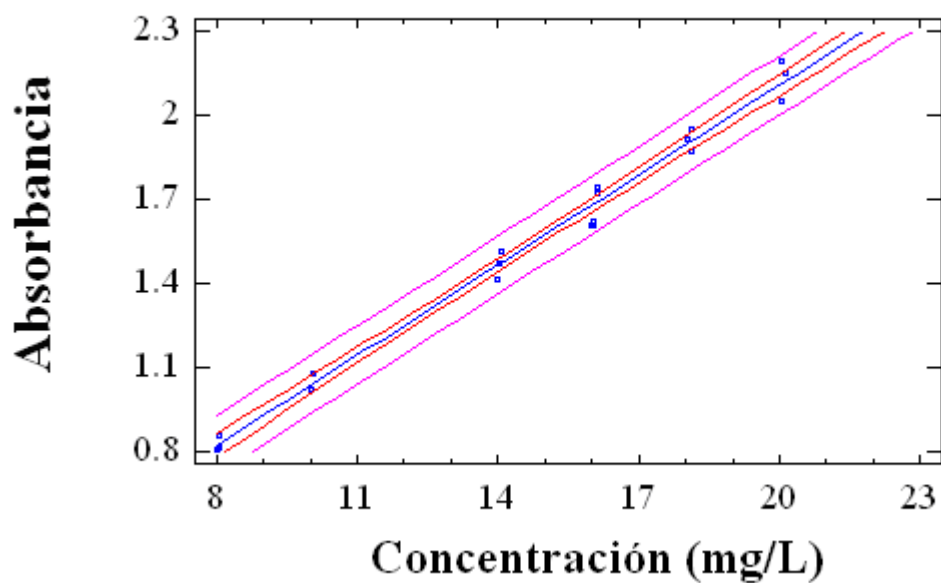


Figura 3.5 Curva de calibración del UC-244 por CCD-UV

La ecuación de regresión obtenida es la siguiente:

$$\text{Absorbancia} = -0.03326 + 0.10705 \cdot \text{Concentración}$$

Los datos anteriores se procesaron mediante un análisis de regresión simple, empleando el programa profesional Statgraphics versión 4.1, Anexo 3.

En la Tabla 3.10 se presentan los parámetros de la recta de regresión lineal junto con el análisis de linealidad y proporcionalidad.

Tabla 3.10 Parámetros de la recta de regresión del estudio de linealidad.

Parámetros	Valores Experimentales	Criterio
Número total de datos, n	20	-
Intervalo de linealidad, mg/L	8.001 – 20.126	-
Coeficiente de correlación, r	0.9947	$r \geq 0.99$
Pendiente, m	0.10705	-
Desviación estándar relativa de la pendiente, S_m	0.00261	-
Coeficiente de variación de la pendiente, % CV _m	2.44	%CV ≤ 2 %
Intercepto, b	-0.03326	-
Intervalo de confianza del intercepto, $b \pm \frac{Sb \cdot t}{\sqrt{n}}$ (n-2;p=0.05)	-0.03326 $\pm$ 0.01853	Contenga al cero (0;0)
Coef. de variación de la Función Respuesta, %CV _{f(Y-b/X)}	2.96	%CV ≤ 5 %
Test de pendiente, m (t _{tab} (18; p = 0.05))	t _{exp} =41.015 t _{tab} =2.101	t _{exp} $\geq$ t _{tab}

Como el coeficiente de variación de la función respuesta resultó ser del 2.96%, siendo este valor menor que el 5%, criterio de aceptación para este parámetro y se cumple con el Test de linealidad de la pendiente aunque el coeficiente de variación de la pendiente da un valor ligeramente mayor que 2 debido a un error sistemático que presenta la técnica producto de una serie de operaciones que se realizan en el desarrollo de la misma y el Test de proporcionalidad del intercepto, donde los límites de confianza de este último no incluyen al cero y por tanto el CV% de los factores respuesta fue recalculado. Por lo que se puede considerar que la dependencia de la absorbancia respecto a la concentración de UC-244 es lineal en el intervalo de concentración escogido.

3.3.2 Precisión. Repetibilidad y Reproducibilidad intermedia.

Los resultados de la evaluación de la precisión de esta técnica se presentan en las Tablas 3.11 y 3.12.

En la Tabla 3.11 se presentan los valores obtenidos para la repetibilidad evaluados por un mismo analista en un mismo día.

Tabla 3.11 Resultados del análisis de repetibilidad

Concentración teórica de UC-244 (14.007 mg/L)				Tratamiento Estadístico
Días	Réplicas	Absorbancia	Conc (mg/L)	n = 6 Xm = 14.219 mg/L S = 0.159 CV (%) = 1.12
1	1	1.490	14.229	
	2	1.502	14.342	
	3	1.476	14.099	
	4	1.496	14.286	
	5	1.462	13.968	
	6	1.507	14.388	

Con los valores obtenidos en la tabla anterior se comprueba que el coeficiente de variación de la repetibilidad contiene un valor de 1.12%, siendo este menor que el 3%, criterio de aceptación para este parámetro.

En la Tabla 3.12 se muestran los valores obtenidos para la reproducibilidad intermedia evaluados por diferentes analistas en diferentes días.

Tabla 3.12 Resultados del análisis de reproducibilidad intermedia.

Concentración teórica de UC-244 (14.002 y 14.001 mg/L)				Tratamiento Estadístico
Analista	Réplicas	Absorbancia	Conc (mg/L)	n= 8 $X_m = 13.747 \text{ mg/L}$ $S = 0.455$ $CV_{\text{exp}}(\%) = 3.31$ $CV_{\text{teor}}(\%) = 10.78$ $F_{\text{cal}} = 0.33$ $F(0.05, 3, 3) = 9.28$ $t_{\text{cal}} = 1.32$ $t(0.05, 6) = 2.45$
1	1	1.374	13.146	
	2	1.420	13.576	
	3	1.420	13.576	
	4	1.453	13.884	
2	5	1.378	13.183	
	6	1.471	14.052	
	7	1.483	14.164	
	8	1.508	14.398	

Con los valores obtenidos en la tabla anterior se comprueba que se cumple con el criterio de Horwitz siendo el $CV_{\text{teor}} > CV_{\text{exp}}$.

También se han comparado los resultados obtenidos por ambos analistas mediante un análisis de varianza mostrado en el Anexo 4. Siendo la $F_{\text{calc}} < F_{\text{tab}}$, se obtiene un valor de probabilidad de 0.2347 mayor que el fijado en 0.05, lo cual refleja que para un nivel de confianza de un 95 % no existen diferencias significativas entre las varianzas de ambos grupos. El test de t aplicado a las diferencias de las medias de ambos grupos confirma que no existen diferencias significativas al ser $t_{\text{cal}} < t_{\text{tab}}$ comprobándose la buena precisión del mismo.

Teniendo en cuenta el cumplimiento de los criterios evaluados para la repetibilidad y la reproducibilidad intermedia, la técnica analítica por CCD-Espectrofotometría UV-VIS para la determinación de UC-244 es precisa en las condiciones estudiadas.

3.3.3 Exactitud.

Los resultados de la evaluación de la exactitud de esta técnica a través del análisis repetitivo de una disolución de referencia, aparecen en la Tabla 3.13.

Tabla 3.13 Resultados del estudio de la exactitud a través del análisis repetitivo de una disolución referencia de concentración conocida.

Concentración teórica de UC-244 (14.007 mg/L)		
Réplicas	Conc (mg/L)	Recobrado (%)
1	14.229	101.58
2	14.099	100.66
3	14.286	101.99
4	13.968	99.72
5	14.388	102.72
Parámetros		
Concentración media (X_m)	14.194	
Valor medio del % recobrado (R_m)	101.33	
CV recobrado (%)	1.15	
t_{exp}	2.554	
$t(0.05, 4)$	2.776	

El recobrado obtenido se encuentra dentro del rango 97-103 % reportado como criterio de aceptación para este parámetro. El valor de la t_{exp} resultó ser menor que el reportado en tablas t_{tab} para un 95 % de confiabilidad, criterio que avala la exactitud del método, por lo que se demuestra que no existen diferencias significativas entre el valor medio experimental y el esperado.

Los resultados antes expuestos permiten afirmar que la técnica analítica por CCD-Espectrofotometría UV-VIS para la determinación de UC-244 es exacta en las condiciones estudiadas.

3.4 Validación de la técnica por (GC-MS) para la determinación de UC-244.

3.4.1 Linealidad.

Los resultados del estudio de linealidad de la técnica antes mencionada se muestran en la Tabla 3.14 .Su representación gráfica se muestra en la Figura 3.6.

Tabla 3.14 Resultados del estudio de linealidad

Conc. (mg/L)	Área corregida	F(Y-b)/X
100.65	0.262	0.003
150.97	0.434	0.003
151.24	0.443	0.003
201.65	0.629	0.004
201.65	0.631	0.004
201.30	0.628	0.004
201.30	0.631	0.004
251.62	0.767	0.003
251.62	0.771	0.003
252.06	0.778	0.003
252.06	0.782	0.003
301.94	0.949	0.003
301.94	0.951	0.003
302.47	0.973	0.003
302.47	0.944	0.003
352.27	1.117	0.003
352.27	1.154	0.003
352.88	1.106	0.003
352.88	1.153	0.003
402.59	1.325	0.003
403.30	1.302	0.003
Tratamiento Estadístico	n	21
	X_{mF(Y/X)}	0.003
	S	0.00005
	CV_f (%)	1.67

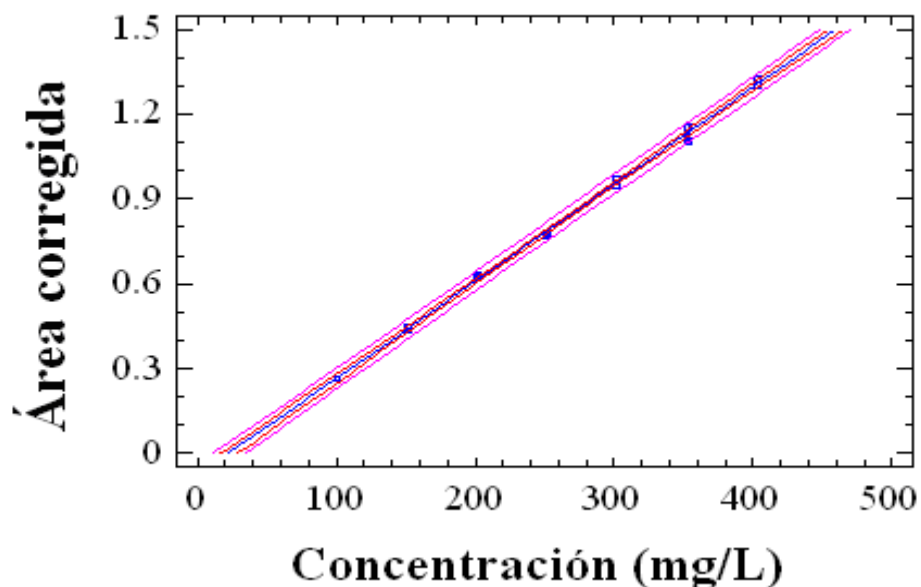


Figura 3.6 Curva de calibración del UC-244 por GC-MS

La ecuación de regresión obtenida es la siguiente:

$$\text{Área Corregida} = -0.07703 + 0.00343 * \text{Concentración}$$

Los datos anteriores se procesaron mediante un análisis de regresión simple, empleando el programa profesional Statgraphics versión 4.1, Anexo 5.

En la Tabla 3.15 se presentan los parámetros de la recta de regresión lineal junto con el análisis de linealidad y proporcionalidad.

Tabla 3.15 Parámetros de la recta de regresión del estudio de linealidad.

Parámetros	Valores Experimentales	Criterio
Número total de datos, n	21	-
Intervalo de linealidad, mg/L	100.65 – 403.30	-
Coeficiente de correlación, r	0.9986	$r \geq 0.99$
Pendiente, m	0.00343	-
Desviación estándar relativa de la pendiente, S_m	0.00004	-
Coeficiente de variación de la pendiente, % CV _m	1.17	%CV ≤ 2 %
Intercepto, b	-0.07703	-
Intervalo de confianza del intercepto, $b \pm \frac{Sb \cdot t}{\sqrt{n}}$ (n-2;p=0.05)	-0.07703 $\pm$ 0,0053	Contenga al cero (0;0)
Coef. de variación de la Función Respuesta, %CV _{f(Y-b/X)}	1.67	%CV ≤ 5 %
Test de pendiente, m (t _{tab} (19; p = 0.05))	t _{exp} =85.75 t _{tab} =2.093	t _{exp} $\geq$ t _{tab}

Como el coeficiente de variación de la función respuesta resultó ser del 1.67%, siendo este valor menor que el 5%, criterio de aceptación para este parámetro, se cumple con el Test de linealidad de la pendiente y en el Test de proporcionalidad del intercepto los límites de confianza no incluyen al cero y por tanto el CV% de los factores respuesta fue recalculado.

Se puede afirmar que la dependencia del área corregida respecto a la concentración de UC-244 es lineal en el intervalo de concentración escogido.

3.4.2 Precisión. Repetibilidad y Reproducibilidad intermedia.

Los resultados de la evaluación de la precisión de esta técnica se presentan en las Tablas 3.16 y 3.17.

En la Tabla 3.16 se presentan los valores obtenidos para la repetibilidad evaluados por un mismo analista en un mismo día.

Tabla 3.16 Resultados del análisis de repetibilidad

Concentración teórica de UC-244 (251.62mg/L)				Tratamiento Estadístico
Días	Réplicas	Área corregida	Conc (mg/L)	n = 7 Xm =250.31 mg/L S = 4.339 CV (%) = 1.73
1	1	0.804	256.72	
	2	0.782	250.45	
	3	0.784	250.96	
	4	0.765	245.55	
	5	0.798	255.04	
	6	0.767	246.21	
	7	0.771	247.21	

Con los valores obtenidos en la tabla anterior se comprueba que el coeficiente de variación de la repetibilidad contiene un valor de 1.73%, siendo este menor que el 3%, criterio de aceptación para este parámetro.

En la Tabla 3.17 se muestran los valores obtenidos para la reproducibilidad intermedia evaluados por un mismo analista en diferentes días.

Tabla 3.17 Resultados del análisis de reproducibilidad intermedia.

Concentración teórica de UC-244 (251.62mg/L)		
Analista	Concentración (mg/L)	
	1^{er} día	2^{do} día
1	250.45	249.67
	250.96	253.15
	245.55	250.04
	255.04	249.96
	246.21	252.58
	247.21	249.40
Tratamiento Estadístico	n=12 Xm= 250.02 mg/L S= 2.789 CV _{exp} (%)= 1.12 CV _{teor} (%)= 6.96 F _{cal} =4.92 F(0.05, 5,5) = 5.95 t _{cal} = 0.97 t (0.05,10) = 2.23	

Con los valores obtenidos en la tabla anterior se comprueba que el $CV_{teor} > CV_{exp}$, siendo este el criterio de Horwitz para este parámetro.

También se han comparado los resultados obtenidos en ambos días por el mismo analista, mediante un análisis de varianza mostrado en el Anexo 6. Siendo la $F_{calc} < F_{tab}$, se obtiene un valor de probabilidad de 0.3557 mayor que el fijado en 0.05, lo cual refleja que para un nivel de confianza de un 95 % no existen diferencias significativas entre las varianzas de ambos grupos.

El test de t aplicado a las diferencias de las medias de ambos grupos confirma que no existen diferencias significativas al ser $t_{cal} < t_{tab}$ comprobándose la buena precisión del mismo.

Teniendo en cuenta el cumplimiento de los criterios evaluados para la repetibilidad y la reproducibilidad intermedia, la técnica analítica por GC-MS para la determinación de UC-244 es precisa en las condiciones que se llevó a cabo la misma.

3.4.3 Exactitud.

Los resultados de la evaluación de la exactitud de esta técnica a través del análisis repetitivo de una disolución de referencia, aparecen en la Tabla 3.18.

Tabla 3.18 Resultados del estudio de la exactitud a través del análisis repetitivo de una disolución referencia de concentración conocida.

Concentración teórica de UC-244 (251.62 mg/L)		
Réplicas	Conc (mg/L)	Recobrado (%)
1	256.72	102.03
2	250.45	99.53
3	250.96	99.74
4	245.55	97.59
5	255.04	101.36
6	246.21	97.85
7	247.21	98.25
Parámetros		
Concentración media (X_m)	250.31	
Valor medio del % recobrado (R_m)	99.48	
CV recobrado (%)	1.73	
t_{exp}	0.800	
$t(0.05, 6)$	2.447	

El recobrado obtenido se encuentra dentro del rango 97-103 % reportado como criterio de aceptación para este parámetro. El valor de la t_{exp} resultó ser menor que el reportado en tablas t_{tab} para un 95 % de confiabilidad, criterio que avala la exactitud del método, por lo que se demuestra que no existen diferencias significativas entre el valor medio experimental y el esperado.

Los resultados antes expuestos permiten afirmar que la técnica analítica por GC-MS para la determinación de UC-244 es exacta en las condiciones estudiadas.

3.4.4 Límite de detección y límite de cuantificación.

El límite de detección estimado para este método evaluado en el intervalo de concentración de 100.65 a 403.30 mg/L se presenta a continuación:

$$\text{Área Corregida} = -0.07703 + 0.00343 * \text{Concentración}$$

Pendiente de la recta, **m: 0.00343**

Intercepto, **b: -0.07703**

Límite de detección, **$3 * |b| / m$: $3 * |-0.07703| / 0.00343 = 67.37 \text{ mg/L}$**

En la Tabla 3.19 se reportan los resultados de la precisión y la exactitud para la evaluación del límite de cuantificación experimental.

Tabla 3.19 Resultados de la precisión y la exactitud para la determinación del límite de cuantificación.

Concentración teórica (mg/L)	80.52 (mg/L)	60.39 (mg/L)	40.26 (mg/L)	20.13 (mg/L)	15.10 (mg/L)	10.07 (mg/L)
Concentración Experimental (mg/L)	81.40	62.90	46.81	28.64	25.72	No señal
	82.19	63.84	46.15	30.56	26.41	No señal
	82.60	63.77	47.41	29.33	26.67	No señal
	82.41	63.96	46.83	30.84	27.19	No señal
	81.19	62.14	45.44	31.43	26.69	No señal
Réplicas (n)	5	5	5	5	5	5
Conc media	81.96	63.32	46.53	30.16	26.54	No señal
Recobrado (%)	101.79	104.85	115.57	149.83	175.76	No señal
CV (%)	0.76	1.24	1.62	3.78	2.02	No señal

Como se observa en la tabla anterior para dichos valores de concentraciones solo resulta cuantificable hasta 80.52 mg/L ya que por debajo de este valor se obtienen porcentajes de recobro que no están en el rango de 97-103%, lo que corrobora que por debajo del límite de cuantificación no hay confiabilidad en los resultados.

A continuación se presenta los valores de los límites de detección y cuantificación, así como la concentración mínima evaluada:

Límite de detección Estimado: 67.37 mg/L

Límite de detección Experimental: 15.10 mg/L

Límite de cuantificación Experimental: 80.52 mg/L

Concentración mínima evaluada: 10.07 mg/L

3.4.5 Especificidad.

En la Tabla 3.20 se presentan los resultados del diseño factorial total 2³, realizado para poder evaluar las posibles interferencias de las materias primas nitroetano, furfural e isobutilamina en la determinación del UC-244 por GC-MS.

Tabla 3.20 Resultados del diseño factorial total 2^3

Experimentos	X ₁ NE	X ₂ Fur	X ₃ IBA	Área corregida	C(UC-244) mg/L
1	-	-	-	0.775	248.40
				0.784	251.02
2	+	-	+	0.805	257.14
				0.793	253.65
3	-	+	+	0.758	243.44
				0.768	246.36
4	+	+	-	0.781	250.15
				0.796	254.52
5	-	-	+	0.786	251.60
				0.789	252.48
6	+	-	-	0.807	257.73
				0.809	258.31
7	-	+	-	0.816	260.35
				0.803	256.56
8	+	+	+	0.814	259.77
				0.826	263.27

Nota: X₁(nitroetano), X₂(furfural), X₃(isobutilamina)

El procesamiento estadístico del diseño 2^3 se presenta en el Anexo 7. Del análisis de varianza se observa que los valores de las probabilidades son superiores a 0.05 en todos los casos para un 95 % de confianza, lo que indica que ninguna de las interferencias estudiadas influye de manera significativa en la concentración de UC-244 hasta el nivel superior considerado para furfural y nitroetano (5%) y (1%) para isobutilamina (IBA). Los gráficos LSD confirman este comportamiento, Anexo 8.

La ecuación de regresión que representa el modelo obtenido es la siguiente:

$$\text{Conc} = 254.046 + 0.255095 \cdot \text{Furfural} - 0.583073 \cdot \text{IBA} + 2.7696 \cdot \text{Nitroetano}$$

3.5 Validación de la técnica por (GC-FID) para la determinación de UC-244.

3.5.1 Linealidad.

Los resultados del estudio de linealidad de la técnica antes mencionada se muestran en la Tabla 3.21. Su representación gráfica se muestra en la Figura 3.7.

Tabla 3.21 Resultados del estudio de linealidad

Conc. (mg/L)	Área corregida	F(Y-b)/X
100.29	0.251	0.002
100.29	0.253	0.002
100.81	0.239	0.002
150.44	0.384	0.002
151.22	0.367	0.002
151.22	0.372	0.002
200.58	0.497	0.002
200.58	0.502	0.002
201.62	0.504	0.002
201.62	0.502	0.002
250.73	0.625	0.002
250.73	0.628	0.002
252.03	0.617	0.002
252.03	0.618	0.002
300.88	0.741	0.002
302.44	0.743	0.002
302.44	0.763	0.002
351.02	0.828	0.002
351.02	0.838	0.002
352.84	0.872	0.002
352.84	0.870	0.002
401.17	0.951	0.002
401.17	0.974	0.002
401.17	0.981	0.002
403.25	0.992	0.002
403.25	0.984	0.002
Tratamiento Estadístico	n	26
	$X_{mF(Y/X)}$	0.002
	S	0.00005
	CV _f (%)	2.14

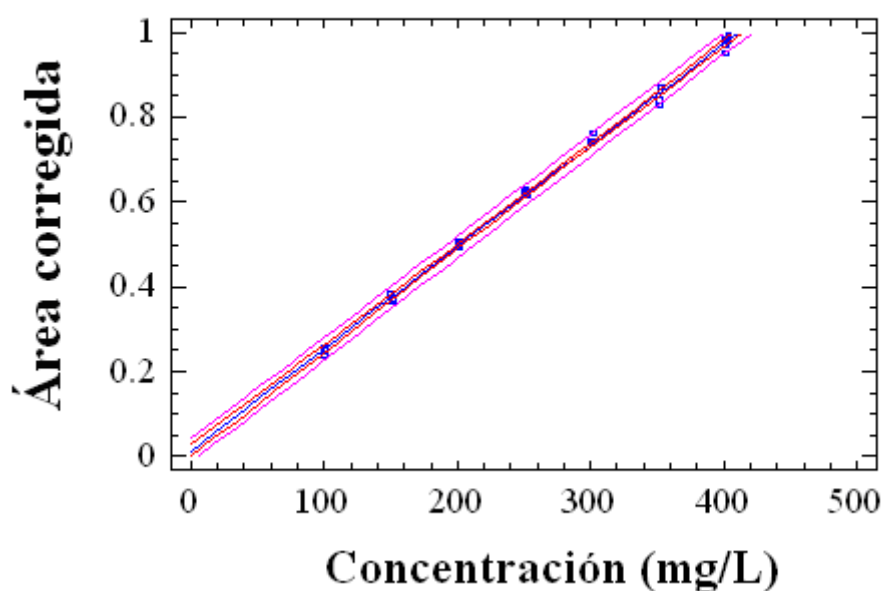


Figura 3.7 Curva de calibración del UC-244 por GC-FID.

La ecuación de regresión obtenida es la siguiente:

$$\text{Área corregida} = 0.01396 + 0.00240 \cdot \text{Concentración}$$

Los datos anteriores se procesaron mediante un análisis de regresión simple, empleando el programa profesional Statgraphics versión 4.1, Anexo 9.

En la Tabla 3.22 se presentan los parámetros de la recta de regresión lineal junto con el análisis de linealidad y proporcionalidad.

Tabla 3.22 Parámetros de la recta de regresión del estudio de linealidad.

Parámetros	Valores Experimentales	Criterio
Número total de datos, n	26	-
Intervalo de linealidad, mg/L	100.29 – 403.25	-
Coeficiente de correlación, r	0.9988	$r \geq 0.99$
Pendiente, m	0.00240	-
Desviación estándar relativa de la pendiente, S_m	0.00002	-
Coeficiente de variación de la pendiente, % CV _m	0.83	%CV ≤ 2 %
Intercepto, b	0.01396	-
Intervalo de confianza del intercepto, $b \pm \frac{Sb \cdot t}{\sqrt{n}}$ (n-2;p=0.05)	0.01396 $\pm$ 0.0027	Contenga al cero (0;0)
Coef. de variación de la Función Respuesta, %CV _{f(Y-b/X)}	2.14	%CV ≤ 5 %
Test de pendiente, m (t _{tab} (24 ; p = 0.05))	t _{exp} =120 t _{tab} =2.064	t _{exp} $\geq$ t _{tab}

Como el coeficiente de variación de la función respuesta resultó ser del 2.14%, siendo este valor menor que el 5%, criterio de aceptación para este parámetro y se cumple con el Test de linealidad de la pendiente y en el Test de proporcionalidad del intercepto los límites de confianza no incluyen al cero y por tanto el CV% de los factores respuesta fue recalculado.

Se puede afirmar que la dependencia del área corregida respecto a la concentración de UC-244 es lineal en el intervalo de concentración escogido.

3.5.2 Precisión. Repetibilidad y Reproducibilidad intermedia.

Los resultados de la evaluación de la precisión de esta técnica se presentan en las Tablas 3.23 y 3.24.

En la Tabla 3.23 se presentan los valores obtenidos para la repetibilidad evaluados por un mismo analista en un mismo día.

Tabla 3.23 Resultados del análisis de repetibilidad

Concentración teórica de UC-244 (251.75 mg/L)				Tratamiento Estadístico
Días	Réplicas	Área corregida	Conc (mg/L)	n = 6 Xm =251.93 mg/L S = 2.77 CV (%) = 1.10
1	1	0.631	257.06	
	2	0.619	252.07	
	3	0.617	251.23	
	4	0.618	251.65	
	5	0.616	250.82	
	6	0.611	248.73	

Con los valores obtenidos en la tabla anterior se comprueba que el coeficiente de variación de la repetibilidad contiene un valor de 1.10%, siendo este menor que el 3%, criterio de aceptación para este parámetro.

En la Tabla 3.24 se muestran los valores obtenidos para la reproducibilidad intermedia evaluados por un mismo analista en diferentes días.

Tabla 3.24 Resultados del análisis de reproducibilidad intermedia.

Concentración teórica de UC-244 (251.75mg/L)		
Analista	Concentración (mg/L)	
	1^{er} día	2^{do} día
1	252.13	246.14
	251.25	249.20
	251.64	252.84
	250.88	250.49
	248.73	251.48
Tratamiento Estadístico	n= 10 Xm = 250.48 mg/L S = 1.970 CV _{exp} (%) = 0.79 CV _{teor} (%)= 6.96 F _{cal} = 0.26 F(0.05, 4,4) = 6.30 t _{cal} = 0.70 t (0.05,8) = 2.31	

Con los valores obtenidos en la tabla anterior se comprueba que el $CV_{teor} > CV_{exp}$, siendo este el criterio de Horwitz para este parámetro.

También se han comparado los resultados obtenidos en ambos días por el mismo analista, mediante un análisis de varianza mostrado en el Anexo 10. Siendo la $F_{calc} < F_{tab}$, se obtiene un valor de probabilidad de 0.5047 mayor que el fijado en 0.05, lo cual refleja que para un nivel de confianza de un 95 % no existen diferencias significativas entre las varianzas de ambos grupos. El test de t aplicado a las diferencias de las medias de ambos grupos confirma que no existen diferencias significativas al ser $t_{cal} < t_{tab}$ comprobándose la buena precisión del mismo.

Teniendo en cuenta el cumplimiento de los criterios evaluados para la repetibilidad y la reproducibilidad, la técnica analítica por GC-FID para la determinación de UC-244 es precisa en las condiciones estudiadas.

3.5.3 Exactitud.

Los resultados de la evaluación de la exactitud de esta técnica a través del análisis repetitivo de una disolución de referencia, aparecen en la Tabla 3.25.

Tabla 3.25 Resultados del estudio de la exactitud a través del análisis repetitivo de una disolución referencia de concentración conocida.

Concentración teórica de UC-244 (251.75 mg/L)		
Réplicas	Conc (mg/L)	Recobrado (%)
1	257.06	102.11
2	252.07	100.13
3	251.23	99.79
4	251.65	99.96
5	250.82	99.63
6	248.73	98.80
Parámetros		
Concentración media (X_m)	251.93	
Valor medio del % recobrado (R_m)	100.07	
CV recobrado (%)	1.00	
t_{exp}	0.156	
$t(5, 0.05)$	2.571	

El recobrado obtenido se encuentra dentro del rango 97-103 % reportado como criterio de aceptación para este parámetro. El valor de la t_{exp} resultó ser menor que el reportado en tablas t_{tab} para un 95 % de confiabilidad, criterio que avala la exactitud del método, por lo que se demuestra que no existen diferencias significativas entre el valor medio experimental y el esperado.

Los resultados antes expuestos permiten afirmar que la técnica analítica por GC-FID para la determinación de UC-244 es exacta en las condiciones estudiadas.

3.5.4 Límite de detección y límite de cuantificación.

El límite de detección estimado para este método evaluado en el intervalo de concentración de 100.29 a 403.25 mg/L se presenta a continuación:

$$\text{Área corregida} = 0.01396 + 0.00240 * \text{Concentración}$$

Pendiente de la recta, **m: 0.00240**

Intercepto, **b: 0.01396**

Límite de detección, **$3 * |b| / m$: $3 * |0.01396| / 0.00240 = 17.45 \text{ mg/L}$**

En la Tabla 3.26 se reportan los resultados de la precisión y la exactitud para la evaluación del límite de cuantificación experimental.

Tabla 3.26 Resultados de la precisión y la exactitud para la determinación del límite de cuantificación.

Concentración teórica (mg/L)	100.29 (mg/L)	80.56 (mg/L)	60.42 (mg/L)	40.28 (mg/L)	20.14 (mg/L)	10.07 (mg/L)
Concentración Experimental (mg/L)	98.66	69.94	49.94	30.51	10.77	5.17
	99.61	68.71	50.11	29.35	9.36	5.70
	99.54	70.73	52.37	31.58	11.33	5.38
	99.15	69.64	52.53	28.96	13.13	6.57
Réplicas (n)	4	4	4	4	4	4
Conc media	99.24	69.76	51.24	30.10	11.15	5.71
Recobrado (%)	98.95	86.59	84.80	74.73	55.36	56.70
CV (%)	0.44	1.20	2.74	3.94	14.01	10.80

Como se observa en la tabla anterior para dichos valores de concentraciones solo resulta cuantificable hasta 100.29 mg/L ya que por debajo de este valor se obtienen porcentajes de recobro que no están en el rango de 97-103% lo que nos indica que por debajo del límite de cuantificación los resultados no son confiables.

A continuación se presenta los valores de los límites de detección y cuantificación, así como la concentración mínima evaluada:

Límite de detección Estimado: 17.45 mg/L

Límite de cuantificación Experimental: 100.29 mg/L

Concentración mínima evaluada: 10.07mg/L

3.5.5 Especificidad.

En la Tabla 3.27 se presentan los resultados del diseño factorial total 2^3 , realizado para poder evaluar las posibles interferencias de las materias primas nitroetano, furfural e isobutilamina en la determinación del UC-244 por GC-FID.

Tabla 3.27 Resultados del diseño factorial total 2^3

Experimentos	X₁ NE	X₂ Fur	X₃ IBA	Área corregida	C(UC-244) mg/L
1	-	-	-	0.605	246.28
				0.645	262.91
2	+	-	+	0.588	239.17
				0.597	242.90
3	-	+	+	0.617	251.24
				0.629	256.22
4	+	+	-	0.606	246.69
				0.607	247.26
5	-	-	+	0.599	243.81
				0.600	244.13
6	+	-	-	0.584	237.34
				0.644	262.52
7	-	+	-	0.605	246.26
				0.601	244.62
8	+	+	+	0.599	243.83
				0.630	256.63

Nota: X_1 (nitroetano), X_2 (furfural), X_3 (isobutilamina)

El procesamiento estadístico del diseño 2^3 se presenta en el Anexo 11. Del análisis de varianza se observa que los valores de las probabilidades son superiores a 0.05 en todos los casos para un 95 % de confianza, lo que indica que ninguna de las interferencias estudiadas influye de manera significativa en la concentración de UC-244 hasta el nivel superior considerado para furfural y nitroetano (al 5 %) y para isobutilamina (al 1%). Los gráficos LSD confirman este comportamiento, Anexo 12.

La ecuación de regresión que representa el modelo obtenido es la siguiente:

$$\text{Conc} = 248.238 - 1.19506 * \text{Furfural} - 0.121938 * \text{IBA} + 3.90931 * \text{Nitroetano}$$

3.6 Comparación de los resultados obtenidos por GC-FID y GC-MS.

Los resultados obtenidos en la comparación estadística de ambas técnicas se muestran en el Anexo 13. Como se observa, no existen diferencias significativas en los resultados obtenidos con la misma muestra de referencia ya que la probabilidad muestra un valor mayor que 0.05.

A continuación se presentan los resultados obtenidos en la comparación por el programa Statgraphics versión 4.1:

$$F_{\text{cal}} = 2.00$$

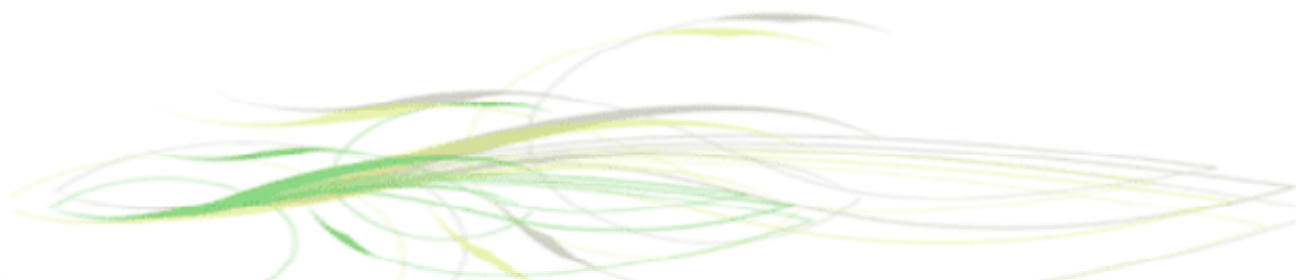
$$F(0.05, 11, 9) = 2.90$$

$$t_{\text{cal}} = 0.44$$

$$t(0.05, 20) = 2.09$$

$$P_{\text{calc}} = 0.6665 > 0.05$$

Ya que la $F_{\text{cal}} < F_{\text{tab}}$ no existen diferencias significativas entre las varianzas de ambos grupos. El test de t aplicado a las diferencias de las medias de ambos grupos confirma que no existen diferencias significativas en los valores medios de cada grupo al ser $t_{\text{cal}} < t_{\text{tab}}$, se demuestra que ambas técnicas son equivalentes y aplicables a la determinación de UC-244.



Conclusiones

Conclusiones

1. Los parámetros químicos-farmacéuticos determinados para el UC-244 se encuentran dentro de los criterios de aceptación referidos, como se muestran a continuación:

- Punto de fusión promedio (47° C)

-% Pérdidas por desecación=0.005 ≤ **0.50%**

-% Residuos de ignición = 0.009 ≤ **0.10%**

- Metales pesados ≤ **0.002%**

% Pb= 0.0003

% Co=0.0001

% Mn = 0.0001

% Fe = 0.002

% Sn= 0

2. Los ensayos de identificación por espectrometría UV-VIS e IR, así como, métodos cromatográficos demostraron que la pureza del producto final es satisfactoria.

3. La técnica de Espectrofotometría UV-VIS combinada con una separación previa de Cromatografía de capa delgada, empleando como fase móvil cloroformo, resultó ser lineal y exacta.

4. La técnica de Cromatografía de Gases con detector MS resultó ser lineal, exacta y específica. Su límite de cuantificación y detección son:

Límite de detección Estimado: 67.37 mg/L

Límite de detección Experimental: 15.10 mg/L

Límite de cuantificación Experimental: 80.52 mg/L

Concentración mínima evaluada: 10.07 mg/L

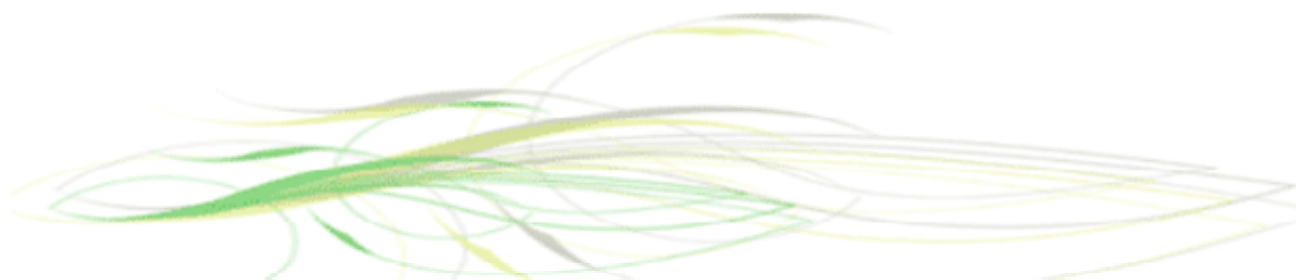
5. La técnica de Cromatografía de Gases con detector FID resultó ser lineal, exacta y específica. Su límite de cuantificación y detección son:

Límite de detección Estimado: 17,45 mg/L

Límite de cuantificación Experimental: 100,29 mg/L

Concentración mínima evaluada: 10.07mg/L

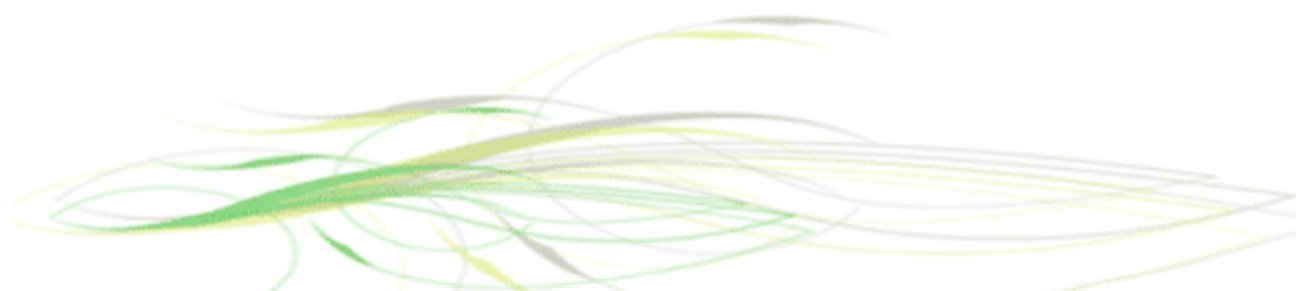
6. Los métodos de determinación de UC-244 mediante GC-MS y GC-FID no presentan diferencias significativas en sus resultados para un nivel de significación de 0.05, lo que permite emplear alternativamente ambas variantes.



Recomendaciones

Recomendaciones

1. En la preparación de muestras de UC-244 en disolución es necesario tener en cuenta que las mismas deben protegerse de la luz para evitar su degradación.
2. Aplicar las técnicas de cromatografía de gases con detectores FID o Espectrometría de masa para evaluar la pureza del UC-244 puro.
3. Desarrollar los estudios de estabilidad acelerada del Principio Activo empleando dichas técnicas.



Bibliografía

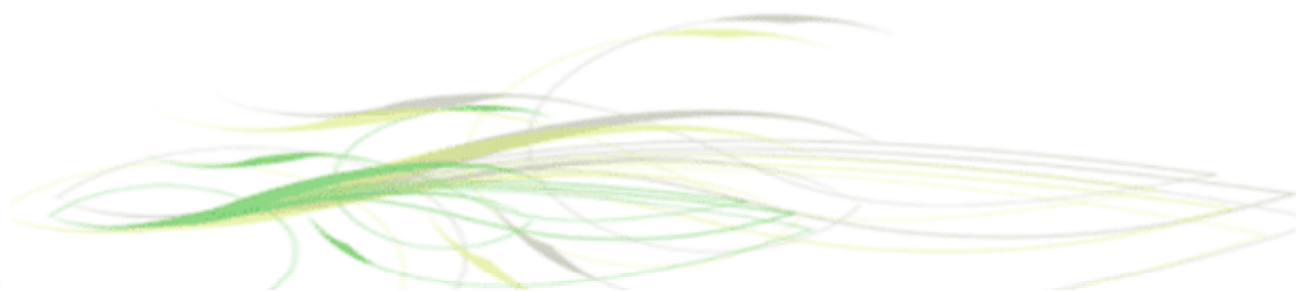
Bibliografía

- AOAC International, Method Validation Programs. Peer Verified Programs. Gaithersburg, Maryland: USA, 2002. En [http://aoac.org/vmeth/peerverimtd\[1\].htm](http://aoac.org/vmeth/peerverimtd[1].htm), visitada en junio 2006.
- Apers, S.; Theunis, M. (2006). Validation (ICH). Laboratory of Pharmacognosy. University of Antwerp. Belgium. Monografías de Curso impartido en la UCLV.
- Báez, R; Bernal, N. (1988) “Métodos de análisis para la realización de la norma analítica de los productos G-1 y UC-244”. Trabajo de Diploma. UCLV, Cuba.
- British Pharmacopea Commission Secretariat (2002), Ed. British Pharmacopea.
- Castiñeiras Díaz, M. (1986). Control de medicamentos I. Editorial Pueblo y Educación. Ciudad de la Habana. 300p.
- Castro, M. Gascón S. Pujol M. Sans J.M. y Vicente LI. (1989). “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.
- Crosby, N. (1997). Quality in the Analytical Chemistry Laboratory. Ed. John Wiley and Sons, EU.
- Catálogo General Panreac, 2001.
- Caveda, L.I., Padrón J.L. (1991). “Evaluación de la actividad antiinflamatoria del UC-244”. Informe Técnico. Centro de Química Farmacéutica. La Habana.
- Colectivo de autores (1984). Compendium de medicamentos. Editorial de Ciencias Médicas. 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 espectroscopía UV-VIS en la caracterización y cuantificación de los productos G-0 y UC-244". Trabajo de Diploma. UCLV. 1992- 1993. Cuba.
- Dierksmeier, G., (2005). Métodos cromatográficos. Editorial Científico-Técnica. La Habana, Cuba.
- Echevarría, W. (2007). "Obtención de un principio activo, con acciones frente a Ectoparásitos a escala de 6 moles". Trabajo de Diploma. UCLV. Curso 2006-2007. Cuba.
- Estrada, E. (1994). "Relación estructura mutagenicidad de 2-furiletilenos". Informe Técnico. Centro de Bioactivos Químicos. UCLV. Santa Clara.
- Farmacopea de los E.U.M (2003), octava edición, México.
- Freud, J.E.: "Estadística elemental moderna". 3a Edición. Editorial Pueblo y Educación, p466, (1983).
- Harris, D. (2001). "Análisis Químico Cuantitativo". Reverté S.A. 2^{da} Edición. Capítulos 22 y 24.
- Hald, A. Statistical theory with engineering application. John Wiley and Sons. 2000.
- Heftmann, E. (1967). "Chromatography". Second Edition.
- ICH harmonised tripartite guideline: "Validation of analytical procedures methodology", 2000. <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.
- Loy, S., García 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-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 producción de estomopatógenos". Laboratorio de Sanidad Vegetal Minagri. 2003.

- Martínez, M (1994). Estudio de Purificación y Estabilidad del principio activo UC-244. Trabajo de Diploma. UCLV. Curso 1993-1994. Cuba.
- Morales, S.; Calvo, A.; Estévez, D. (2006). “Desarrollo y validación de una técnica analítica empleando Dispersión en Matriz Sólida y HPLC para la determinación de G-1 en plasma humano” (Trabajo de Diploma). Facultad de Química y Farmacia. UCLV.
- NC ISO 5725-1:2005. “Exactitud (veracidad y precisión) de un método de medición y resultados”. Parte 1: Principios generales y definiciones (ISO 5725-1:1994, IDT).
- 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, D. (2006). “Estudio de las mejores condiciones de síntesis y purificación del UC-244”. Trabajo de Diploma. UCLV. Curso 2005-2006. Cuba.
- Pérez, J.A. (1988). “Evaluación farmacológica y Toxicológica del UC-244 en ratas y conejos de laboratorio”. Tesis Doctoral. Universidad de Leipzig. Alemania.
- Pérez, M. (2008). “Desarrollo y validación de técnicas analíticas por HPLC y SQV, para determinar el contenido de UC-244. Trabajo de Diploma. UCLV. Curso 2007-2008. Cuba.
- Regulación No. 41-2007, Validación de métodos analíticos. CECMED, MINSAP; 2007.
- Rodríguez, M. (2005). “Desarrollo de una técnica para la cuantificación y el estudio de las mejores condiciones de obtención del UC-244”. Trabajo de Diploma. UCLV. Curso 2004-2005. Cuba.
- Rodríguez, R., Martín, E. (1994) “Resultados preliminares a escala de laboratorio del control de coleópteros de importancia en la agricultura”. UCLV.

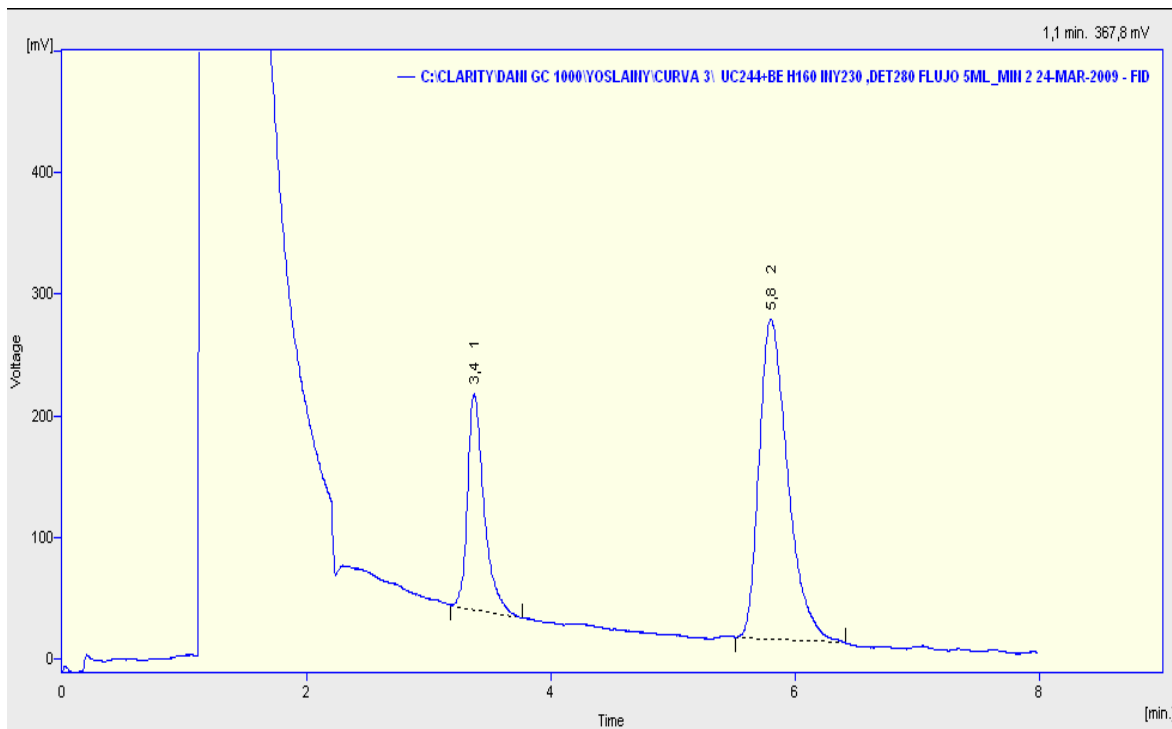
- Rodríguez Negrín, Z.; Peralta Meseguer, G. Obtención de las mejores condiciones de síntesis y purificación del principio activo UC-244. Evaluación analítica. CD ROM III Simposio Internacional de Química, Santa Clara, 5-8 de junio de 2007. Editorial Feijoo, ISBN 978-959-250-337-3.
- Robinson, J.; Robinson K. (2000). "Química Analítica Contemporánea". Prentice Hall, México, Edición en español, Caps.11y13.
- Salazar E. y Colaboradores (1996). "Uso de un nuevo formulado UC-244 CE 25% para el control de ácaros en ajo". Cuba.
- Saucedo Castillo, O. (2004). "Resultados parciales de los estudios sobre la efectividad del UC-244 CE 25% sobre el control de granos almacenados". UCLV.
- Skoog, A.D. (1997). "Análisis Instrumental". Mc Graus-Hill 4^{ta} Edición.
- Torres, L. (2003). "Desarrollo de una técnica combinada por CCD-UV para la cuantificación de UC-244". Trabajo de Diploma. UCLV. Curso 2002-2003.Cuba.
- Trygg, J.; Svante, W. Introduction to Statistical Experimental. Homepage of Chemometrics. University of Queensland, Australia & Umea University, Sweden 2002. En URL <http://www.acc.umu.se/~tnkjtg/Chemometrics/Ebditorial> visitada en septiembre 2007.
- US Pharmacopoeia XXX (2008).
- Willard, H. (1991). "Métodos Instrumentales de Análisis". Grupo Editorial Ibero América.



Anexos

Anexo 1

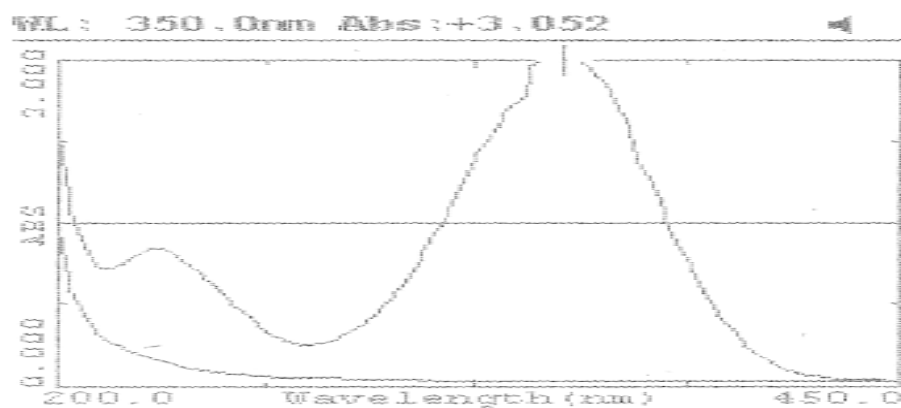
Cromatograma realizado al UC-244 por GC-FID.



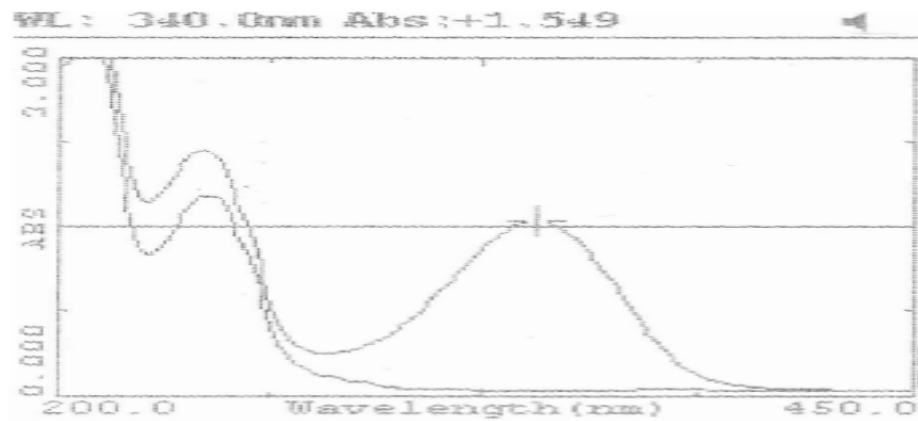
Anexo 2

Espectros de absorción del UC-244 en presencia de diferentes solventes.

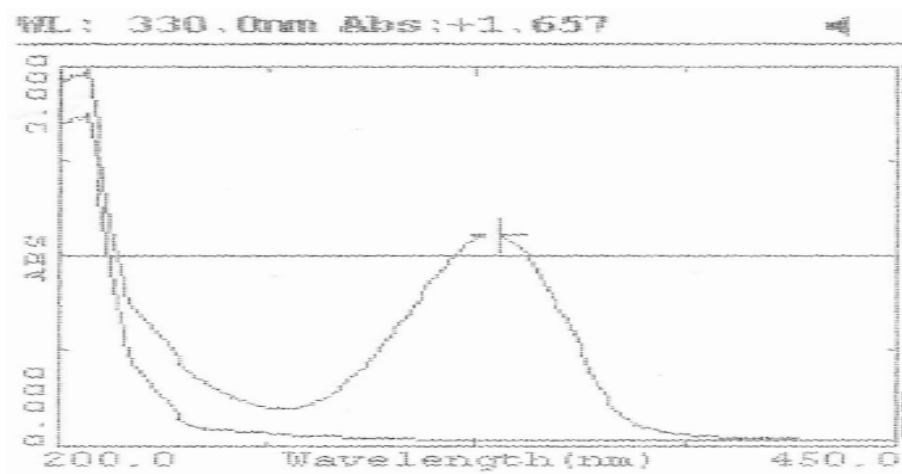
Etanol



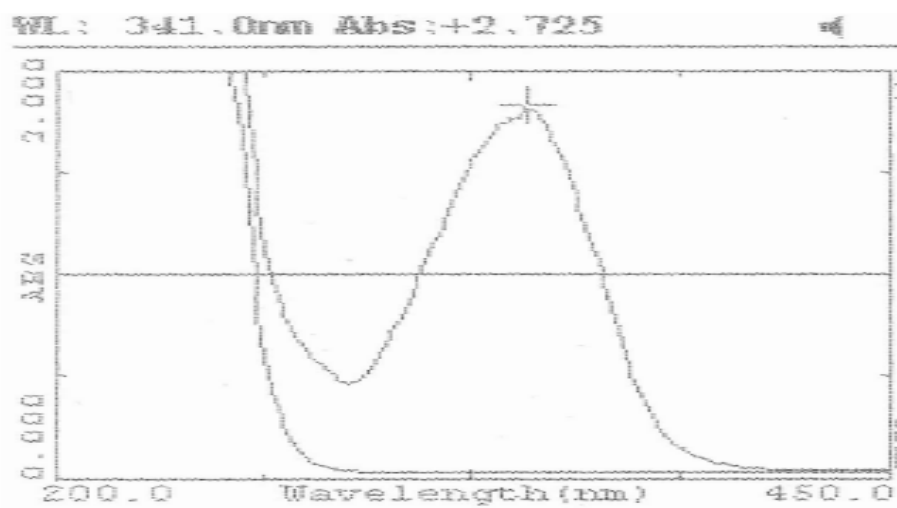
Éter dietílico

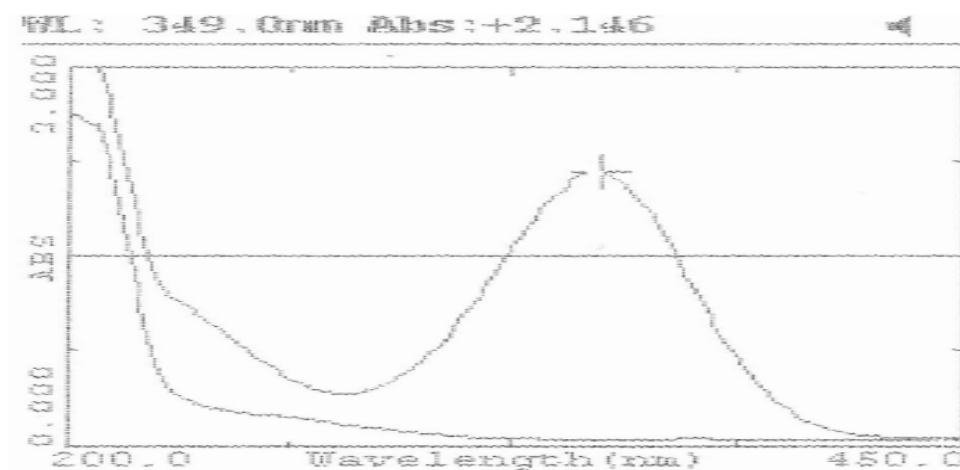


Éter de petróleo 40 - 60 °C



Tetracloruro de carbono



Metanol**Anexo 3**

**Análisis de regresión lineal de la curva de calibrado por CCD-
Espectrofotometría UV-VIS para la determinación de UC-244.**

Regression Analysis - Linear model: $Y = a + b \cdot X$

Dependent variable: Absorbancia

Independent variable: Concentración

Parameter	Estimate	Standard Error	T Statistic	P-Value
Intercept	-0.0332565	0.0394245	-0.843549	0.4100
Slope	0.107045	0.0026096	41.0196	0.0000

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	3.76984	1	3.76984	1682.61	0.0000
Residual	0.0403286	18	0.00224048		

Total (Corr.) 3.81017 19

Correlation Coefficient = 0.994694

R-squared = 98.9416 percent

Standard Error of Est. = 0.0473337

The StatAdvisor

The output shows the results of fitting a linear model to describe the relationship between Absorbancia and Concentración. The equation of the fitted model is

$$\text{Absorbancia} = -0.0332565 + 0.107045 * \text{Concentración}$$

Since the P-value in the ANOVA table is less than 0.01, there is a statistically significant relationship between Absorbancia and Concentración at the 99% confidence level. The R-Squared statistic indicates that the model as fitted explains 98.9416% of the variability in Absorbancia. The correlation coefficient equals 0.994694, indicating a relatively strong relationship between the variables. The standard error of the estimate shows the standard deviation of the residuals to be 0.0473337. This value can be used to construct prediction limits for new observations by selecting the Forecasts option from the text menu.

Anexo 4

Comparación de las medias de las concentraciones obtenidas a través del estudio de reproducibilidad intermedia por la técnica combinada CCD-Espectrofotometría UV-VIS en la determinación de UC-244.

Comparison of Means

95.0% confidence interval for mean of Analista 1: 13.5455 +/- 0.48268
[13.0628,14.0282]

95.0% confidence interval for mean of Analista 2: 13.9492 +/- 0.844594
[13.1047,14.7938]

95.0% confidence interval for the difference between the means

Assuming equal variances: -0.40375 +/- 0.747957 [-1.15171,0.344207]

t test to compare means

Null hypothesis: $\text{mean1} = \text{mean2}$

Alt. hypothesis: $\text{mean1} \neq \text{mean2}$

Assuming equal variances: $t = -1.32085$ P-value = 0.23469

The StatAdvisor

This option runs a t-test to compare the means of the two samples. It also constructs confidence intervals or bounds for each mean and for the difference between the means. Of particular interest is the confidence interval for the difference between the means, which extends from -1.15171 to 0.344207.

Since the interval contains the value 0.0, there is not a statistically significant difference between the means of the two samples at the 95.0% confidence level. A t-test may also be used to test a specific hypothesis about the difference between the means of the populations from which the two samples come. In this case, the test has been constructed to determine whether the difference between the two means equals 0.0 versus the alternative hypothesis that the difference does not equal 0.0. Since the computed P-value is not less than 0.05, we cannot reject the null hypothesis.

NOTE: These results assume that the variances of the two samples are equal. In this case, that assumption appears to be reasonable based on the results of an F-test to compare the standard deviations. You can see the results of that test by selecting Comparison of Standard Deviations from the Tabular Options menu.

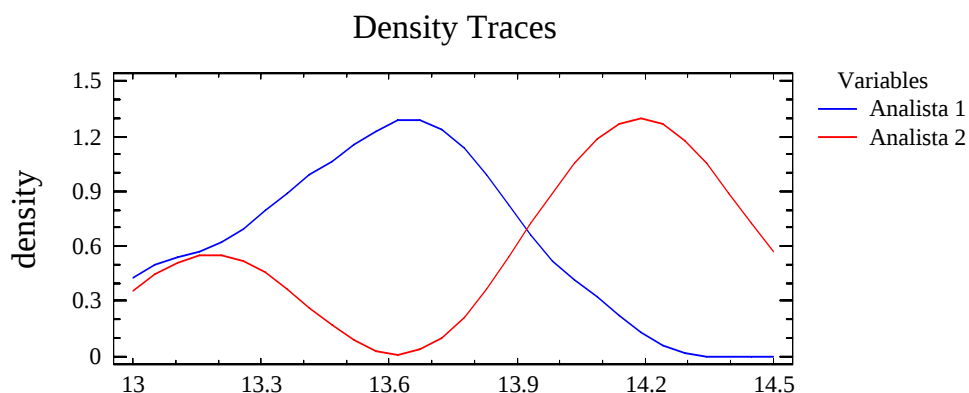
Summary Statistics

	Analista 1	Analista 2

Count	4	4
Average	13.5455	13.9492
Variance	0.0920143	0.28173
Standard deviation	0.303339	0.530783
Minimum	13.146	13.183
Maximum	13.884	14.398
Range	0.738	1.215
Std. Skewness	-0.485941	-1.26872
Std. Kurtosis	0.69325	1.13271

The StatAdvisor

This table shows summary statistics for the two samples of data. Other tabular options within this analysis can be used to test whether differences between the statistics from the two samples are statistically significant. Of particular interest here are the standardized skewness and standardized kurtosis, which can be used to determine whether the samples come from normal distributions. Values of these statistics outside the range of -2 to +2 indicate significant departures from normality, which would tend to invalidate the test which compare the standard deviations. In this case, both standardized skewness values are within the range expected. Both standardized kurtosis values are within the range expected.



Anexo 5

Análisis de regresión lineal de la curva de calibrado por GC-MS para la determinación de UC-244.

Regression Analysis Linear model: $Y = a + b \cdot X$

Dependent variable: Área corregida

Independent variable: Concentración

Parameter	Estimate	Standard Error	T Statistic	P-Value
Intercept	-0,0770296	0,0116879	-6,59054	0,0000
Slope	0,0034301	0,0000415819	82,4903	0,0000

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	1, 69178	1	1.69178	6804,65	0,0000
Residual	0, 00472381	19	0,000248622		

Total (Corr.) 1,69651 20

Correlation Coefficient = 0,998607

R-squared = 99, 7216 percent

Standard Error of Est. = 0.0157677

The StatAdvisor

The output shows the results of fitting a linear model to describe the relationship between. Área corregida and Concentración. The equation of the fitted model is

$$\text{Área corregida} = -0.0770296 + 0.0034301 * \text{Concentración}$$

Since the P-value in the ANOVA table is less than 0.01, there is a statistically significant relationship between Área corregida and Concentración at the 99% confidence level. The R-Squared statistic indicates that the model as fitted explains 99,7216% of the variability in Área corregida. The correlation coefficient equals 0,998607, indicating a relatively strong relationship between the variables. The standard error of the estimate shows the standard deviation of the residuals to be 0,0157677. This value can be used to construct prediction limits for new observations by selecting the Forecasts option from the text menu.

Anexo 6

Comparación de las medias de las concentraciones obtenidas a través del estudio de reproducibilidad intermedia por la técnica GC-MS en la determinación de UC-244.

Comparison of Means.

95.0% confidence interval for mean of Primer día: 249.237 +/- 3.78323
[245.453,253.02]

95.0% confidence interval for mean of Segundo día: 250.8 +/- 1.70585
[249.094,252.506]

95.0% confidence interval for the difference between the means

Assuming equal variances: -1.56333 +/- 3.59718 [-5.16051,2.03384]

Ttest to compare means

Null hypothesis: mean1 = mean2

Alt. hypothesis: mean1 NE mean2

Assuming equal variances: t = -0.968351 P-value = 0.355706

The StatAdvisor.

This option runs a t-test to compare the means of the two samples. It also constructs confidence intervals or bounds for each mean and for the difference between the means. Of particular interest is the confidence interval for the difference between the means, which extends from -5.16051 to 2.03384.

Since the interval contains the value 0.0, there is not a statistically significant difference between the means of the two samples at the 95.0% confidence level. A t-test may also be used to test a specific hypothesis about the difference between the means of the populations from which the two samples come. In this case, the test has been constructed to determine whether the difference between the two means equals 0.0 versus the alternative hypothesis that the difference does not equal 0.0. Since the computed P-value is not less than 0.05, we cannot reject the null hypothesis.

NOTE: These results assume that the variances of the two samples are equal. In this case, that assumption appears to be reasonable based on the results of an F-test to compare the standard deviations. You can see the results of that test by selecting Comparison of Standard Deviations from the Tabular Options menu.

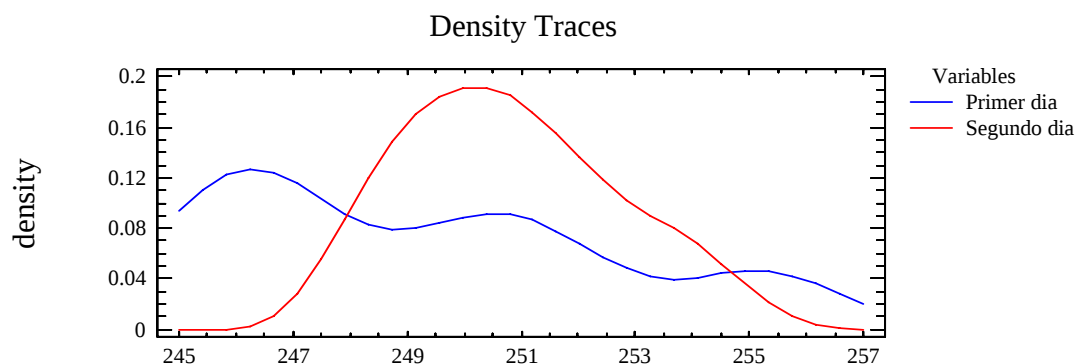
Summary Statistics

	Primer día	Segundo día

Count	6	6
Average	249.237	250.8
Variance	12.9961	2.6422
Standard deviation	3.60501	1.62548
Minimum	245.55	249.4
Maximum	255.04	253.15
Range	9.49	3.75
Std. Skewness	0.74403	0.935937
Std. Kurtosis	-0.160095	-0.776684

The StatAdvisor

This table shows summary statistics for the two samples of data. Other tabular options within this analysis can be used to test whether differences between the statistics from the two samples are statistically significant. Of particular interest here are the standardized skewness and standardized kurtosis, which can be used to determine whether the samples come from normal distributions. Values of these statistics outside the range of -2 to +2 indicate significant departures from normality, which would tend to invalidate the tests which compare the standard deviations. In this case, both standardized skewness values are within the range expected. Both standardized kurtosis values are within the range expected.



Anexo 7

Análisis estadístico del diseño factorial 2^3 de la técnica GC-MS.

Analysis of Variance for Concentración - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:Furfural	1,04117	1	1,04117	0,04	0,8449
B:Isobutilamina	5,43959	1	5,43959	0,21	0,6558
C:Nitroetano	122,731	1	122,731	4,71	0,0507
RESIDUAL	312,564	12	26,047		
TOTAL (CORRECTED)	441,776	15			

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

The StatAdvisor

The ANOVA table decomposes the variability of Concentración 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 Concentración at the 95,0% confidence level.

Multiple Regression Analysis

Dependent variable: Concentración

Parameter	Estimate	Standard Error	T Statistic	P-Value
CONSTANT	254,046	1,27591	199,11	0,0000
Furfural	0,255095	1,27591	0,199932	0,8449
Isobutilamina	-0,583073	1,27591	-0,456987	0,6558
Nitroetano	2,7696	1,27591	2,17069	0,0507

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	129,212	3	43,0705	1,65	0,2295
Residual	312,564	12	26,047		
Total (Corr.)	441,776	15			

R-squared = 29,2482 percent

R-squared (adjusted for d.f.) = 11,5603 percent

Standard Error of Est. = 5,10363

Mean absolute error = 3,60777

Durbin-Watson statistic = 1,03017

The StatAdvisor

The output shows the results of fitting a multiple linear regression model to describe the relationship between Concentración and 3 independent variables. The equation of the fitted model is

Conct = 254,046 + 0,255095*Furfural - 0,583073*Isobutilamina + 2,7696*Nitroetano.

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 29,2482% of the variability in Concentración. The adjusted R-squared statistic, which is more suitable for comparing models with different numbers of independent variables, is 11,5603%. The standard error of the estimate shows the standard deviation of the residuals to be 5,10363. This value can be used to construct prediction limits for new observations by selecting the Reports option from the text menu.

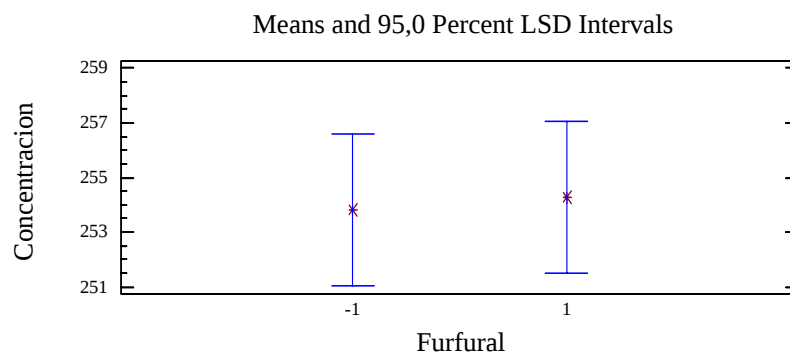
The mean absolute error (MAE) of 3,60777 is the average value of the residuals. The Durbin-Watson (DW) statistic tests the residuals to determine if there is any significant correlation based on the order in which they occur in your data file. Since the DW value is less than 1.4, there may be some indication 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 0,8449, belonging to Furfural. 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 Furfural from the model.

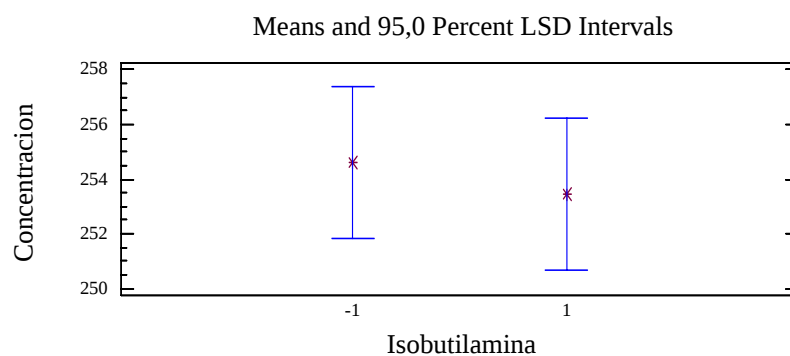
Anexo 8

Gráficas de las influencias de los interferentes para la especificidad de la técnica GC-MS.

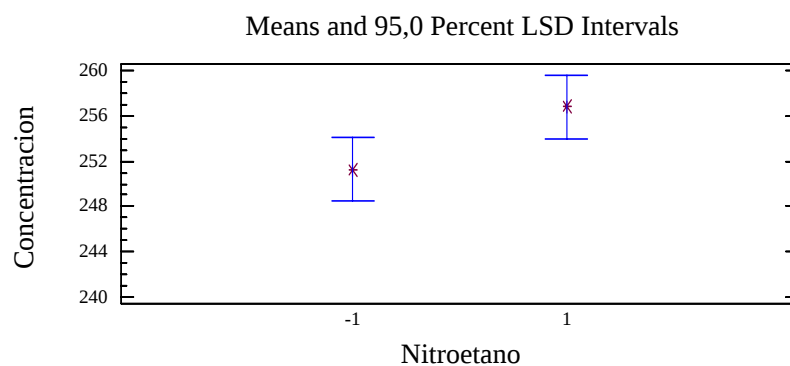
Furfural



Isobutilamina



Nitroetano



Anexo 9

Análisis de regresión lineal de la curva de calibrado por GC-FID para la determinación de UC-244.

Regression Analysis - Linear model: $Y = a + b \cdot X$

Dependent variable: Área corregida

Independent variable: Concentración

Parameter	Estimate	Standard Error	T Statistic	P-Value
Intercept	0.0139621	0.00667658	2.0912	0.0473
Slope	0.00240032	0.0000235482	101.932	0.0000

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	1.52958	1	1.52958	10390.23	0.0000
Residual	0.00353311	24	0.000147213		
Total (Corr.)	1.53311	25			

Correlation Coefficient = 0.998847

R-squared = 99.7695 percent

Standard Error of Est. = 0.0121331

The StatAdvisor

The output shows the results of fitting a linear model to describe the relationship between Área corregida and Concentración. The equation of the fitted model is

$$\text{Área corregida} = 0.0139621 + 0.00240032 \cdot \text{Concentración}$$

Since the P-value in the ANOVA table is less than 0.01, there is a statistically significant relationship between Área corregida and Concentración at the 99% confidence level. The R-Squared statistic indicates that the model as fitted explains 99.7695% of the variability in Área corregida. The correlation coefficient equals 0.998847, indicating a relatively strong relationship between the variables. The standard error of the estimate shows the standard deviation of the residuals to be 0.0121331. This value can be used to construct prediction limits for new observations by selecting the Forecasts option from the text menu.

Anexo 10

Comparación de las medias de las concentraciones obtenidas a través del estudio de reproducibilidad intermedia por la técnica GC-FID en la determinación de UC-244.

Comparison of Means

95.0% confidence interval for mean of Día 1: 250.926 +/- 1.62949
[249.297,252.555]

95.0% confidence interval for mean of Día 2: 250.03 +/- 3.16754
[246.862,253.198]

95.0% confidence interval for the difference between the means

Assuming equal variances: 0.896 +/- 2.95854 [-2.06254,3.85454]

Ttest to compare means

Null hypothesis: mean1 = mean2

Alt. hypothesis: mean1 NE mean2

Assuming equal variances: t = 0.698381 P-value = 0.50473

The StatAdvisor

This option runs a t-test to compare the means of the two samples. It also constructs confidence intervals or bounds for each mean and for the difference between the means. Of particular interest is the confidence interval for the difference between the means, which extends from -2.06254 to 3.85454.

Since the interval contains the value 0.0, there is not a statistically significant difference between the means of the two samples at the 95.0% confidence level. A t-test may also be used to test a specific hypothesis about the difference between the means of the populations from which the two samples come. In this case, the test has been constructed to determine whether the difference between the two means equals 0.0 versus the alternative hypothesis that the difference does not equal 0.0. Since the computed P-value is not less than 0.05, we cannot reject the null hypothesis.

NOTE: These results assume that the variances of the two samples are equal. In this case, that assumption appears to be reasonable based on the results of an F-test to compare the standard deviations. You can see the results of that test by selecting Comparison of Standard Deviations from the Tabular Options menu.

Summary Statistics

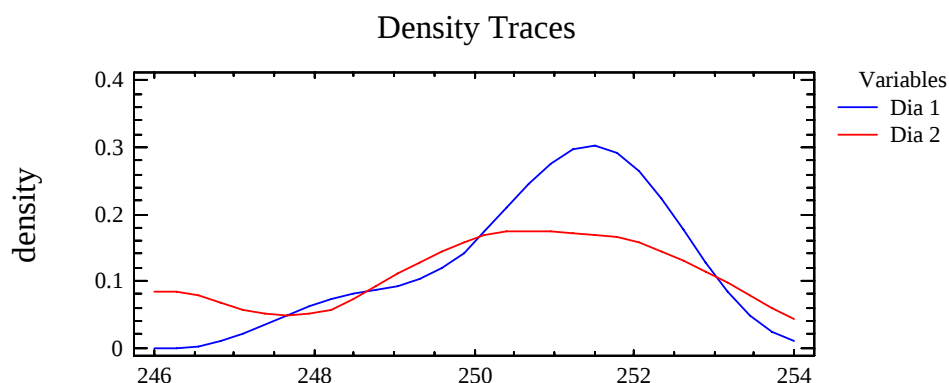
	Día 1	Día 2

Count	5	5
Average	250.926	250.03
Variance	1.72223	6.5078
Standard deviation	1.31234	2.55104
Minimum	248.73	246.14
Maximum	252.13	252.84
Range	3.4	6.7
Std. Skewness	1.42152	-0.781308
Std. Kurtosis	1.27823	0.339747

The StatAdvisor

This table shows summary statistics for the two samples of data. Other tabular options within this analysis can be used to test whether differences between the statistics from the two samples are statistically significant.

Of particular interest here are the standardized skewness and standardized kurtosis, which can be used to determine whether the samples come from normal distributions. Values of these statistics outside the range of -2 to +2 indicate significant departures from normality, which would tend to invalidate the tests which compare the standard deviations. In this case, both standardized skewness values are within the range expected. Both standardized kurtosis values are within the range expected.



Anexo 11

Análisis estadístico del diseño factorial 2^3 de la técnica GC-FID.

Analysis of Variance for Concentración - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:Furfural	22.8508	1	22.8508	0.45	0.5133
B:IBA	0.2379	1	0.2379	0.00	0.9463
C:Nitroetano	244.524	1	244.524	4.86	0.0478
RESIDUAL	604.132	12	50.3443		
TOTAL (CORRECTED)	871.744	15			

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

The StatAdvisor

The ANOVA table decomposes the variability of Concentración 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 one P-value is less than 0.05, this factor has a statistically significant effect on Concentración at the 95.0% confidence level.

Multiple Regression Analysis

Dependent variable: Concentración

Parameter	Estimate	Standard Error	T Statistic	P-Value
CONSTANT	248.238	1.77384	139.944	0.0000
Furfural	-1.19506	1.77384	-0.673714	0.5133
IBA	-0.121938	1.77384	-0.068742	0.9463
Nitroetano	3.90931	1.77384	2.20387	0.0478

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	267.612	3	89.2041	1.77	0.2059
Residual	604.132	12	50.3443		
Total (Corr.)	871.744	15			

R-squared = 30.6985 percent

R-squared (adjusted for d.f.) = 13.3731 percent

Standard Error of Est. = 7.09537

Mean absolute error = 5.12872

Durbin-Watson statistic = 2.02215

The StatAdvisor

The output shows the results of fitting a multiple linear regression model to describe the relationship between Concentración and 3 independent variables. The equation of the fitted model is

$$\text{Conc} = 248.238 - 1.19506 * \text{Furfural} - 0.121938 * \text{Isobutilamina} + 3.90931 * \text{Nitroetano}$$

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.

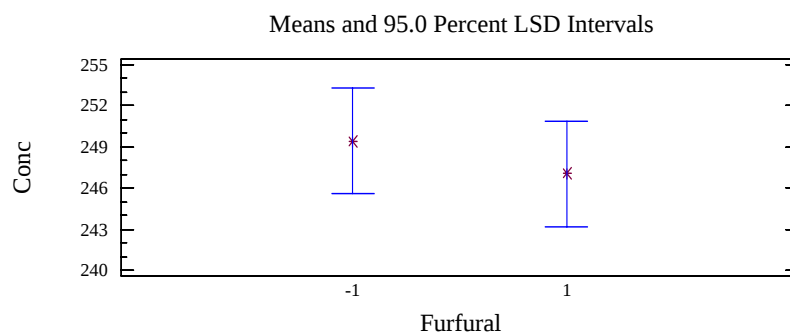
The R-Squared statistic indicates that the model as fitted explains 30.6985% of the variability in Conc. The adjusted R-squared statistic, which is more suitable for comparing models with different numbers of independent variables, is 13.3731%. The standard error of the estimate shows the standard deviation of the residuals to be 7.09537. 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 5.12872 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 0.9463, belonging to IBA. 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 IBA from the model.

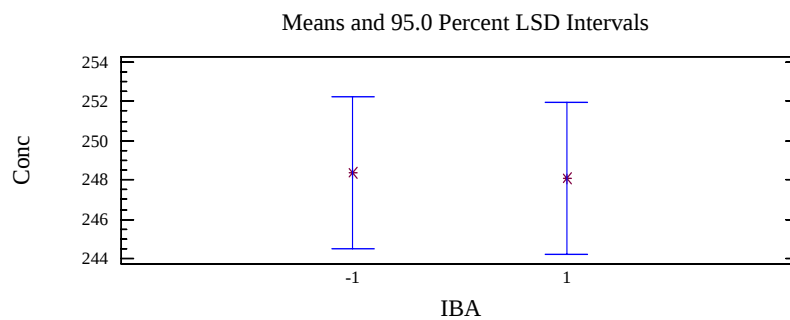
Anexo 12

Gráficas de las influencias de los interferentes para la especificidad de la técnica GC-FID.

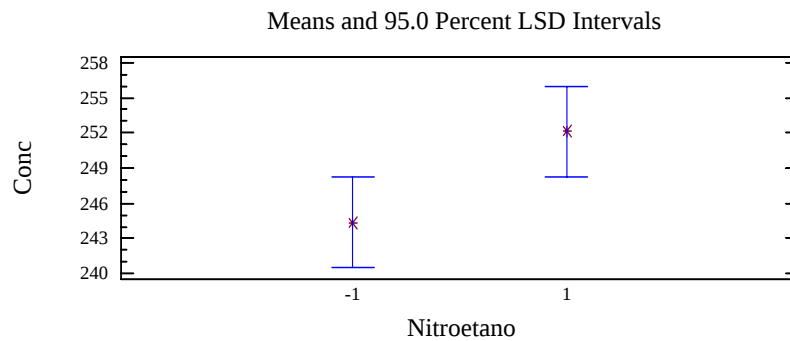
Furfural



Isobutilamina



Nitroetano



Anexo 13

Comparación de las medias de las concentraciones obtenidas a través del estudio de reproducibilidad intermedia por la técnica GC-FID y GC-MS en la determinación de UC-244.

Comparison of Means

95.0% confidence interval for mean of GC MS: 250.018 +/- 1.77163
[248.247,251.79]

95.0% confidence interval for mean of GC FID: 250.478 +/- 1.40924
[249.069,251.887]

95.0% confidence interval for the difference between the means

Assuming equal variances: -0.459667 +/- 2.19188 [-2.65155,1.73222]

t test to compare means

Null hypothesis: mean1 = mean2

Alt. hypothesis: mean1 NE mean2

Assuming equal variances: t = -0.437455 P-value = 0.666469

The StatAdvisor

This option runs a t-test to compare the means of the two samples. It also constructs confidence intervals or bounds for each mean and for the difference between the means. Of particular interest is the confidence interval for the difference between the means, which extends from -2.65155 to 1.73222. Since the interval contains the value 0.0, there is not a statistically significant difference between the means of the two samples at the 95.0% confidence level. A t-test may also be used to test a specific hypothesis about the difference between the means of the populations from which the two samples come. In this case, the test has been constructed to determine whether the difference between the two means equals 0.0 versus the alternative hypothesis that the difference does not equal 0.0. Since the computed P-value is not less than 0.05, we cannot reject the null hypothesis.

NOTE: These results assume that the variances of the two samples are equal. In this case, that assumption appears to be reasonable based on the results of an F-test to compare the standard deviations. You can see the results of that

test by selecting Comparison of Standard Deviations from the Tabular Options menu.

Summary Statistics

	GC MS	GC FID
Count	12	10
Average	250.018	250.478
Variance	7.77485	3.8808
Standard deviation	2.78834	1.96997
Minimum	245.55	246.14
Maximum	255.04	252.84
Range	9.49	6.7
Std. Skewness	0.0583182	-1.60131
Std. Kurtosis	-0.184185	1.01481

The StatAdvisor

This table shows summary statistics for the two samples of data. Other tabular options within this analysis can be used to test whether differences between the statistics from the two samples are statistically significant. Of particular interest here are the standardized skewness and standardized kurtosis, which can be used to determine whether the samples come from normal distributions. Values of these statistics outside the range of -2 to +2 indicate significant departures from normality, which would tend to invalidate the tests which compare the standard deviations. In this case, both standardized skewness values are within the range expected. Both standardized kurtosis values are within the range expected.

