



*Desarrollo de una técnica espectrofotométrica para la
cuantificación de nitrometano en residuales del
LPBQ*

Autora: Teresa Castellano Valdés

Tutores: Lic. Teófilo Exiquio Gaitán Placeres
Lic. Blanca Nieves Hernández Martínez

Curso: 2006-2007

CON SU ENTRAÑABLE TRANSPARENCIA



Resumen

Fue desarrollada una técnica espectrofotométrica en la región VIS para la determinación de nitrometano en residuales de La Planta de Producción del Centro de Bioactivos Químicos. La misma se basa en la formación de un compuesto coloreado al reaccionar el nitrometano con la sal sódica del ácido 1,2-naftoquinona-4-sulfónico (reactivo de Folin). Se determinaron las condiciones de trabajo tales como la longitud de onda, los reactivos a emplear y sus cantidades. Además se determinaron los siguientes parámetros analíticos que caracterizan la técnica: precisión, exactitud, linealidad y especificidad. En relación a este último parámetro se estudió la influencia de la piridina, disulfuro de carbono, G-0, G-1, ion bromuro, isobutilamina, ácido acético, ion hipoclorito y furfural. Se comprobó que los mismos no influyen significativamente en la absorbancia excepto el hipoclorito. Finalmente la técnica fue aplicada a la determinación de nitrometano en residuales del taller de G-0 tales como: licor de G-0 (PIC) y etanol de la purificación de G-0, así como al residual de salida, formado por diferentes corrientes residuales de la planta ya tratados.

Palabras claves: Nitrometano, Reactivo de Folin, espectrofotometría VIS, diseño experimental.

Abstract

It was developed VIS spectrophotometric technique for the determination of nitromethane in waste water of the Plant of Production of the Bioactive Chemical Center. The same one is based on the formation of a coloured compound when reacting the nitromethane with the 1,2-naftoquinona-4-sulfonic acid reagent (Reactive of Folin). It was determined the conditions of work, such as the wavelength, the reagent to use and its amounts. In addition analytical parameters were determined that they characterize the technique such as: precision, accuracy, linearity and specificity. In relation to this last parameter the piridina influence was studied as some as with, carbon disulphide, G-0, G-1, bromide, isobutylamine, acetic acid and furfural. It was verified that those reactivities do not influence significantly in the absorbancia. Finally the technique was applied to the determination of nitromethane in waste water of the factory of G-0 such as: liquor (PIC) the G-0, ethanol of G-0 purification, as well as to the last waste water that it be, formed by different waste currents of the Plant that it was treated.

Keywords: Nitrometano, Reagent of Folin, spectrophotometric vis, experimental design.

Índice	Páginas.
Introducción.	1
1- Parte teórica	3
1.1 Propiedades del G-0.....	3
1.2 Descripción general de la síntesis de 2-(2-nitrovinil)-furano (G-O).....	3
1.3 Características del nitrometano.....	6
1.3.1 Estabilidad y reactividad.....	6
1.3.2 Características toxicológicas del nitrometano.....	7
1.3.3 Comportamiento en el medio ambiente.....	8
1.4 Características de la sal sódica del ácido 1,2-naftoquinona-4-sulfónico, (reactivo de Folin).....	9
1.5 Técnicas analíticas.....	9
1.5.1 Antecedentes de las técnicas analíticas reportadas en la literatura para la cuantificación de nitrometano.....	10
1.5.2 Características generales de la espectrofotometría.....	12
1.5.3 Basamento de la técnica empleada.....	13
1.5.4 Consideraciones generales acerca del diseño experimental.....	14
1.5.5 Algunos conceptos generales relacionados con el diseño factorial experimental.....	15
1.5.6 Características fundamentales de los métodos analíticos.....	16
2-Materiales y métodos	20
2.1 Reactivos, disoluciones y equipos.....	20
2.2 Selección de las condiciones de trabajo.....	21
2.3 Aplicaciones de la técnica.....	24
2.3.2 Estudio del residual de salida.....	25
3-Resultados y discusión	28
3.1 Condiciones de trabajo.....	28

3.2 Curva de calibrado en las condiciones del diseño 2^{4-1}	35
3.3 Aplicaciones de la técnica.....	40
3.3.1 Determinación de nitrometano en el licor agotado de la separación de G-0 crudo.....	40
3.3.2 Aplicación de la técnica a muestras de alcohol del proceso de purificación del G-O.....	41
3.3.3 Estudio del residual mezclado.....	41
Evaluación económica.....	49
Conclusiones.....	50

Introducción:

En el Centro de Bioactivos Químicos de la Universidad Central “Marta Abreu de las Villas” se obtiene el ingrediente farmacéutico activo 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano, conocido como (G-1). El referido componente es sintetizado por vía química, a partir del furfural, un derivado de la industria azucarera, por su reacción con nitrometano en presencia de isobutilamina, en una primera etapa en que se obtiene el producto intermediario 2-(2-nitrovinil)-furano, reconocido como (G-O). Este último compuesto, a través de reacciones de bromación y deshidrobrmación, conduce a la obtención del

G-1(1).

Como en todo proceso químico industrial resulta indispensable contar con las técnicas de control analítico para caracterizar, tanto a las materias primas como a los productos finales del proceso productivo, incluidos los residuales del mismo. Lo anterior condiciona el empleo racional de los recursos, contribuye a una conducción eficiente del proceso, evita riesgos por exposición a sustancias tóxicas y garantiza la protección del medio ambiente (2).

El nitrometano en particular es un compuesto altamente tóxico, presentando además peligro de explosión. Este compuesto no se degrada con facilidad, por lo que es muy importante realizar un control analítico estricto de su contenido, sobre todo en el residual de vertimiento.

Problema Científico:

El nitrometano es una de las materias primas esenciales, para la obtención del intermediario G-0 y no se cuenta con una técnica analítica, rápida, selectiva y sensible para su cuantificación con la exactitud y precisión requerida en los residuales principales del proceso de producción de G-1.

Hipótesis:

Es posible, mediante la aplicación de la espectrofotometría de absorción, en la región visible, y el diseño de experimentos, desarrollar una técnica analítica para la cuantificación de nitrometano que cumpla con los requerimientos de exactitud, precisión, sensibilidad y selectividad adecuadas.

Objetivo general:

Desarrollar una técnica espectrofotométrica, para la cuantificación de nitrometano, fundamentada en su interacción con la sal sódica del ácido 1,2-naftoquinona-4-sulfónico en medio alcalino, que garantice el cumplimiento de los indicadores establecidos para ese tipo de procedimiento.

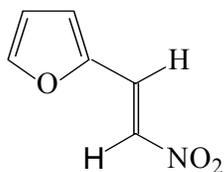
Objetivos específicos:

1. Investigar las condiciones de la reacción de nitrometano con la sal sódica del ácido 1,2-naftoquinona-4-sulfónico con fines cuantitativos.
2. Comprobar los parámetros analíticos principales que caracterizan la técnica espectrofotométrica desarrollada para la determinación de nitrometano
3. Aplicar la metodología desarrollada a la cuantificación de nitrometano en disoluciones puras y en muestras de residuales procedentes de la Planta de Producción del CBQ.

1. Parte teórica

1.1 Propiedades del G-0.

El principio activo G-O en estado puro es un sólido cristalino de color amarillo y olor característico, que funde entre 74 y 75 °C, de masa molar 139 g/mol. Se descompone bajo la acción del calor y la luz solar y se oxida al aire. Es muy poco soluble en agua y muy soluble en solventes orgánicos polares tales como el nitrometano y el etanol. Según la IUPAC se nombra 2-(2-nitrovinil)-furano y su fórmula estructural es la siguiente:

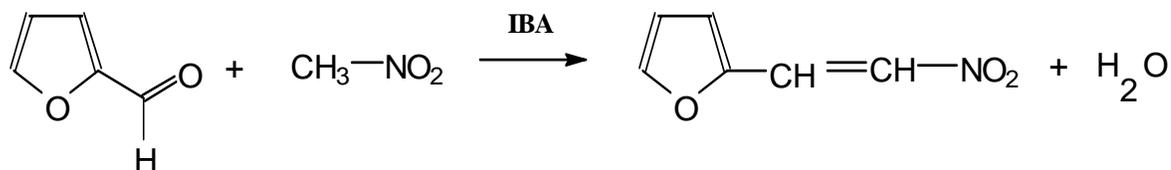


En ella está presente el grupo vinilo, en el que uno de los carbonos que conforman el doble enlace está enlazado al grupo nitro (-NO₂), fuertemente electroceptor, y el otro carbono enlazado al anillo furánico en la posición 2.

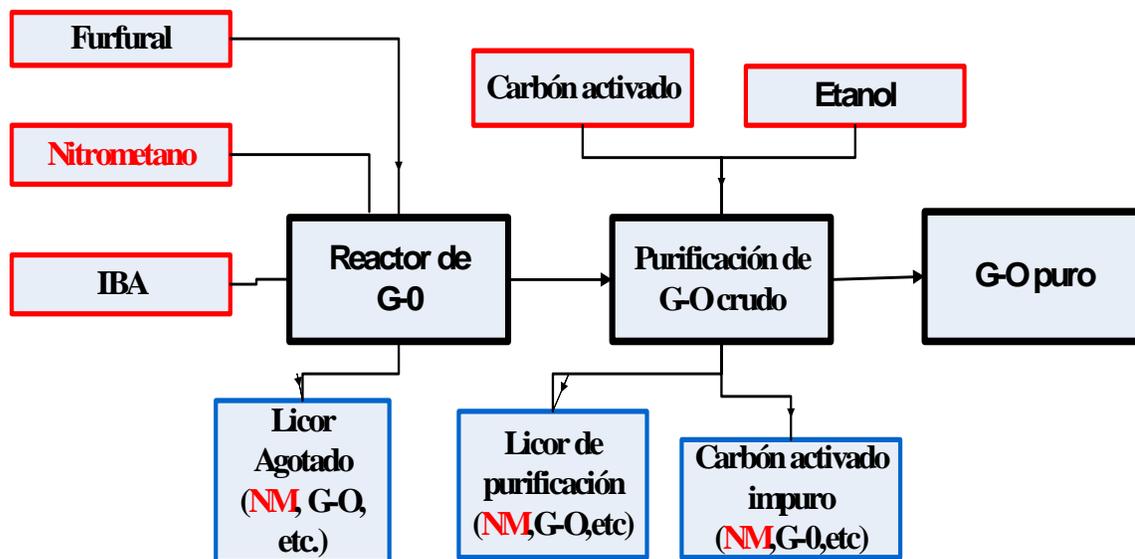
Este compuesto es muy reactivo, destacándose entre sus propiedades químicas fundamentales la adición electrofílica aromática, típica de alquenos, y la sustitución electrofílica aromática en el anillo heterocíclico. Este compuesto disuelto en disulfuro de carbono y sometido a un proceso de bromación da lugar a la formación de 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furan (G-1), en el que se libera bromuro de hidrógeno, así como otros derivados furánicos (1).

1.2 Descripción general de la síntesis de 2-(2-nitrovinil)-furan (G-O)

La síntesis se realiza a partir del furfural en su reacción con nitrometano en presencia de isobutilamina según la ecuación química siguiente: (3,4).



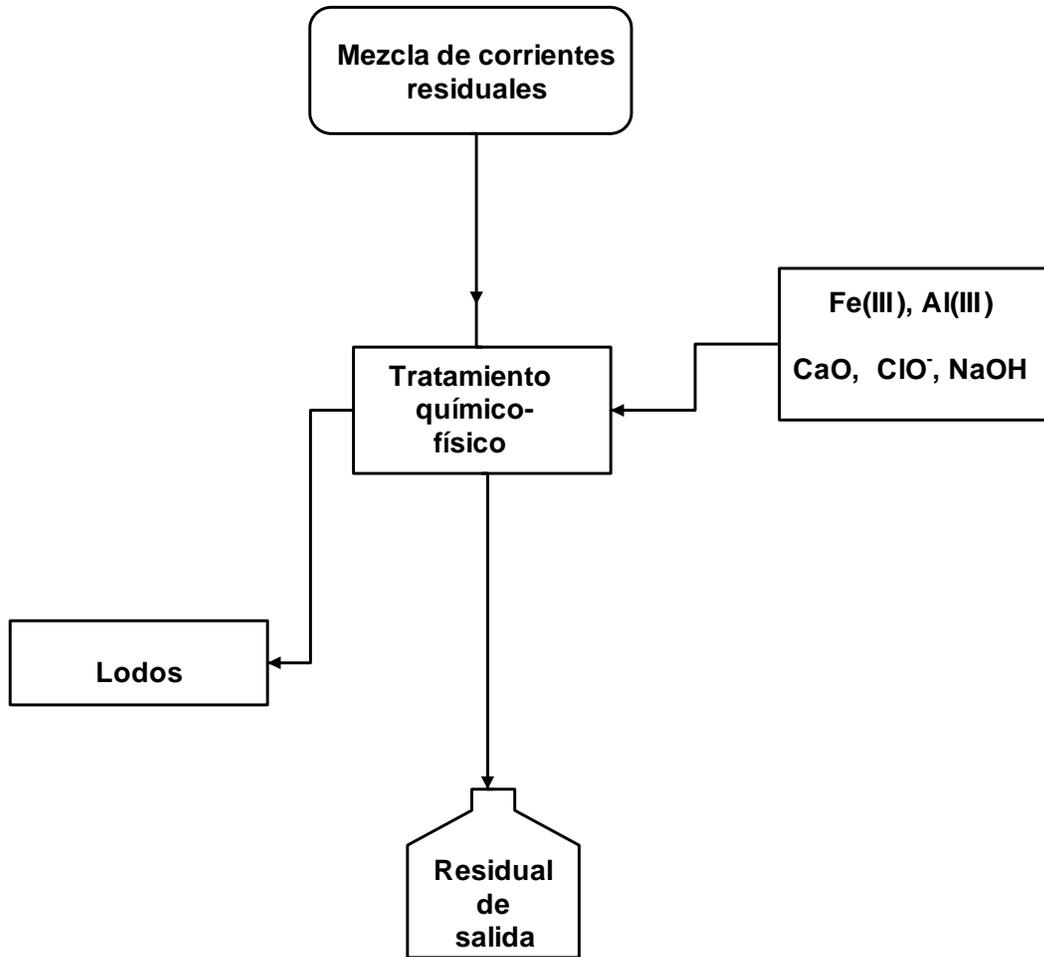
El nitrometano junto a otros contaminantes se incorpora a los residuales del taller de síntesis de G-O.



Esquema1: Síntesis de G-O y sus corrientes residuales

Tanto en el licor agotado como en el licor de purificación se determinó el contenido de nitrometano empleando la técnica desarrollada en esta investigación.

Los residuales líquidos procedentes de los diferentes talleres de la síntesis y purificación de G-1 se mezclan, lo que constituye un potencial de contaminación ambiental relativamente alto, que resulta imprescindible solucionar (4). Este residual se somete a un proceso químico-físico de desactivación representado, de manera general en el siguiente esquema:



Esquema 2: Diagrama simplificado del tratamiento al residual compuesto.

El residual acuoso de salida constituye uno de los sustratos sometidos a análisis en el presente trabajo.

1.3 Características del nitrometano

El nitrometano (NM) es un líquido inflamable al calor, no puede ser inhalado ya que afecta las vías respiratorias y el contacto a través de la piel y los ojos causa irritación. Los compuestos formados con los álcalis fuertes son explosivos. En la tabla 1 se presentan las propiedades químico-físicas del mismo (5-7).

Tabla 1: Propiedades químicas y físicas del nitrometano

Fórmula química	CH ₃ -NO ₂
Masa molecular relativa, g.mol ⁻¹	61.04
Densidad de vapor	2:1(NM:aire)
Temperatura de ebullición °C	100-102
Temperatura de fusión, °C	-29
Solubilidad en agua, g/L a 20°C	95
Olor	El olor a fruta desagradable
Temperatura de auto ignición, °C	415
Presión de vapor, mm Hg, 27,5 °C	40
Temperatura de inflamación, °C	44
Presión de vapor, hPa (20°C)	36
Límites de explosión (inferior/superior) , Vol. %	7,3 / 63
Aspecto	Es un líquido aceitoso claro y transparente.

1.3.1 Estabilidad y reactividad

Dentro de sus propiedades se caracteriza por ser sensible al calor, presentando peligro de explosión al ser calentando, sobre todo en recipientes cerrados. Interacciona violentamente con gran cantidad de materiales; reacciona con las aminas orgánicas, ácidos, y algunos óxidos de metales que pueden aumentar notablemente su sensibilidad a la detonación por choque, siendo necesario manejar las mezclas explosivas que este forma con extrema cautela.

Al someter el nitrometano a un proceso de combustión puede producir productos de descomposición peligrosos como son: monóxido de carbono, el dióxido de carbono y los óxidos de nitrógeno. En el anexo (7-8) aparecen algunas medidas de protección y medios de extinción a aplicar en caso de accidente con este reactivo.



1.3.2 Características toxicológicas del nitrometano.

Carcinogenicidad

En la literatura se reportan estudios sobre la carcinogenicidad del nitrometano en animales de experimentación. En los mismos se administró este compuesto por inhalación a ratones y ratas, observándose que aumentaron las incidencias combinadas de tumores benignos y malignos, en tres sitios del tejido en los ratones y a un sitio de tejido diferente en las ratas. En los ratones, el nitrometano causó tumores en los pulmones en ambos sexos, siendo más marcados en las hembras. El nitrometano causó en las ratas (F344/N) tumores en las glándulas mamarias. La Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (2000) concluyó que había evidencias suficientes para considerar que el nitrometano es carcinogénico en los animales experimentales estudiados (8,9).

Otras características toxicológicas

En las tablas 2 y 3 se muestran algunos datos toxicológicos.

Tabla 2: Información toxicológica

VLA-ED, ppm o 51 mg/m ³	20
TLV-TWA, ppm o 50 mg/m ³	20
El límite de la exposición permisible(LEP), ppm (250 mg/m ³)	100
DL ₅₀ : oral rata, mg/kg	940
DL ₅₀ : intraperitoneal ratón, mg/kg:	110

Nota: VLA-ED – valores de exposición diaria; TLV-TWA- valor límite umbral- media ponderada en el tiempo.

Tabla 3: Toxicidad del nitrometano en peces

Nombre	Efecto	Tiempo de estudio	LC50, mg/kg
Pimephales promelas	Mortalidad	96h	278

1.3.3 Comportamiento en el medio ambiente (10)

Tierra

El nitrometano cuando se encuentra en la tierra, se evapora rápidamente, aunque puede lixiviar en las aguas subterráneas.

Agua:

Cuando se vierte al agua, no es biodegradable, pudiendo evaporarse de forma moderada; se estima una vida media entre 10 y 30 días. El nitrometano tiene una bioconcentración, determinada experimentalmente menor de 100 ppm, por lo que no se espera una bioacumulación significativa.

Aire:

Cuando se encuentra en el aire, el nitrometano se degrada rápidamente por fotólisis, presentando una vida media menor de 1 día.

Tabla 4: Ecotoxicidad del nitrometano

Test EC ₅₀ (mg/L) Bacterias (Photobacterium phosphoreum)		4454
Medio receptor	riesgo para el medio acuático	medio
	riesgo para el medio terrestre	bajo
clasificación, muy tóxico		

Nota: EC₅₀- dosis ecotóxica media

1.5 Características de la sal sódica del ácido 1,2-naftoquinona-4-sulfónico, (reactivo de Folin)

En la tabla 5 aparecen algunas de las propiedades características del reactivo de Folin (11)

Tabla 5: Propiedades químico- físicas del reactivo de Folin

Fórmula química	C ₁₀ H ₅ NaO ₅ S
Masa molar	260.19 g/mol
Estado de agregación	sólido
Color	amarillo
Olor	inodoro
Solubilidad	fácilmente soluble en agua
Temperatura de fusión, °C	se descompone a (289°C) sin fundir
Estabilidad	estable

Este producto es inflamable a altas temperaturas, además combustiona con los óxidos del carbono (CO, CO₂) así como con algunos óxidos metálicos. En el anexo 9 aparecen algunas medidas de protección que deben tenerse en cuenta en el laboratorio al trabajar con este reactivo.

Información toxicológica

La toxicidad en ratas resulta aguda para una dosis letal media (LD₅₀) de 625 mg/kg de peso.

En los humanos causa irritación al contacto con la piel, ingestión o inhalación (los vapores irritan los pulmones).

1.5 Técnicas analíticas

La Química Analítica es la ciencia que se ocupa de la determinación cualitativa o cuantitativa de las sustancias. Su objeto es el análisis y su contenido los métodos que la misma aplica (12).

En particular los métodos cuantitativos de análisis se dividen en dos grandes grupos que son conocidos como: métodos clásicos e instrumentales. También existen clasificaciones que toman en consideración el tamaño de la muestra a analizar, el rango de concentración de la sustancia a determinar y otros criterios (13).

Todo método analítico instrumental, se basa en la medición de una propiedad que esta relacionada funcionalmente con la concentración de la sustancia a determinar mediante una ecuación del tipo:

$$P = f(C)$$

Donde P es la propiedad medida

1.5.1 Antecedentes de las técnicas analíticas reportadas en la literatura para la determinación de nitrometano

En la bibliografía reciente se reporta el empleo de la cromatografía gaseosa y su combinación con otras técnicas para la determinación de nitrometano en productos farmacéuticos. Así, por ejemplo, algunos autores investigan la residualidad de este solvente en fármacos para uso humano, empleando técnicas como: GC-MS, GC-FTIR y GC-Head Space con adición de estándar interno (14,15). Estas técnicas están en correspondencia con las regulaciones establecidas por la comisión internacional de armonización de requerimientos técnicos para registros farmacéuticos para uso humano y las farmacopeas de la U.E y la de los EE.UU.

También se ha empleado la reacción coloreada resultante de la interacción del reactivo de Folin (sal sódica del ácido 1,2-naftoquinona-4-sulfónico) con nitrometano, en presencia de hidróxido de sodio para la detección de este último y la GC con patrón interno para su cuantificación en productos cosméticos en forma de aerosol (16). Por su parte, Rodríguez y colaboradores (17) desarrollaron una técnica analítica para la determinación de nitrometano por polarografía diferencial de pulso (PDP) en muestras del proceso productivo de G-1.

Por otra parte se reportan varios trabajos que emplean el método de Lowry para la determinación cuantitativa de proteínas utilizando el reactivo de Folin- Ciocalteus, así por ejemplo Amarger N. y M. Alexander investigaron la formación de nitritos a partir de hidroxilamina y oximas formadas por *speudomona aeruginosa* (18); en esta investigación se hace un estudio del mecanismo de interacción de dichos reactivos y se determina el contenido de proteínas empleando el reactivo de Folin- Ciocalteus y albúmina de suero bovino como estándar. También Oliver H., A. Nira R. y colaboradores reportan la determinación cualitativa de enzimas en tejidos del cerebro empleando dicho reactivo (19). Korai y colaboradores refieren el papel de la reducción total iNOS en la producción de especies nitrogenadas activas después de una respuesta alérgica, donde también se determina el contenido de proteínas aplicando el ensayo de Lowry (20). El método analítico mencionado fue aplicado además por Geroge K. Chacko al estudiar la modificación de lipoproteínas humanas de alta densidad con tetranitrometano y su efecto en las membranas plasmáticas del hígado de las ratas (21) ;

Toshiko Kido también lo emplea para cuantificar proteínas en la investigación realizada sobre la purificación y propiedades de enzimas oxidadas con la participación de nitralkanos (22).

Por otra parte el reactivo de Folin se ha utilizado para la determinación cuantitativa de residuos de tirosina protegida en ovotransferrina- hierro por colorimetría. Este método permitió determinar las fracciones de péptidos que contienen tirosil y triptofil. Para ello, estos investigadores utilizaron una mezcla de carbonato de sodio e hidróxido de sodio en medio acuoso para obtener el medio básico, midiendo la absorbancia a 500 nm (23).

Posteriormente el grupo de ciencia de la vida de los laboratorios Bio Rad publican un método de determinación de proteínas solubilizadas con detergente por su acción reductora con el reactivo de Folin en presencia de una disolución de cobre- tartrato en medio básico. Este presenta ventajas frente al método de Lowry, puesto que la reacción alcanza, en un 90 % el máximo desarrollo del color en 15 min, descomponiéndose un 5 % en una hora y un 10 % en dos horas. El desarrollo del color se debe principalmente a la presencia de aminoácidos como tirosina y triptofán y en menor medida por la cistina, cisteína e histidina (24).

En años recientes se ha continuado aplicando la técnica de Lowry para la determinación de proteínas con el reactivo de Folin (25-33).

En el presente trabajo fue seleccionada la espectrofotometría de absorción en la región visible del espectro, empleando el reactivo de Folin para desarrollar una técnica analítica con el fin de cuantificar nitrometano en residuales del proceso productivo de G-1. Para ello se tomó en cuenta el bajo límite de detección del reactivo, la región donde absorbe el producto coloreado obtenido, y la simplicidad y economía que ofrece la técnica.

1.5.2 Características generales de la espectrofotometría

La ley de Bouguer Lambert- Beer se basa en dos postulados esenciales:

- 1- Cuando un haz de luz cuyos rayos son paralelos y monocromáticos incide perpendicularmente sobre una superficie en un medio homogéneo, cada capa o segmento infinitesimal de ese medio hace decrecer la intensidad de la radiación incidente en una fracción constante.

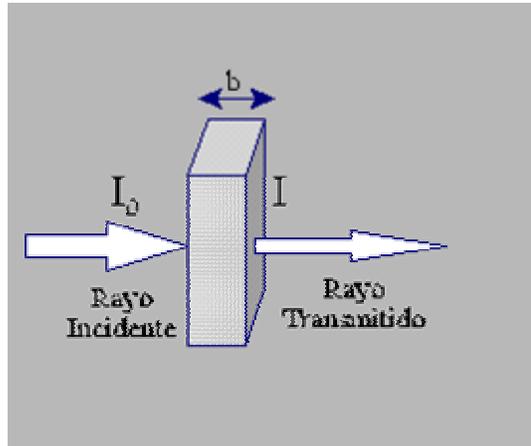


Figura 1: Atenuación de un rayo de luz monocromática al pasar a través de una celda de espesor b .

El decrecimiento infinitesimal dI con el espesor del medio absorbente también infinitesimal db , puede ser denotado mediante la expresión:

$$-dI = Kdb \quad (1)$$

Donde: K es una constante que depende de la longitud de onda y de la naturaleza del medio; I es la intensidad de la radiación incidente y b es el camino óptico.

- 2- El incremento de la concentración del medio absorbente también disminuye la intensidad de la radiación, en condiciones similares a las anteriormente citadas, lo que se expresa según la siguiente ecuación:

$$-dI/I_0 = Kdc \quad (2)$$

La combinación de las expresiones (1) y (2) integrada y expresada en forma logarítmica es conocida clásicamente como ley de Bouguer- Lambert –Beer:

$$A = -\log_{10} \left(\frac{I}{I_0} \right) = abc \quad (3)$$

En la ecuación (3) I_0 e I representan las intensidades de la luz incidente y transmitida por el disolvente puro y la disolución respectivamente, con la sustancia que absorbe de concentración c . El parámetro b es el espesor del paso óptico de la luz incidente sobre la muestra, y a es el coeficiente de absortividad (también se conoce como el coeficiente de extinción molar (ξ)) de la especie que absorbe, que es una constante de proporcionalidad característica de cada sustancia. El valor de a depende de la longitud de onda de la radiación utilizada para irradiar la muestra y es característica para cada especie química. Por lo tanto, la función de absortividad identifica la sustancia que absorbe.

La expresión anterior establece la relación lineal de la absorbancia en función de la concentración de la solución, para un valor fijado del camino óptico. La construcción de una curva de calibrado empleando soluciones de diferentes concentraciones, obtenidas a partir de un patrón, permite determinar la concentración de una muestra problema.

La determinación de nitrometano en la región UV del espectro electromagnético se basa en la ley de Bouguer Lambert- Beer, midiendo la absorbancia de la solución a una longitud de onda previamente seleccionada y fijando el camino óptico.

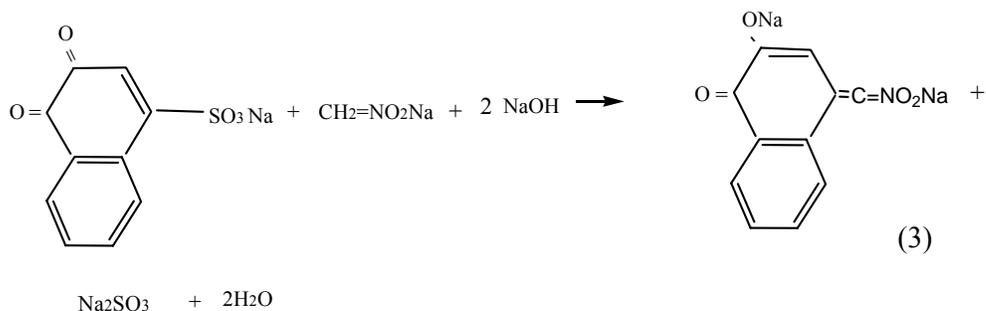
La longitud de onda de trabajo generalmente corresponde a la absorción máxima de la especie investigada en el espectro electromagnético, aunque también puede ser seleccionada aquella que resulte más selectiva (34).

1.5.3 Basamento de la técnica empleada

a) Determinación espectrofotométrica de nitrometano.

La determinación de nitrometano se basa en la aplicación de la ley de Bouguer Lambert Beer, al sistema formado por nitrometano y la sal sódica del ácido 1,2-naftoquinona-4-sulfónico en medio alcalino, que da lugar a la formación de un compuesto coloreado, según las reacciones siguientes (11):





La reacción 3 que da lugar a la formación del compuesto coloreado [sal disódica del 2-hidroxi-4-(acinitrometilen)naftalen-ona] debe ser cuantitativa y el sistema estable para aplicarla con fines cuantitativos.

Para propiciar una mayor solubilidad del nitrometano es conveniente utilizar acetonitrilo ya que disminuye la polaridad del medio, y facilita la formación del intermediario metilénico que da lugar a la reacción. También es aconsejable utilizar polietilenglicol 6000 para aumentar la viscosidad del medio, lo que favorece la estabilidad del sistema.

1.5.4 Consideraciones generales acerca del diseño experimental.

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 otros métodos. Es frecuente que los químicos necesiten enfrentarse a numerosos problemas relacionados con la realización de experimentos más o menos costosos y complejos con el objetivo de obtener información sobre el sistema en estudio. Muchos son los ejemplos que pueden citarse al respecto: la síntesis de una reacción, las condiciones de realización de un experimento, la influencia de factores sobre las propiedades químico-físicas de un producto y el ajuste de las condiciones de una técnica. En la mayoría de estos problemas químicos, se investiga cómo influyen diferentes condiciones de realización sobre una propiedad o característica del sistema investigado. Los métodos de diseño de experimentos permiten sistematizar la forma de realización de las corridas experimentales y obtener la máxima información posible con la mínima cantidad de experimentos. La importancia de un diseño de 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:

- El estudio de los mecanismos de procesos complejos y de las propiedades de sistemas multicomponentes.
- La optimización de los procesos y propiedades de los sistemas multicomponentes.

Para realizar un diseño de experimentos es necesario conocer el objeto de investigación, para lo cual se establece un método cibernético que consta de los parámetros de optimización y de los factores. Un parámetro de optimización debe ser: efectivo desde el punto de vista investigativo, de naturaleza universal, cuantitativo y expresada mediante un valor único, así como efectivo estadísticamente.

1.5.5 Algunos conceptos generales relacionados con el diseño factorial experimental (35-37)

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, una propiedad proporcional a la concentración, 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.

1.5.6 Características fundamentales de los métodos analíticos (38-40).

Todo método analítico deberá comprender las siguientes características:

Practicabilidad: Es la que decide si el procedimiento es fácil o difícilmente realizable en la práctica. Los parámetros de practicabilidad se evalúan en la fase de desarrollo del método analítico: tiempo, costo, tamaño de la muestra, calificación del personal, tipo de equipo e instrumentación, condiciones de seguridad, etc.

Idoneidad: Es el conjunto de parámetros que garantizan que el sistema responde, en el momento de los análisis, a los requisitos fijados en la validación del método. La idoneidad verifica el buen funcionamiento del sistema (instrumento y método) en el momento de uso.

Fiabilidad: Es la que demuestra la capacidad de un método analítico para mantener a lo largo del tiempo los criterios fundamentales de validación. Los parámetros que expresan la fiabilidad de los métodos analíticos son: linealidad, precisión, exactitud, sensibilidad y especificidad.

Linealidad: Se entiende como linealidad, la capacidad de un método analítico de obtener resultados linealmente proporcionales a la concentración del analito en la muestra, en un intervalo determinado. Dentro de este término se incluye la proporcionalidad entre la concentración y la respuesta, así como el intervalo o rango de concentraciones de la sustancia para las cuales el método es satisfactorio. El ensayo de linealidad puede efectuarse, tanto sobre soluciones patrones, como sobre muestras problemas que contengan concentraciones crecientes de las sustancias de interés.

Para evaluar la linealidad de una técnica analítica se debe obtener la representación gráfica de la recta de regresión. Si existen diferencias apreciables entre los valores experimentales y los puntos de la recta, significa que la linealidad no es buena o que el error experimental es importante y los límites de confianza deben ser amplios. Si la recta no pasa por el origen de coordenadas el método a evaluar están afectadas por un error sistemático (sesgo), ya sea por exceso o por defecto.

Test de linealidad

- Coefficiente de variación de los factores de respuesta (CVf).

El factor de respuesta (f) es la relación entre la lectura y la concentración. Para una concentración determinada el factor respuesta puede tomarse como una expresión aproximada de la sensibilidad de calibrado a esta concentración. En una calibración lineal, los factores respuesta deben ser semejantes entre sí y cercanos al valor de la pendiente, por este motivo se puede tomar el CVf como una expresión de linealidad.

Se considera que valores del CVf superiores al 5 % indican falta de linealidad (38, 39).

El coeficiente de variación de los factores respuestas se obtienen según:

$$CVf = \frac{Sf}{\bar{f}} \cdot 100$$

- Significación estadística de la varianza de la pendiente.

La pendiente se conoce también como coeficiente de regresión, por lo que a mayor pendiente mayor sensibilidad. Para expresar la linealidad, se utiliza el coeficiente de variación de la pendiente el cual debe ser menor que el 2 % (39).

Este parámetro se determina según:

$$CVm = \frac{Sm}{m} \cdot 100$$

Los límites de confianza de la pendiente se hallan a partir de la expresión: $m \pm Sm * t$, siendo t el valor de la distribución t de student para $n-2$ grados de libertad a la probabilidad escogida (generalmente $\alpha = 0.05$).

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

La t experimental es determinada según:

$$t \text{ exp} = \frac{|m|}{Sm}$$

- Test de proporcionalidad.

El valor de b , intersección con el eje de las coordenadas, indica el error sistemático del método, en el caso ideal debe ser cero.

El coeficiente de variación del término independiente CV_b se determinó según:

$$CV_b = \left\{ \frac{S_b}{|b|} \right\} \times 100$$

Donde: S_b es la desviación estándar de b .

Los límites de confianza del término independiente son: $b \pm \underline{Sb} * t$, siendo t el valor de la distribución t de student para $n-2$ grados de libertad a la probabilidad escogida ($\alpha=0.05$). Si este límite de confianza incluye al cero, entonces se cumple la condición de proporcionalidad.

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

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

Precisión: La precisión es el grado de concordancia entre los valores de una serie repetida de ensayos analíticos, efectuados sobre una muestra homogénea. La precisión se expresa matemáticamente por el coeficiente de variación (CV), a través de la repetibilidad y de la reproducibilidad de la técnica. Del término precisión del método se pueden distinguir dos tipos de estudios:

- **Repetibilidad:** Es la medida de la precisión de un método efectuado en las mismas condiciones, sobre la misma muestra, por un mismo analista, en un mismo laboratorio, con los mismos aparatos y reactivos y en el curso de la misma serie de análisis efectuados en un corto intervalo de tiempo (generalmente el mismo día). El ensayo de repetibilidad del método se efectúa sobre una serie de porciones de una muestra homogénea que se analiza desde el principio (preparación de la muestra) hasta el final (lectura de los resultados) por el mismo analista y el mismo instrumento. El número de repeticiones del análisis deberá ser superior a 5 y la concentración del analito en la muestra problema suele ser similar a la nominal o declarada. El criterio seleccionado para evaluar la repetibilidad depende del tipo de muestra a ensayar, del criterio del investigador etc. En este caso fue seleccionado el valor de: $CV \leq 3\%$ (39).
- **Reproducibilidad:** Es la medida de la precisión de los resultados de un método analítico efectuado sobre la misma muestra pero en condiciones diferentes (diferentes analistas, aparatos, días, etc.). Cuando además, los laboratorios son distintos se habla de precisión ínter laboratorios. La reproducibilidad global se determina por el coeficiente de variación. Si se desea estudiar el efecto de cada uno de los tres factores (día, analista e instrumento) por separado, deberá realizarse un análisis de varianza. Para este tipo prueba, al igual que para la repetibilidad el criterio del coeficiente de variación no siempre es el mismo, siendo seleccionado en este caso el valor de: $CV \leq 5\%$ (39.)

Exactitud:

La exactitud indica la capacidad de un método analítico para dar resultados lo más

próximo posible al valor verdadero. Matemáticamente, la exactitud se expresa en forma del porcentaje de recuperación de la cantidad de analito presente en la muestra, entre el valor hallado.

2. Materiales y métodos

2.1 Reactivos, disoluciones y equipos

Los reactivos empleados en el trabajo fueron los siguientes:

- ❖ G-O (99.9 % de pureza)
- ❖ G-1 (99.9 % de pureza)
- ❖ Na₂ CO₃ (p.a.)
- ❖ Nitrometano (98%; d = 1.13 g.mL⁻¹)
- ❖ Polietilenglicol 6000 (p.a.)
- ❖ Acetonitrilo (99 %; d = 0.796 g.mL⁻¹)
- ❖ Sal sódica del ácido 1,2-naftoquinona-4-sulfónico (p.a.)
- ❖ Furfural (recién destilado), (99 %; d = 1.159 g.mL⁻¹)
- ❖ Isobutilamina (IBA), (99 %; d= 0.735 g.mL⁻¹)
- ❖ Acido acético (p.a.), (98 % ; d= 1.054 g.mL⁻¹)
- ❖ KBr (p.a.)
- ❖ Etanol clase A (96 %)
- ❖ Hipoclorito de sodio (comercial)
- ❖ Piridina p.a (99.5%; d= 0.819 g/mL⁻¹)
- ❖ Almidón (p. a.)
- ❖ Yoduro de potasio (p. a).

Las disoluciones utilizadas en el trabajo se describen a continuación:

✚ *Disolución saturada de acetonitrilo:*

Se tomó una alícuota de 5 mL de acetonitrilo se mezcló con agua destilada y se agitó enérgicamente hasta saturar la disolución. Posteriormente se completó el volumen del sistema bifásico hasta 100 mL con dicho solvente.

✚ *Disolución de carbonato de sodio 0.1 mol.L⁻¹ :*

Se pesaron 0.5301 g de la sal y se disolvió en agua destilada, completando a un volumen de 100 mL en un frasco volumétrico.

✚ *Disolución de polietilenglicol 6000 al 1 %:*

Se disolvió 1g de este reactivo en una pequeña cantidad de agua caliente, completando a 100 mL con este disolvente.

✚ *Disolución de trabajo de nitrometano:*

Se preparó una solución de 100 ppm en etanol clase A. A partir de esta solución se preparó otra de 25 ppm en agua.

✚ *Disolución de la sal sódica del ácido 1,2-naftoquinona-4-sulfónico al 1%:*

Se disolvió 0,1 g del reactivo en 100 mL de agua destilada.

✚ *Almidón 0.5%*

Para preparar la disolución de almidón se pesó aproximadamente 0.5g de este almidón, se mezcló con una pequeña cantidad de agua, agitando hasta obtener una papilla; posteriormente esta mezcla se transvasó a un vaso de precipitado con agua a ebullición manteniendo el calentamiento hasta tanto el sistema se torne traslúcido.

✚ *Disolución saturada de yoduro de potasio.*

Se tomaron 100 mL de agua destilada y se añadió yoduro de potasio, en constante agitación hasta la sobresaturación.

Equipos

✚ Balanza analítica

✚ Espectrofotómetro UV VIS Camspec M 501de fabricación China

2.2 Selección de las condiciones de trabajo

Longitud de onda: Se registraron los espectros de absorción a una disolución de nitrometano en presencia de la sal sódica del ácido 1,2-naftoquinona-4-sulfónico y carbonato de sodio y a otra de composición similar que no contenía nitrometano.

Influencia de algunos parámetros que intervienen en el proceso de formación del compuesto coloreado: Se aplicó un diseño factorial fraccionado 2^{5-2} , cuyos factores y niveles se expresan en la tabla siguiente:

Tabla 6: Factores y niveles del diseño 2^{5-2}

Variables/ niveles	V(NM) 100 ppm	V(Na ₂ CO ₃), mL 0.1 mol.L ⁻¹	Tiempo de contacto, min	V(R.Folin), mL 0.05%	Tiempo de medida, min
NI	1	1	5	5	7
NS	2	4	10	8	15

Donde:

NS- nivel superior; NI-nivel inferior, NM- nitrometano,

R. Folin- sal sódica del ácido 1,2-naftoquinona-4-sulfónico,

La función respuesta seleccionada es la absorbancia del compuesto coloreado (sal disódica del, 2-hydroxi-4-(acinitrometilen)naftalen-1(4H)-ona).

Procedimiento empleado para la curva de calibrado en las condiciones del diseño 2⁵⁻²

Se tomaron alícuotas de la solución de trabajo para obtener concentraciones de nitrometano correspondientes a: 0.5, 1, 2, 2.6, 3 y 3.6 ppm, para el primer rango y 2, 4, 5, 6, 7 y 8 ppm en el segundo rango. Estas alícuotas se vertieron en una serie de frascos volumétricos de 25 mL de capacidad; en cada caso se adicionaron 4 mL de carbonato de sodio 0.1 mol.L^{-1} y se mantuvieron en reposo durante 10 min, posteriormente se adicionan 5 mL del reactivo de Folin al 0.05 %, se enrasó con agua destilada, esperando 7 min antes de medir. A continuación se midió la absorbancia en cubetas de 1 cm de espesor a la longitud de onda seleccionada.

Con las lecturas de absorbancia y las concentraciones de cada disolución se graficaron las curvas de calibración.

Repetibilidad: Fueron realizadas 9 réplicas de la determinación analítica de nitrometano, siguiendo el procedimiento arriba descrito a una solución que contenía 3 ppm y 4 réplicas a otra que contenía 5 ppm, correspondientes a la región central de las curvas 1 y 2 respectivamente. Las mediciones se realizaron un mismo día, por un mismo analista y bajo las mismas condiciones.

El criterio seleccionado para la aceptación de la repetibilidad fue el siguiente: $CV \leq 3\%$ (39).

La exactitud fue evaluada mediante el cálculo del recobrado, aceptando los valores correspondientes al rango: $97 \% \geq R \leq 103\%$ (39).

Estudio de la estabilidad del sistema reaccionante en el tiempo: Se midió la absorbancia desde el momento de mezclado los reactivos y hasta después de haber transcurridos 80 min. A partir de los 30 min se realizaron las medidas a dos concentraciones diferentes (2 y 4 ppm). Los intervalos empleados fueron de 1 y 5 min según la zona de la curva.

Para favorecer el completamiento de la reacción y la estabilidad del sistema se estudió el efecto del polietilenglicol y el acetonitrilo sobre el progreso de la

reacción, evaluando la absorbancia del sistema y a través de esta el recobrado de nitrometano. El sistema estudiado también contenía carbonato de sodio para asegurar un medio básico.

Condiciones empleadas para la realización del diseño 2^{4-1} : Los factores y niveles del diseño se muestran en la tabla 7.

Tabla 7: Factores y niveles del diseño 2^{4-1}

Variables/ niveles	V(PG) 1 % mL	V(Acetonitrilo) Sol. saturada mL	V(Na₂CO₃) 0.1 mol.L⁻¹ mL	Tiempo de medida min
NI	2	2	3	30
NS	4	4	4	60

Donde: PG – Polietilenglicol

La función respuesta considerada fue la absorbancia y como factores constantes se fijó el volumen de la sal sódica del ácido 1,2-naftoquinona-4-sulfónico (5mL) y el del nitrometano igual a 1mL de la disolución de 25 ppm.

Procedimiento empleado para la curva de calibrado en las condiciones derivadas del diseño 2^{4-1}

Se tomaron alícuotas de la solución de trabajo para obtener concentraciones de nitrometano correspondientes a: 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 ppm y se vertieron en una serie de matraces de 25mL de capacidad. A continuación se adicionaron 2mL de polietilenglicol, 4mL de acetonitrilo, 5mL de la sal sódica del ácido 1,2-naftoquinona-4-sulfónico y 3mL de la solución de carbonato de sodio y se enrasó con agua destilada. Después de transcurridos 30 min se midió la absorbancia en cubetas de 1cm de espesor, a la longitud de onda seleccionada. Con las lecturas de absorbancia y las concentraciones de cada disolución se graficó la curva de calibración.

Para compensar el efecto matriz se empleo un blanco que contenía los componentes de sistema excepto el nitrometano.

Estudio de la precisión y exactitud de la técnica

Para estudiar la precisión de la técnica se estudio la repetibilidad de la forma ya descrita realizando 9 réplicas. Además se determinó la reproducibilidad con 12 réplicas correspondientes al punto medio de la curva, en diferentes días, bajo las mismas

condiciones. La exactitud fue evaluada mediante el recobrado, considerando el rango de aceptación anteriormente mencionado.

Límite de cuantificación de la técnica

Para determinar el límite de cuantificación de la técnica fue evaluada la precisión y la exactitud de la misma en los puntos correspondientes a las menores concentraciones de nitrometano en la curva de calibrado en el rango de 2-4 ppm.

Estudio de interferencias

Otro aspecto investigado fue la especificidad de la técnica respecto a la presencia de interferentes que participan en el proceso productivo de G-1. La tablas 8 y 9 contienen las variables y niveles de los diseños de experimentos 2^{6-3} y 2^3 aplicados para ello.

Tabla 8: Factores y niveles del diseño 2^{6-3} para el estudio de interferencias

Variables (V(X)), mL/ niveles	V(G-O)	V(G-1)	V(ff)	V(IBA)	V(A.Ac)	V(Br ⁻¹)
	2500	1000	1250	250	625	6750
	ppm					
NI	2	1.25	4	2	0.8	3.7
NS	0.2	0.5	0.8	1	0.6	0.74

Donde:

ff- furfural; A.Ac.-ácido acético; IBA- isobutilamina, ClO⁻ - ion hipoclorito

Tabla 9: Factores y niveles del diseño 2^3 para el estudio de interferencias

Variables (V(X)), mL/ niveles	V(ClO ⁻) ,	V (piridina),	V(etanol)
	1: 8	20 y 5 ppm	
NI	1	5	0
NS	0.5	1.2	2

2.3 Aplicaciones de la técnica

2.3.1 Determinación de nitrometano en residuales del taller de G-0

La técnica fue aplicada a muestras del licor agotado de la síntesis del G-0 crudo (licor PIC) y a otras tomadas del alcohol empleado en el proceso de purificación de este principio activo.

- ✚ *Determinación de nitrometano en el licor agotado de la separación de G-0 crudo (licor PIC).*

Procedimiento: Se mide exactamente 0.1 mL del licor PIC, trasvasándola a un frasco volumétrico de 50 mL de capacidad y se completa el volumen con alcohol etílico clase A. Después de homogeneizar la mezcla se filtra, empleando filtración rápida y se toman 0.05 mL de esta disolución a la que se aplica la técnica descrita en el epígrafe correspondiente a la curva de calibrado.

- ✚ *Aplicación de la técnica a muestras de alcohol (etanol) del proceso de purificación del G-O.*

Procedimiento: Se miden exactamente 0.2 mL del alcohol agotado, después de la separación del G-O purificado. A continuación se aplica la técnica de la misma forma que en el caso anterior.

2.3.2 Estudio del residual de salida

Para determinar la composición cualitativa del residual objeto de investigación, primeramente se realizó un estudio cromatográfico a soluciones patrones de nitrometano (NM), piridina, furfural (ff), G-1, G-0, CS₂ y anhídrido acético, mediante HPLC hallando el tiempo de retención de cada uno de ellos, cuando se emplea acetonitrilo-agua como sistema de solventes.

El cromatógrafo empleado fue un HPLC *KNAUER*, de fabricación alemana y las condiciones de operación correspondieron a:

- Velocidad de flujo 0.3 mL. min⁻¹
- Tiempo de registro 15 min
- Tipo de columna Hypersil BDC 150 mm de longitud
- Diámetro de a columna 4.6 mm
- Longitud de onda 255 nm
- Fase móvil acetonitrilo: agua 80:20

Metodología empleada: Fueron preparadas disoluciones de las especies químicas estudiadas de concentración igual a 20 ppm, por separado en frascos volumétricos de 10 mL enrasando con una mezcla de acetonitrilo-agua 80:20 y registrando el cromatograma correspondiente por HPLC.

Conocido el comportamiento cromatográfico de los contaminantes objetos de estudio en soluciones puras, se estudió la composición cualitativa del residual de salida en las diferentes fases de tratamiento, mediante los siguientes experimentos:

1) Registró de los cromatogramas (HPLC) del residual mezclado, en las condiciones cromatográficas descritas después de las siguientes etapas de tratamiento: pretratamiento y tratamientos primario y terciario.

2) Corrida de un cromatograma por capa delgada empleando una placa de sílica gel-60 para investigar la posible presencia de furfural, G-O y G-1. El sistema de solvente utilizado fue tetracloruro de carbono – cloroformo 10:1 y el revelado se realizó con radiación UV. El procedimiento empleado consistió en aplicar un patrón de cada interferente investigado y de la muestra en la línea base de la placa y correr la misma. Este ensayo se realizó después de los tratamientos primario y terciario.

3) Realización de un ensayo cualitativo después del tratamiento primario para comprobar la presencia de hipoclorito de sodio consistente en: tomar una alícuota del residual, añadirle 2-3 mL de solución diluida de yoduro de sodio, así como suspensión de almidón y observar si se colorea de azul.

4) Aplicación de la técnica a la determinación de nitrometano al residual mezclado en cada fase de tratamiento (primario y terciario).

Para determinar el contenido de nitrometano en el residual mezclado parcialmente tratado y tratado fue tomada una muestra del mismo, la que se sometió al tratamiento químico físico empleado para su desactivación, que se describirá a continuación y se aplicó la técnica analítica desarrollada en el trabajo en las etapas seleccionadas (4).

Procedimiento empleado para la desactivación del residual

Se tomó una muestra de 10mL del residual de la Planta de Producción del CBQ, pretratada con hidróxido de sodio durante 72 horas; a esta muestra se le añadieron 10 mL de alumbre férrico al 5 %, 10 mL de suspensión CaO, previamente agitada, 2mL de NaClO 1:4 en agua destilada y 2 mL NaOH al 8%; se llevó a 50 mL en un frasco volumétrico y se filtró. Este procedimiento constituyó el tratamiento primario.

Después se realizó el tratamiento terciario el cual consistió en tomar 10 mL del filtrado obtenido en el tratamiento primario al cual se le añadió 2mL de suspensión CaO, previamente agitado, 2 mL de solución de $Al_2(SO_4)_3$ y 2 mL de NaClO y se llevó a un volumen fijo de 25 mL en un frasco volumétrico y se filtró. A continuación se

dosificó la alúmina hasta elevar el pH al rango de valores exigidos por las normas, lo que constituye el tratamiento terciario (4).

Procedimiento empleado para la aplicación de la técnica analítica al residual mezclado después de los tratamientos primario y terciario. Se midieron exactamente 4 mL del residual tratado, se le agregó 1 mL de disolución de ácido acético concentrado y se aplicó la metodología desarrollada en el trabajo para la determinación de nitrometano empleando el reactivo de Folin.

3. Resultados y discusión

3.1 Condiciones de trabajo

Selección de la Longitud de onda

Los espectros de absorción de una disolución de la sal sódica del ácido 1,2-naftoquinona-4-sulfónico y del compuesto coloreado obtenido (sal disódica del 2-hydroxi-4-(acinitrometilen)naftalen-1(4H)-ona) se muestran en la figura 2. La longitud de onda máxima de este último corresponde a 565nm, siendo esta seleccionada para el trabajo; en esta región del espectro el reactivo de Folin presenta una pequeña absorción que resulta compensada con el blanco.

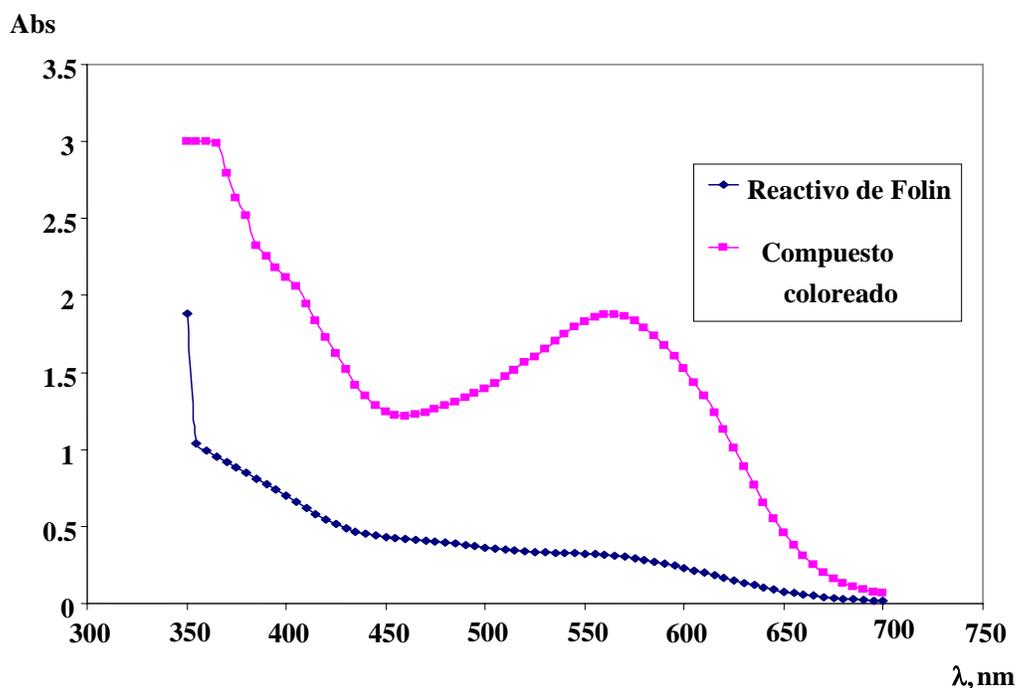


Figura 2: Espectros de absorción UV-VIS del compuesto coloreado y el reactivo de Folin

Influencia de algunos parámetros que intervienen en el proceso de formación del compuesto coloreado.

La matriz y la absorbancia correspondiente a las corridas experimentales del diseño 2^{5-2} empleado para ajustar condiciones de trabajo, se muestran en la tabla siguiente:

Tabla 10: Matriz y resultados de la absorbancia en el diseño 2⁵⁻²

Número de experimentos	X ₁ nitrometano	X ₂ Na ₂ CO ₃	X ₃ Tiempo de contacto	X ₄ R. Folin	X ₅ Tiempo de medición	Abs
1	-1	-1	-1	-1	1	0.255
2	1	-1	-1	1	1	0.971
3	-1	1	-1	1	-1	0.402
4	1	1	-1	-1	-1	1.398
5	-1	-1	1	1	-1	0.357
6	1	-1	1	-1	-1	1.488
7	-1	1	1	-1	1	0.298
8	1	1	1	1	1	1.099

El procesamiento estadístico del diseño referido fue realizado aplicando el programa statgraphic plus versión 5.0 y los resultados se relacionan en el anexo 1. Del análisis de varianza se deriva que el nitrometano, el tiempo de medida y la cantidad del reactivo de Folin influyen significativamente sobre la absorbancia. Es de destacar la alta influencia del nitrometano, lo que demuestra que la concentración de la especie colorada es proporcional a la cantidad de este.

La mejor combinación de las variables en el diseño investigado aparece en la tabla 11

Tabla11: Condiciones seleccionada del diseño 2⁵⁻²

Sustancia	Nivel	Cantidad, mL
Na ₂ CO ₃	NS	4
Tiempo de contacto	NS	10
R. Folin	NI	5
Tiempo de medición	NI	7

Por otra parte a partir del análisis de regresión se obtiene la ecuación matemática que representa el modelo:

$$\text{Abs} = 0.745 + 0.421.V \text{ (NM)} + 0.0262.V \text{ (Na}_2\text{CO}_3\text{)} + 0.0312 * t_{\text{contact}} - 0.0661.V \text{ (R. Folin)} - 0.118 * t_{\text{medición}}.$$

puede ser eliminado del modelo, si se toma en cuenta que para un nivel de confiabilidad $\geq 90\%$ esta variable no influye significativamente en la absorbancia.

Posteriormente se procedió a confeccionar las curvas de calibrado en dos rangos, con los niveles de las variables que aparecen en la tabla 11.

Curva de calibrado

Después de haber seleccionado las condiciones de trabajo se procedió a la confección de la curva de calibrado obteniéndose los siguientes datos, tabla 12. El resultado del tratamiento estadístico se muestra en el anexo 2 y la tabla 13.

Tabla 12: Datos primarios del estudio de linealidad

(NM), ppm	Abs	f(Abs/C(NM))	Parámetros estadísticos
0-3.6 ppm			$\overline{f(Abs/C)} = 0.109;$ $S=0.0045$
0.0	0.000	0.105	
0.5	0.052	0.108	
1.0	0.108	0.115	
2.0	0.227	0.114	
2.6	0.274	0.107	
3.0	0.321	0.104	
3.6	0.415	0.105	
2-8 ppm			$\overline{f(Abs/C)} = 0.126;$ $S=0.0057$
0.0	0.000	0.130	
2.0	0.260	0.127	
4.0	0.484	0.119	
5.0	0.599	0.135	
6.0	0.809	0.121	
7.0	0.886	0.123	
8.0	0.986	0.130	

Donde:

(NM), ppm-concentración de nitrometano, Abs- absorbancia, F(Abs/C(NM))-función

Tabla 13: Resultados estadísticos de linealidad de la función Abs vs C(NM)

Parámetros	Valor experimental		Criterios de aceptación
	Rango 1 (0- 3.6 ppm)	Rango 2 (2-8 ppm)	
# Total de datos (n)	7	7	-
Coefficiente de correlación (r)	0.998	0.997	$r \geq 0.99$
Pendiente (b)	0.111	0.125	Desigual de cero
S relativa de m (Sm)	0.0033	0.0044	-
C V(m), %	2,97	3,53	$\leq 2 \%$
C V f(y/x) %	4.16	4,57	$\leq 5\%$
$b \pm IC_b$	-0.00344 \pm 0.0056	0.0000479 \pm 0.0372	$b \pm IC_b$ contiene al cero

De la tabla anterior se deriva que las funciones correspondientes a ambos rangos cumplen con los criterios de linealidad correspondientes al coeficiente de variación de la función y al test de proporcionalidad, sin embargo no cumple con el test de significación de la pendiente.

Repetibilidad

Los resultados de la repetibilidad de la técnica se presentan en la tabla siguiente:

Tabla 14: Repetibilidad de la determinación de nitrometano (C (NM) teórica= 3 ppm)

C(NM), ppm	Parámetros estadísticos
2.081	$\overline{C(NM)} = 2.210$ ppm S= 0.084 CV= 3.80% R= 73.67%
2.314	
2.224	
2.116	
2.296	
2.099	
2.224	
2.278	
2.260	

Tabla 15: Repetibilidad de la determinación de nitrometano(C (NM) teórica= 5 ppm)

C(NM)	Parametros estadísticos
3.085	$\overline{C(NM)} = 3.190$ ppm S= 0.108 CV= 3.39% R= 63.74 %
3.175	
3.300	
2.888	

En ambos casos se observa que el coeficiente de variación es superior al criterio establecido para la repetibilidad y el recobrado está por debajo del rango de aceptación correspondiente a la exactitud (39). Por lo anterior se decidió investigar la estabilidad en el tiempo de medición y el completamiento de la reacción.

Estudio de la estabilidad del sistema reaccionante en el tiempo.

Fue investigada la variación de la absorbancia del sistema reaccionante a partir del momento de mezclado de los reactivos, obteniendo los resultados que se muestran en la figura 3

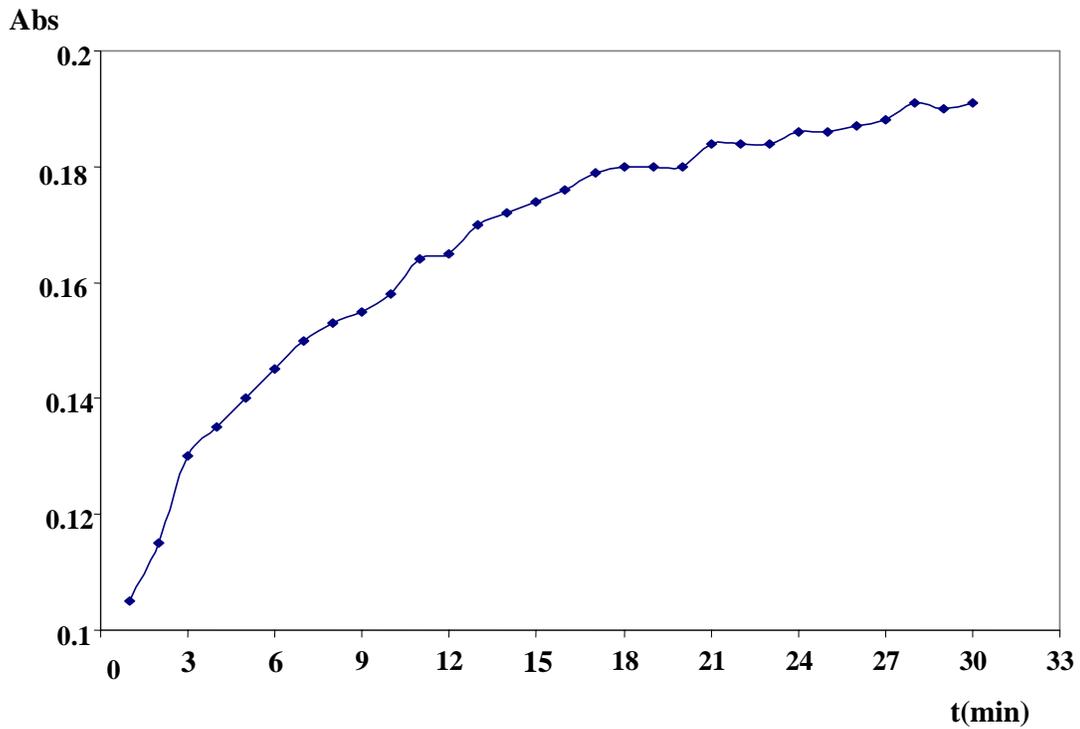


Figura 3: Variación de la absorbancia en el tiempo

El progreso de la reacción corresponde a una función aproximadamente parabólica sin alcanzar valores constantes de la absorbancia en el tiempo, en el período investigado lo que indica que el estado de equilibrio al transcurrir 30 min de mezclados los reactivos aun no se ha alcanzado.

Lo anterior motivó continuar el estudio ampliando el tiempo de medición después de 30 min. En la siguiente figura se representa los valores de absorbancia del sistema, para dos concentraciones diferentes (2 y 4 ppm) en función del tiempo.

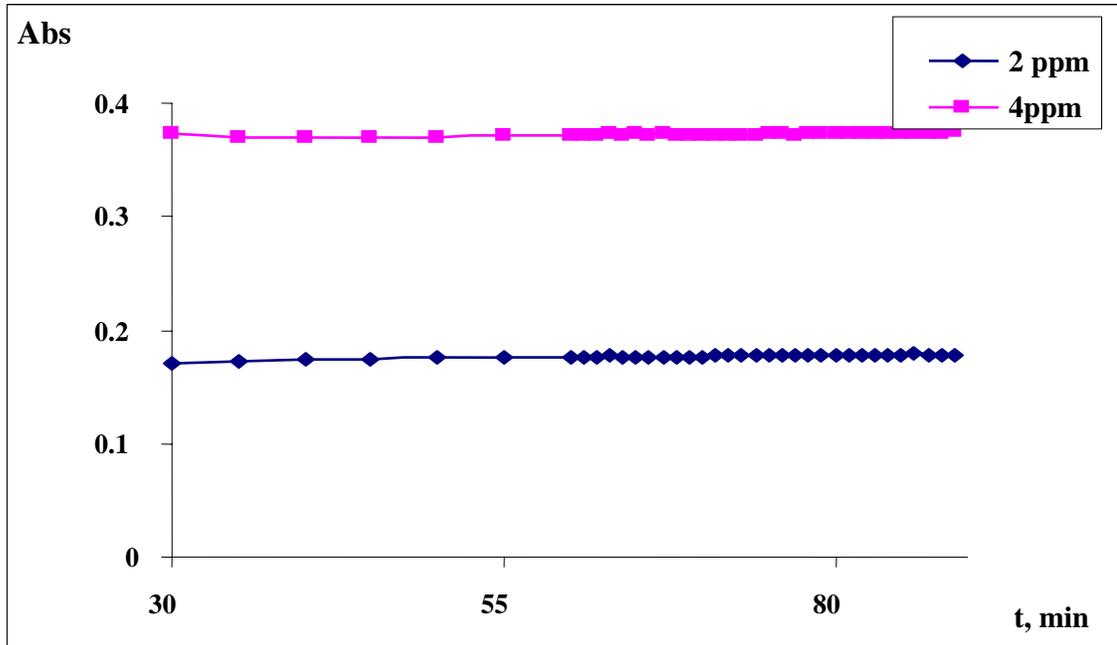


Figura 4: Estabilidad de la medida después de 30 min de mezclado los reactivos.

Como se observa después de transcurridos 50 min el sistema se estabiliza, lo que implicaría un consumo de tiempo prolongado para la ejecución de la técnica. Lo anterior condujo al estudio del completamiento de la reacción y el mejoramiento de la estabilidad del sistema.

Resultados del diseño 2^{4-1}

La matriz y los resultados obtenidos se muestran en la tabla 16 y el tratamiento estadístico en el anexo 3.

Tabla 16: Matriz del diseño 2^{4-1} y resultados de la función respuesta

Polietilenglicol	Acetonitrilo	Na ₂ CO ₃	Tiempo,min	Abs.
-1	-1	-1	-1	0.287
+1	-1	-1	+1	0.285
-1	+1	-1	+1	0.293
+1	+1	-1	-1	0.291
-1	-1	+1	+1	0.257
+1	-1	+1	-1	0.270
-1	+1	+1	-1	0.285
+1	+1	+1	+1	0.272

Del análisis de varianza se obtienen los valores de la probabilidad correspondientes a las variables estudiadas, para un 95 % de confiabilidad. Estos resultaron generalmente son superiores a 0.05 a excepción del correspondiente al carbonato de sodio, lo que indica que solo este último influye significativamente en la absorbancia del compuesto. En particular el hecho de que el tiempo de medida no resulte significativo estadísticamente permitió tomar el nivel inferior del diseño aplicado (30 min), logrando disminuir el tiempo de ejecución de la técnica empleada. Las condiciones seleccionadas se resumen en la siguiente tabla 17.

Tabla 17: Condiciones seleccionadas

Variable	Nivel	Cantidad
Polietilenglicol (6000)	NI	2 mL
Acetonitrilo	NS	4 mL
Na ₂ CO ₃	NI	3 mL
Tiempo de medida	NI	30 min

La ecuación del modelo obtenido del análisis de regresión fue el siguiente:

$$A = 0.28 + 0.00525.V (\text{Acetonitrilo}) - 0.009.V (\text{Na}_2\text{CO}_3) - 0.0005.V(\text{Polietilenglicol}) - 0.00325. \text{ tiempo}$$

Se destaca el bajo valor del coeficiente del polietilenglicol en correspondencia con su influencia mínima sobre la absorbancia. Este factor puede ser eliminado del modelo, si se toma en cuenta que para un nivel de confiabilidad $\geq 90\%$ esta variable no influye significativamente en la absorbancia.

Una vez seleccionadas las nuevas condiciones de trabajo se procedió a obtener la curva de calibrado correspondiente.

3.2 Curva de calibrado en las condiciones del diseño 2⁴⁻¹

La tabla 18 contiene los datos del estudio de linealidad de la técnica. Al realizar el tratamiento estadístico de estos se obtuvieron los resultados que se presentan en la tabla 19 y el anexo 4.

Tabla 18: Datos primarios del estudio de linealidad en el rango de 2-8 ppm

C(NM),ppm	Absorbancia	F(Abs/C(NM))	Parámetros estadísticos
0	0.000	-	$\overline{F(x/y)} = 0.096$ $S = 0.0038$ $CVf = 3.93\%$
2	0.180	0.090	
3	0.301	0.100	
4	0.387	0.097	
5	0.486	0.097	
6	0.570	0.095	
7	0.685	0.098	
8	0.803	0.100	
2	0.176	0.088	
4	0.392	0.098	
7	0.705	0.100	
2	0.176	0.088	
7	0.705	0.100	
2	0.180	0.09	
3	0.301	0.100	
4	0.387	0.097	
5	0.486	0.097	
6	0.570	0.095	
7	0.685	0.098	
8	0.803	0.100	
4	0.390	0.097	
4	0.383	0.096	
4	0.393	0.098	
4	0.404	0.101	
4	0.405	0.101	
4	0.384	0.096	
4	0.389	0.097	
4	0.391	0.098	

Tabla 19: Resultados estadísticos del estudio de linealidad de la función A vs C(NM)

Parámetros	Valor experimental	Criterio
# Total de datos (n)	28	-
Coefficiente de correlación (r)	0.999	$r \geq 0.99$
Pendiente (b)	0.0993	Desigual de cero
S relativa de b (Sm)	0.0101041	-
C V(m), %	1.03	$\leq 2 \%$
C V f(y/x) %	3.93	$\leq 5\%$
$b \pm ICb$	-0.00149173 ± 0.01	$b \pm ICb$ contiene al cero

Los datos anteriores demuestran la linealidad de la técnica en el rango de 2-8 ppm, ya que se cumple los criterios referidos al coeficiente de variación de la función, el test de significación de la pendiente, y el test de proporcionalidad.

Precisión y exactitud de la técnica

En las tablas 20 y 21 se muestran los datos de la precisión y la exactitud de la técnica.

Tabla 20: Repetibilidad de la determinación de nitrometano

C(NM), ppm	Parámetros estadísticos
4.007	$\overline{C(NM)} = 4.031$ $S = 0.0773$ $CV = 1.92 \%$ $R = 100.77 \%$
3.937	
4.038	
4.148	
4.158	
3.947	
3.998	
4.017	
4.027	

Tabla 21: Reproducibilidad de la determinación de nitrometano

C(NM), ppm	Parámetros estadísticos
4.007	$\overline{C(NM)} = 4.031$ $S = 0.077$ $CV = 1.91\%$ $R = 100.79\%$
3.937	
4.038	
4.148	
4.158	
3.947	
3.997	
4.017	
4.027	
4.007	
3.937	
4.038	

Los resultados anteriores demuestran que la técnica cumple con los parámetros de precisión y exactitud establecidos en las condiciones estudiadas.

La ecuación de regresión lineal corresponde a:

$$\text{Abs} = -0.0147 + 0.101 \cdot \text{CNMppm}$$

Límite de cuantificación de la técnica

En la tabla 22 se muestran los resultados de la precisión y exactitud en los puntos inferiores de la curva.

Tabla 22: Evaluación de la precisión y exactitud en los puntos inferiores de la curva

C(NM), ppm	22.12	28.53	302.40	100.77
n	5	5	6	9
$\overline{C(NM)}, \text{ppm}$	1,840	2.463	3.07	4.031
S	0.029	0.024	0.03	0.077
C.V, %	1.61	0.97	1.22	1.919

Del análisis de los datos de la tabla 22 se deriva que el límite de cuantificación de la técnica es 2.5 ppm.

Estudio de interferencias

En la tabla que aparece a continuación se muestra la matriz del diseño de interferencias, y los resultados estadísticos se presentan en el anexo 5.

Tabla 23: Matriz del diseño y resultados de la función respuesta

X₁(G-O)	X₂(G-1)	X₃(ff)	X₄ (IBA)	X₅(A.Ac.)	X₆(Br⁻)	Abs.
-1	-1	-1	-1	1+	+1	0.005
+1	-1	-1	+1	1-	+1	0.014
-1	+1	-1	+1	1-	-1	0.007
+1	+1	-1	-1	1+	-1	0.015
-1	-1	+1	+1	1+	-1	0.006
+1	-1	+1	-1	1-	-1	0.019
-1	+1	+1	-1	1-	+1	0.006
+1	+1	+1	+1	1+	+1	0.019

El análisis de varianza muestra valores de la probabilidad superiores a 0.05 para 95 % de confianza en todos los casos, de lo que se deriva que las variables estudiadas no influyen estadísticamente sobre la absorbancia del compuesto coloreado, siendo la determinación analítica de nitrometano, por esta vía específica respecto a las interferencias estudiadas. La ecuación de regresión del modelo confirma el análisis anterior

$$\text{Abs} = 0.011375 - 0.000125.V(\text{AACET}) - 0.000375V(\text{Br}^-) + 0.001125.V(\text{Furfural}) + 0.000375.V(\text{G-1}) + 0.005375.V(\text{G-O}) + 0.000125.(IBA).$$

En la tabla que aparece a continuación se presenta la matriz del diseño de otras posibles interferencias, y los resultados estadísticos se ofrecen en el anexo 5.

Tabla 24: Matriz del diseño 2³ y resultados de la función respuesta

X₁(ClO⁻)	X₂(Pi)	X₃(Etanol)	Abs.
-1	-1	-1	0.174
+1	-1	-1	-0.011
-1	+1	-1	0.215
+1	+1	-1	-0.002
-1	-1	+1	0.208
+1	-1	+1	-0.075
-1	+1	+1	0.122
+1	+1	+1	-0.088

Del análisis de varianza se deriva que de las variables estudiadas solamente influye estadísticamente sobre la absorbancia del compuesto coloreado el ión hipoclorito, para $\alpha = 0.05$.

El análisis de interferencias obtenido del tratamiento estadístico de los diseños aplicados se corresponde con el comportamiento espectroscópico de las especies estudiadas en la región UV-VIS, tabla 25 y anexo 6.

Tabla 25: Comportamiento espectroscópico de las especies estudiadas

Especie química	λ max, nm
G-1	372
G-0	350
Piridina	256 (de mediana intensidad, 200 intensa)
CS ₂	320 (de mediana intensidad), 210 -220 intensa)
Furfural	255, 310
Nitrometano	270
Isobutilamina	255, 290
Anhídrido acético	210

Como se observa los máximos de absorción que presentan los mismos están en una región alejada de la longitud de onda de trabajo (565 nm)

3.3 Aplicaciones de la técnica

3.3.1 Determinación de nitrometano en el licor agotado de la separación de G-0 crudo

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 26:

Tabla 26: Resultados de la determinación de nitrometano al licor PIC.

C(NM) g/L	Parámetros estadísticos
645.0	$\overline{C(NM)} = 653.0$ g/L
647.5	S= 6.47
660.0	CV=0.99%
655.0	
657.5	

El contenido de nitrometano en el licor agotado es elevado debido a que este componente además de agente reaccionante es empleado en la síntesis también como disolvente (1).

3.3.2 Aplicación de la técnica a muestras de alcohol del proceso de purificación del G-0

Los resultados del análisis a dos muestras de distintos lotes de este tipo de alcohol se refieren en las tablas 27 y 28 respectivamente.

Tabla 27: lote 1

C(NM) g/L	Parámetros estadísticos
1.13	$\overline{C(NM)}=1.129$ g/L S= 0.003 CV=0.65%
1.14	
1.12	
1.26	
1.28	
1.12	
1.12	

Tabla 28: lote 2

C(NM) g/L	Parámetros estadísticos
1.11	$\overline{C(NM)}= 1.12$ g/L S= 0.01 CV=0.89%
1.13	
1.11	
1.13	
1.13	
1.12	
1.11	
1.11	

Ambos resultados son coincidentes respecto al orden de la magnitud y mucho más bajos, como es de esperar, que los que se presentan en el licor PIC.

3.3.3 Estudio del residual mezclado

Tiempos de retención de los componentes puros

Los tiempos de retención correspondiente a soluciones patrones de nitrometano y los posibles interferentes se muestran en la tabla 29 y los cromatogramas 1-7 en el anexo 7.

Tabla 29: Tiempos de retención de especies químicas de interés.

Compuesto	Tiempo de retención, min
NM	6.05
Piridina	6.05
Disulfuro de carbono	5.082
Furfural	5.850
G-O	6.782
Anhídrido acético	6.017
G-1	9.417

Los tiempos de retención de los componentes puros evidencian que la señal del nitrometano puede quedar enmascarada por la presencia de piridina, anhídrido acético y furfural.

Registro del cromatograma del residual mezclado pretratado

El cromatograma del residual mezclado pretratado muestra tres señales de diferente intensidad; la primera es próxima a los tiempos de retención del nitrometano, piridina, anhídrido acético, furfural y CS₂, mientras la segunda y la tercera son cercanas al tiempo de retención del G-O puro en las condiciones estudiadas, figura 5.

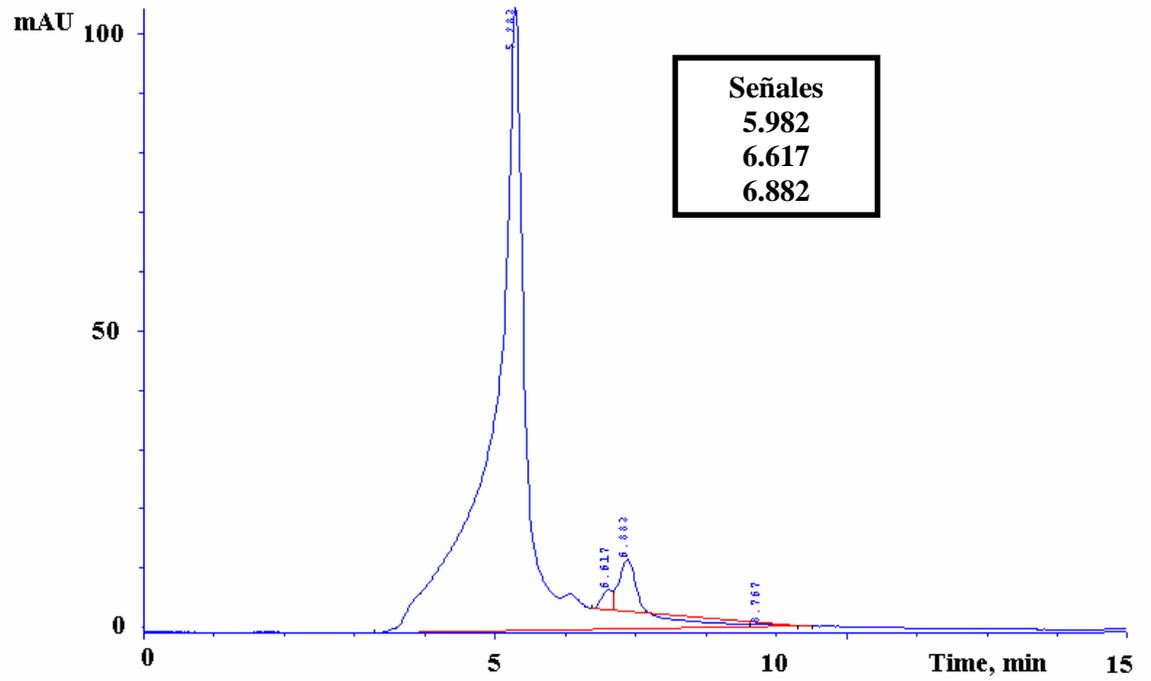


Figura 5: Cromatograma del residual de mezclado pretratado.

Estudio del residual mezclado con tratamiento primario

Una vez que el residual es sometido al tratamiento primario se repitió el cromatograma por HPLC con los siguientes resultados:

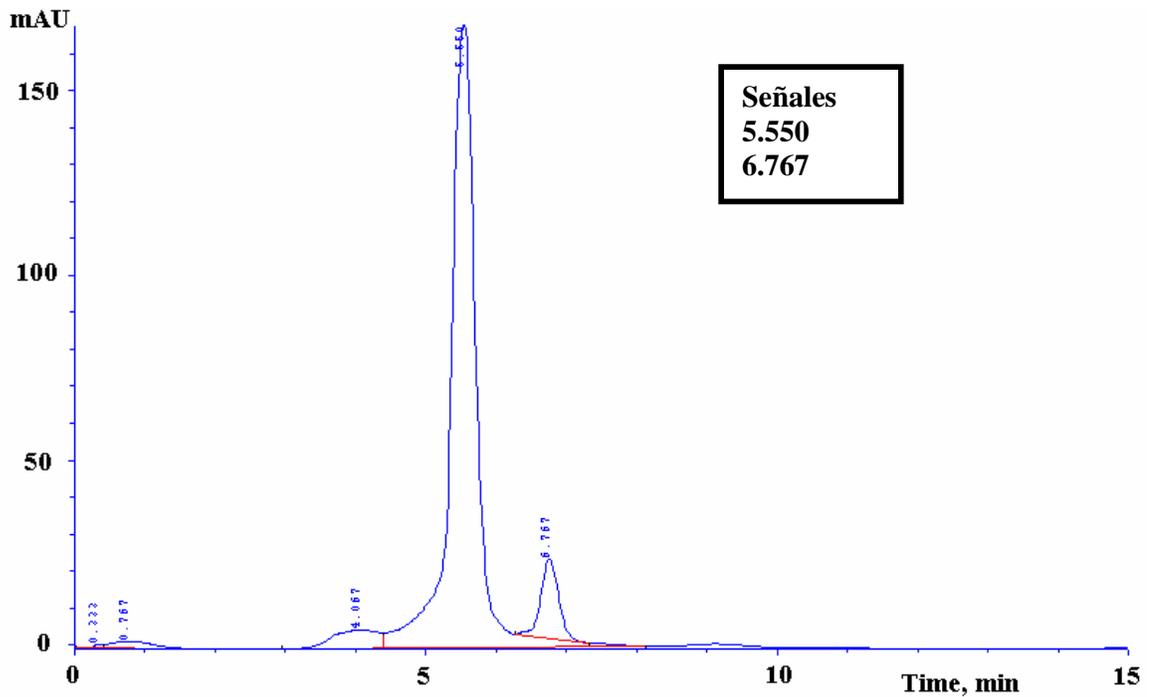
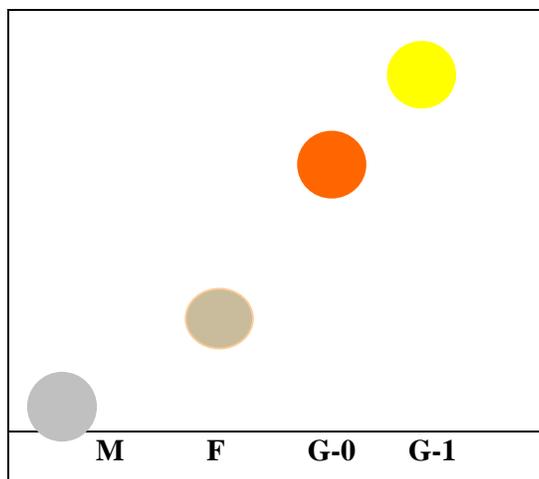


Figura 6: Cromatograma del residual compuesto con tratamiento primario.

Como se observa el cromatograma del residual con tratamiento primario refleja una matriz de menor complejidad que el anterior respecto a los componentes de tiempos de retención superiores a 5.

El esquema 3 representa el cromatograma de capa delgada en las condiciones cromatográficas ya descritas y los Rf de los patrones en la tabla 30.



Esquema 3: Cromatograma de CD del residual mezclado con tratamiento primario.

Tabla 30: RF de los patrones con el sistema de solventes: cloroformo –CCl₄

Compuesto químico	Rf (CCD)
G-1	0.72
furfural	0.38
G-O	0.62

Al correr el cromatograma no se observa desplazamiento de la muestra a diferencia de los patrones, por lo que no resultan detectables por esta vía las impurezas ensayadas. El G-0 se encuentra por debajo de 0.014 ppm, según el límite de detección por CCD, determinado por Rodríguez Z. y colaboradores (18).

El espectro UV del residual mezclado después del tratamiento primario muestra el sistema de señales características de la piridina, con máximo alrededor de 255 nm (41), figura7:

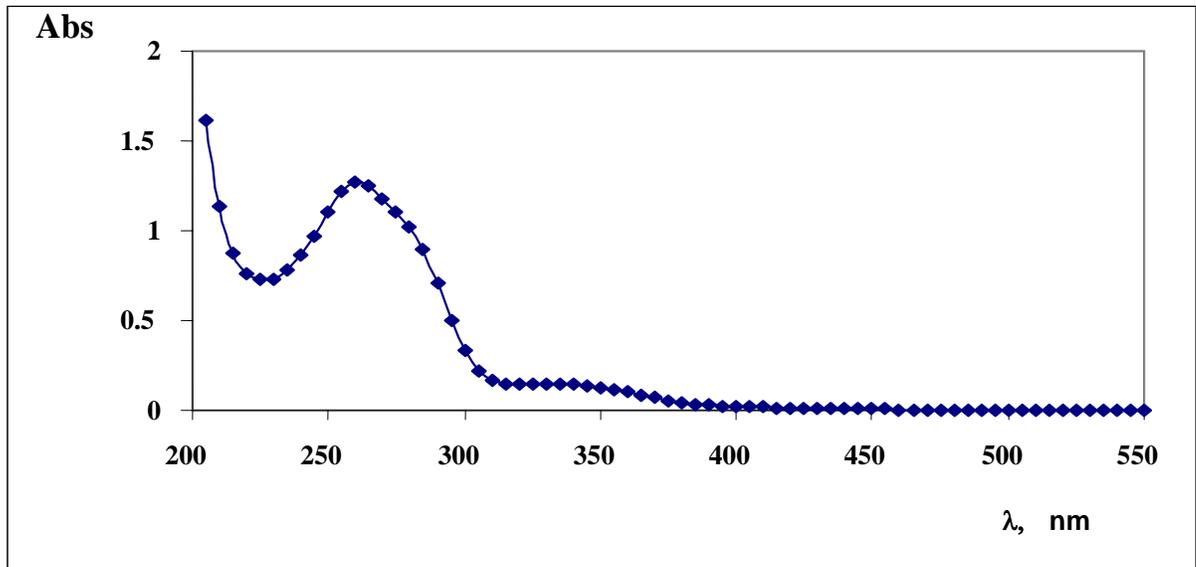


Figura7: Espectro UV del residual con el tratamiento primario

El resultado del ensayo cualitativo realizado para comprobar la probable presencia del ion hipoclorito resultó negativo.

Aplicación de la técnica a la determinación de nitrometano en el residual mezclado con tratamiento primario.

Los resultados del análisis de nitrometano del residual compuesto después del tratamiento primario se muestran en la tabla siguiente:

Tabla 31: Resultados de la determinación de nitrometano en el tratamiento primario.

C(NM) ppm	Resultados estadísticos
20.31	$\overline{C(NM)}=20.58$ ppm S= 0.17 CV=0.87 %
20.81	
20.50	
20.75	
20.55	
20.45	
20.70	
20.70	

Estudio del residual mezclado con tratamiento terciario

En el caso del residual sometido al tratamiento terciario, el cromatograma obtenido mediante HPLC se presenta en la figura 8.

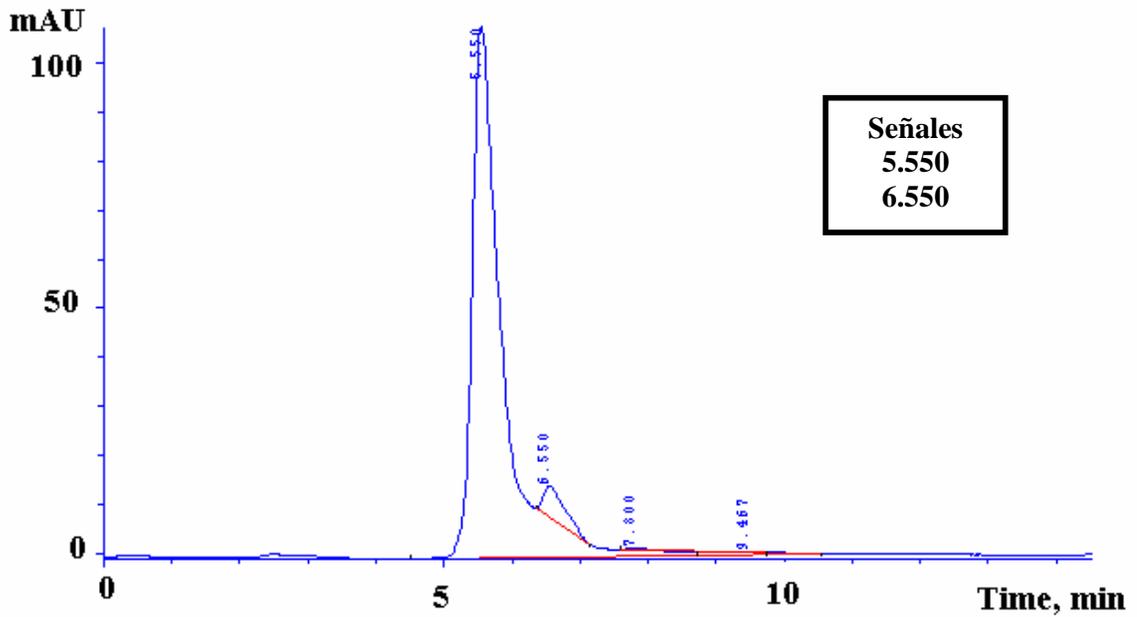


Figura 8: Cromatograma del residual de salida con tratamiento terciario.

Al comparar los cromatogramas representados en las figuras 6 y 8, se observa que se mantienen las señales de los componentes principales, pero con menor intensidad, lo que se corresponde con el proceso de desactivación del residual

El análisis de placa delgada confirma la ausencia de furfural, G-O y G-1 en la muestra, detectable por esta vía.

A continuación se presenta el espectro UV del residual con tratamiento terciario.

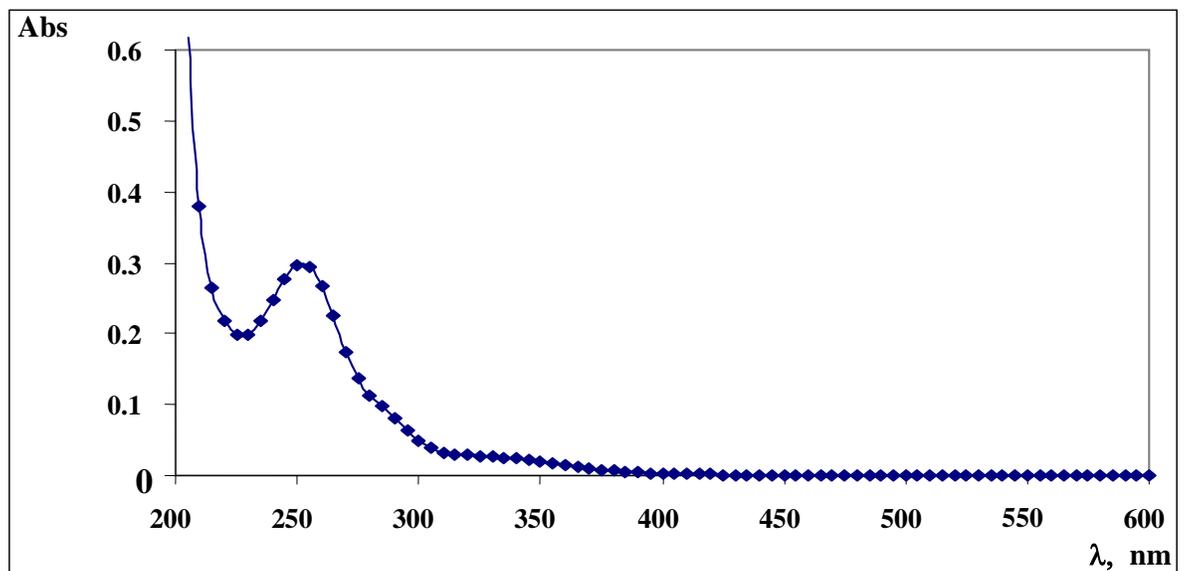


Figura 10: Espectro UV del residual con el tratamiento terciario.

Aplicación de la técnica a la determinación de nitrometano en el residual mezclado con tratamiento terciario

En la tabla 32 presentan los resultados del contenido de nitrometano determinado en el residual después del tratamiento terciario.

Tabla 32: Contenido de nitrometano en el residual con el tratamiento terciario

C(NM) ppm	Parámetros estadísticos
2.58	$\overline{C(NM)} = 2.61\text{ppm}$ S= 0.02 CV=0.82%
2.59	
2.60	
2.61	
2.62	
2.64	
2.63	

Como se observa la concentración de nitrometano disminuye durante el proceso de desactivación resultando inferior a 3ppm en la muestra investigada.

Evaluación económica

El costo para una determinación sencilla de nitrometano tomando en consideración los gastos energéticos, materias primas, y salarios se resume en la tabla siguiente.

Tabla 33: Evaluación económica de la técnica.

Reactivos	Costo para una determinación en (MLC)	Costo para 3 muestras	Costo para 3 patrones	1blanco	∑ en (MLC)
etanol	3.34	-	-	-	3.34
nitrometano	0.37	1.11	1.11	-	2.22
acetoniitrilo	0.4	1.2	1.2	1.2	3.6
carbonato de sodio	0.0010	0.003	0.003	0.003	0.009
propilenglicol	0.50	1.15	1.15	1.15	3.45
Reactivo de Folin	0.038	0.114	0.114	0.114	0.34
Total					12.95
Energía	Costo en (MN) \$				∑ en (MN)
espectrofotómetro	0.09				0.09
Balanza analítica	0.00005				0.00005
computadora	0.0012				0.0012
Salario de un técnico de laboratorio	Lo que gana en un día de trabajo (8h)				
394 \$	16.41 \$	4.10 \$			
Total en (MN)					4.12

- MLC. Moneda libremente convertible
- MN. Moneda nacional

El costo para una determinación que incluye la realización de al menos tres réplicas de cada análisis y el patrón correspondiente asciende a 12.95 en MLC y a 4.12 en MN.

Los datos anteriores demuestran que la técnica resulta relativamente barata comparado con el costo promedio de un análisis por HPLC que no es inferior a los 25 pesos en MLC.

Conclusiones

1. La técnica analítica desarrollada para la determinación cuantitativa de nitrometano, basada en la interacción de la sal sódica del ácido 1,2-naftoquinona-4-sulfónico con nitrometano en medio básico, requiere de las siguientes condiciones de trabajo: $\lambda=565\text{nm}$, V(polietilenglicol) al 1%, 2mL; V(acetonitrilo) al 5%, 4mL; V(Na_2CO_3) 0.1mol /L ,3mL; V(R, Folin) al 0.05% 5mL.
2. Fueron comprobados los siguientes parámetros que caracterizan a la técnica: precisión, exactitud y linealidad en el rango de 2-8 ppm, siendo el límite de cuantificación de 2.5 ppm.
3. La técnica resulta específica en las matrices estudiadas respecto al G-0, G-1, furfural, anhídrido acético, piridina, isobutilamina, etanol, e iones bromuro siendo necesario comprobar la ausencia de hipoclorito libre que resultó interferente.
4. La técnica fue aplicada a la determinación de nitrometano en el residual parcialmente tratado y tratado, siendo el contenido del mismo en el residual de salida de 2.61ppm, así como a muestras del licor agotado de la síntesis de G-0 y al alcohol de purificación de este principio activo, con un contenido de 653g/L y 1.13g/L respectivamente.

Recomendaciones:

- 1) Escribir el procedimiento normativo de la técnica desarrollada en el trabajo para su posterior aplicación en el control analítico de nitrometano en residuales de La Planta de Producción de Bioactivos Químicos.
- 2) Ampliar la aplicación de la técnica de cuantificación de nitrometano a otras muestras del proceso productivo de G-1.

Bibliografía:

1. Castañedo Cancio, N.; Goizueta, R. y otros. Patente de invención: “Obtención y acciones como microcida del G-1”, concedida en Cuba No.2246, Japón No.3043003 y No.2875969, Canadá No.2 147 594, Europa No.95500056.
2. Decreto ley 200. gaceta oficial de la República de Cuba edición ordinaria, La Habana, año XCVII número 83 :1339, 23 de diciembre (1999).
3. Castañedo Cancio, N.R, Goizueta, R.D., González, O. y otros, Procedure for the obtention of 1-(5-bromophur-2-il)-2 bromo-2-nitroethane and its action as microcide. European patent office. cu/21.04/cu 4894. application 88500011.8. designated states: at be ch de dk es fr gb gr ie it li lu mc nl pt se (1995).
4. Gaitán Placeres T.E Desarrollo de la tecnología de producción del 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano, (G-1).Universidad Central Marta Abreu de las Villas. Tesis doctoral, (2006).
5. Morrison R.T. Boyd R. N.: “Química Orgánica”, Universidad de New York, Versión en español, 4^{ta} edición. Fondo Educativo Interamericano México: 1275-1276, (1983).
6. Solomon G. “Fundamentals of organic chemistry”. University of South Florida, New York Chichester Brisbane Toronto Singapore .Volumen II, 4^{ta} edición (1998).
7. Perrys R.H., Chilton C. H. y Kirkpatrick S.D. Chemical Engineers Hanboock. Tomo I. 4^{ta} Edición, La Habana , (1967).
8. Henschler, D., D. Reichert and M. Metzler:” Identification of potential carcinogens in technical grade 1,1,1-trichloroethane”. Int Arch Occup Environ Health 47(3): 263-8, (1980).
9. Colectivo de autores. Some Industrial Chemicals. IARC . Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, vol. 77. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer: 529, (2000).
10. Verschueren, K. Hanbook of Environmental Data on Organic Chemicals. VII. Fourth edition. A. Wiley- Interscience publication, New York: 1987, (2001).
11. Feigl Fritz and Anger V. “Spot test in organic analysis”. Elsevier Publisher Company, London, New YorK: 68 y 716, (1969).

12. Colectivo de autores. PNMA Programa nacional sobre medio ambiente y desarrollo. Adecuación cubana a la agenda 21 de la ONU. Habana. Cuba, (1993).
13. Krieskov A.P; “Curso de Química Analítica. Análisis Cuantitativo”. Ed. Mir. Publishers. Moscow: 313-322, (1981).
14. Klick, S. and Sköld, A.: “Validation of a generic analytical procedure for determination of residual solvents in drug substances”. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 36(2): 401-09, (2004).
15. Otero, R.; Carrera, G.; Francese, J. y otros: “ Static headspace gas chromatographic method for quantitative determination of residual solvents in pharmaceutical drug substances according to European Pharmacopoeia requirements” . *Journal of Chromatography A*: 1057(1-2): 193-201, (2004).
16. Colectivo de autores: Third Commission Directive 83/514/EEC of 27 September 1983 on the approximation of the laws of the Member States relating to methods of analysis necessary for checking the composition of cosmetic products, (2006).
17. Rodríguez, Z.; Torres, L. K. y otros: “Desarrollo de una técnica combinada por CCD-UV para la cuantificación del 2-(2-nitrovinil)- furano”. Trabajo diploma, (2003).
18. Amarger, N.' y M. Alexander: “ Nitrite Formation from hydroxylamine and Oximes by *Pseudomonas aeruginosa*” .*Journal of Bacteriology*, 95(5): 1651-1657, (1968)
19. Lowry, O. H.; Roberst, N.R.; Wu, M.et-al : “ The quantitative Histochemistry of Brain.II.Enzime measurements” . *J. Biol. Chem.* . 207 (1): 19. (1953).
20. Koarai, A.; Ichinose, M.; Sugiura, H. et-al: “iNOS depletion completely diminishes reactive nitrogen-species formation after an allergic response. *Eur. Respir J*; 20: 609–616, (2002).
21. Chacko, G. K. “Modification of human high density lipoprotein(HDL,) with tetranitromethane and the effect on its binding to isolated rat liver plasma membranes. *Journal of Lipid Research*, 745-754, (1985).
22. Kido, T.; Yamamoto, T.; Soda, K.: “Purification and Properties of Nitroalkane-Oxidizing Enzyme from *Hansenula mrakii*. *Journal of Bacteriology*: 1261-1265, (1976).
23. Williams, J. “The identification of protected tyrosine residues in iron-ovotransferrin. *Biochem.J.* 201:647-651, (1982).

24. Life Science group: “ Dc Protein Assay Instrution Manual:1-19, (1990)
25. Colectivo de autores; “Proceedings of the Oklahoma Academy of Science http://digital.library.okstate.edu/oas/oas_htm_files/V62:80-83_nf.html, (2005)
26. Colectivo de autores “Protein determination by the biuret method “Proteomics and Informatics Services Facility - Spectrophotometric and Colorimetric Determination of Protein concentration. http://digital.library.okstate.edu/oas/oas_htm_files/V62:80_83nf.html (2006).
27. Audo, C. y otros “The en 455-3 modified lowry assay does not yield a reliable estimate of the allergenicity level of latex gloves with low total protein content. journal of experimental and clinical research; 10: 81-86 (2004).
28. Drochioiu, G.; Damoc, N; Przybylski,M “Novel UV assay for protein determination and the characterization of copper-protein complexes by mass spectrometry. Journal of Talanta: 69, 556-564, (2006).
29. Winters, Ana L. Minchin,F. “Modification of the Lowry assay to measure proteins and phenols in covalently bound complexes. Analytical biochemistry, 346: 43-48, (2005).
30. Frazier,R.A “Food Protein Analysis: Quantitative Effects on Processing - R. K. Journal of Food Chemestry, 85: 315 (2004).
31. Ignatovich,O W, Rudolph W. “Compositions and methods for treating inflammatory disorders.Publishes of european patent application (2007).
32. Belakavadi, M Prabhakar, B. T “Purification and characterization of butyrate-induced protein phosphatase involved in apoptosis of Ehrlich ascites tumor.Journal BBA – General subjects.1770: 39-47, (2007).
33. Tenorio-V,M. Barrera, D. Y colaboradores. “Hypothyroidism attenuates protein tyrosine nitration, oxidative stress and renal damage induced by ischemia and reperfusion: effect unrelated to antioxidant enzymes activities. Article <http://www.biomedcentral.com/1471-2369/6/12/prepub> (2005).
34. Harvey, D.: “Modern Analytical Chemistry”. Ist. edition. McGraw-Hill Higher Education. A division of the Mc. Craw Hill Company, ISBN 0-07-237547-7: 385, (2000).
35. Hald, A.: “ Statistical theory with engineering aplications”. John Wiley and Sons, (1952).

36. Freud, J.E.: “ Estadística elemental moderna”. 3a Edición. Editorial Pueblo y Educación: 466, (1983).
37. Comat 99.: “40 Evento Internacional Científico Metodológico de la Matemática y la Computación”, (1999).
38. Masert, D.L.; Semyers-verbeke, J.; Vandeginste, B.: “An Introduction to method validation”. Anal. Magazine (USA), 22(5), M14-M15, (1994).
39. Castro C,M. “Validación de métodos analíticos”. Monografía, Asociación española de Farmacéuticas de la industria, (1990).
40. Calpena Campnam , A.C. “Validación de los Métodos Analíticos “. Universidad de Barcelona, (1990).
41. Jaffé, H.H. and Orchin, M.: “ Theory and aplitaion of ultraviolet spectroscopy”.^a Ediciones Revolucionarias.Instituto cubano del libro. Habana. Cuba (1966).
42. Colectivo de autores: “Nitromethane chemical information. Web page,(2005)
<http://www.chemindustry.com/chemicals/search/N/nitromethane.asp>
43. Colectivo de autores “Nitrometane chemical information .Web page, (2006).
<http://acs.chemindustry.com/chemicals/258073.html>
44. Colectivo de autores: “Rtecs- Registry of Toxic Effects of Chemical. Web page, (2006)
45. Dangerous properties of organic compounds. NIOSH Pocket Guide to Chemical Hazards (www.cdc.gov/niosh/npg/npg.html), (2005).

Anexo 1: Análisis estadístico del primer diseño correspondiente a las condiciones de reacción

Analysis of Variance for Absorb - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:NM	2.84049	1	2.84049	418.41	0.0000
B:Na ₂ CO ₃	0.0109988	1	0.0109988	1.62	0.2319
C:tContact	0.0155938	1	0.0155938	2.30	0.1606
D:R.Folin	0.0700264	1	0.0700264	10.31	0.0093
E:tMedicion	0.224084	1	0.224084	33.01	0.0002
RESIDUAL	0.0678884	10	0.00678884		
TOTAL (CORRECTED)		3.22908	15		

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

The ANOVA table decomposes the variability of Absorb 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 3 P-values are less than 0.05, these factors have a statistically significant effect on Absorb at the 95.0% confidence level.

Tabla de los límites LSD

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

Level	Count	Std. Mean	Lower Error	Upper Limit	Limit
GRAND MEAN	16	0.744906			
NM					
-1	8	0.323562	0.0291308	0.258655	0.38847
1	8	1.16625	0.0291308	1.10134	1.23116
Na ₂ CO ₃					
-1	8	0.718688	0.0291308	0.65378	0.783595
1	8	0.771125	0.0291308	0.706217	0.836033
tContact					
-1	8	0.713688	0.0291308	0.64878	0.778595
1	8	0.776125	0.0291308	0.711217	0.841033
NSulfonato					
-1	8	0.811063	0.0291308	0.746155	0.87597
1	8	0.67875	0.0291308	0.613842	0.743658
tMedicion					
-1	8	0.86325	0.0291308	0.798342	0.928158
1	8	0.626563	0.0291308	0.561655	0.69147

The StatAdvisor

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

Gráficos de los LSD

Gráfico 1
Means and 95.0 Percent LSD Intervals

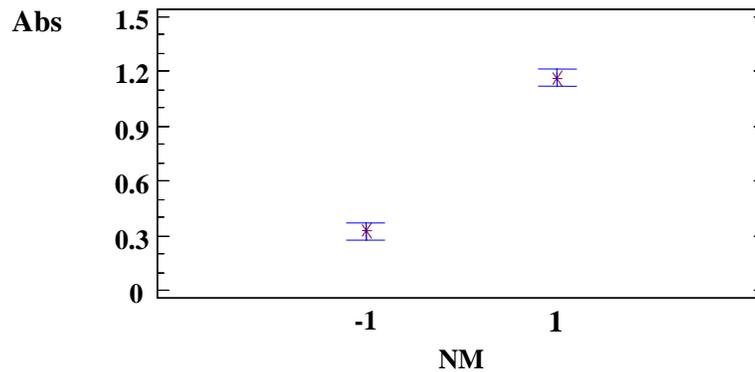


Gráfico 2

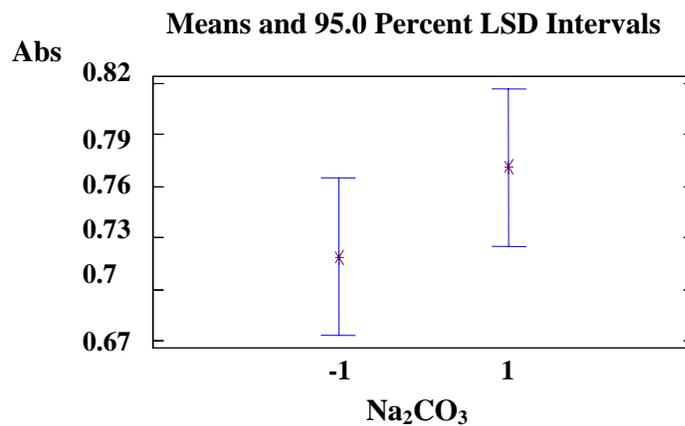


Gráfico 3

Means and 95.0 Percent LSD Intervals

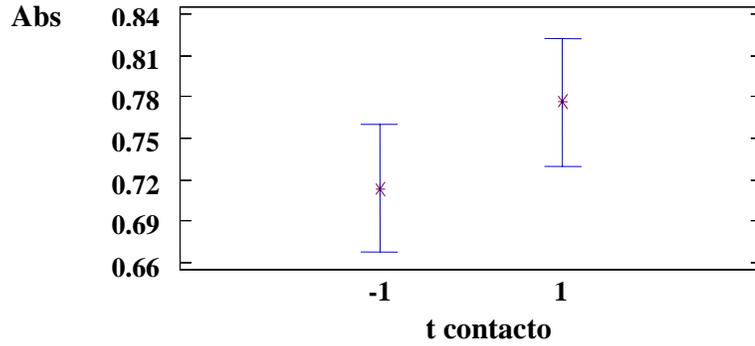


Gráfico 4

Means and 95.0 Percent LSD Intervals

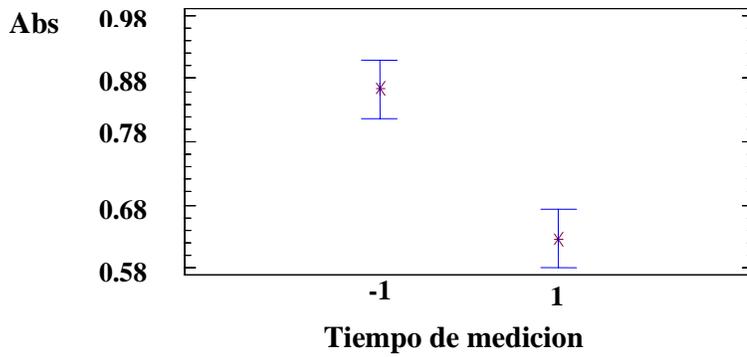
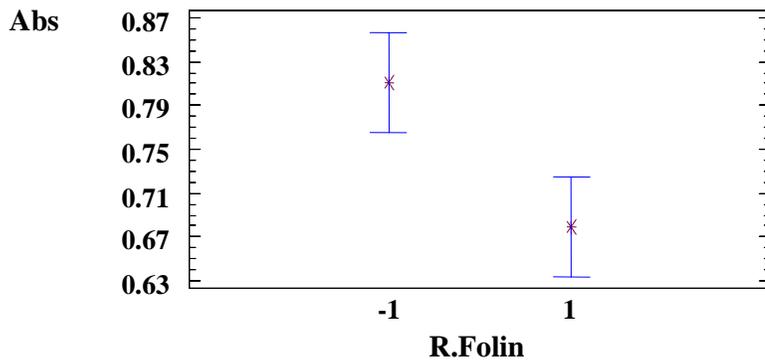


Gráfico 5

Means and 95.0 Percent LSD Intervals



Análisis de regresión múltiple

El polinomio de regresión múltiple es:

$$\text{Absorb} = 0.744906 + 0.421344 \cdot \text{NM} + 0.0262187 \cdot \text{Na}_2\text{CO}_3 + 0.0312188 \cdot \text{tContact} - 0.0661562 \cdot \text{NSulfonato} - 0.118344 \cdot \text{tMediccion}$$

Multiple Regression Analysis

Dependent variable: Absorb

Parameter	Standard Estimate	T Error	Statistic	P-Value
CONSTANT	0.744906	0.0205986	36.1629	0.0000
NM	0.421344	0.0205986	20.455	0.0000
Na ₂ CO ₃	0.0262187	0.0205986	1.27284	0.2319
tcontacto	0.0312188	0.0205986	1.51558	0.1606
R. Folin	-0.0661562	0.0205986	-3.21169	0.0093
t medición	-0.118344	0.0205986	-5.74523	0.0002

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	3.16119	5	0.632238	93.13	0.0000
Residual	0.0678884	10	0.00678884		
Total (Corr.)	3.22908	15			

R-squared = 97.8976 percent

R-squared (adjusted for d.f.) = 96.8464 percent

Standard Error of Est. = 0.0823944

Mean absolute error = 0.0548672

Durbin-Watson statistic = 2.121

The StatAdvisor

The output shows the results of fitting a multiple linear regression model to describe the relationship between Absorb and 5 independent variables. The equation of the fitted model is

$$\text{Abs} = 0.744906 + 0.421344 \cdot \text{NM} + 0.0262187 \cdot \text{Na}_2\text{CO}_3 + 0.0312188 \cdot \text{tcontacto} - 0.0661562 \cdot \text{reactivo de Folin} - 0.118344 \cdot \text{tmedición}$$

Since the P-value in the ANOVA table is less than 0.01, there is a statistically significant relationship between the variables at the 99% confidence level.

The R-Squared statistic indicates that the model as fitted explains 97.8976% of the variability in Absorb. The adjusted R-squared statistic, which is more suitable for comparing models with different numbers of independent variables, is 96.8464%. The standard error of the estimate shows the standard deviation of the residuals to be 0.0823944. 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 0.0548672 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 0.2319, belonging to Na_2CO_3 . 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 Na_2CO_3 from the model.

Anexo 2: Datos estadísticos de las curvas de calibrado en dos rangos.

1. Rango de 0-4 ppm

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

Dependent variable: A1

Independent variable: ppm1

Parameter	Standard Estimate	T Error	Statistic	P-Value
Intercept	-0.00343647	0.00735303	-0.467354	0.6599
Slope	0.111894	0.00333786	33.5227	0.0000

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	0.136829	1	0.136829	1123.77	0.0000
Residual	0.000608792	5	0.000121758		
Total (Corr.)	0.137438	6			

Correlation Coefficient = 0.997783

R-squared = 99.557 percent

Standard Error of Est. = 0.0110344

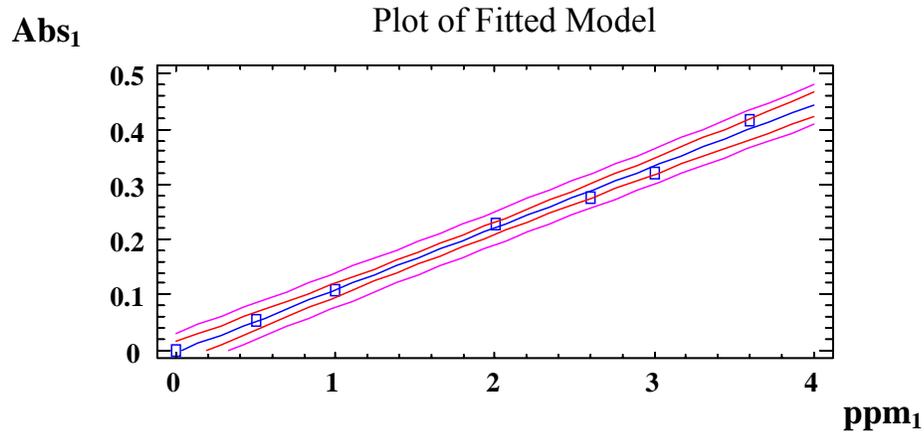
The StatAdvisor

The output shows the results of fitting a linear model to describe the relationship between A1 and ppm1. The equation of the fitted model is

$$\text{Abs}_1 = -0.00343647 + 0.111894 * \text{ppm}_1$$

Since the P-value in the ANOVA table is less than 0.01, there is a statistically significant relationship between A1 and ppm1 at the 99% confidence level.

The R-Squared statistic indicates that the model as fitted explains 99.557% of the variability in A1. The correlation coefficient equals 0.997783, indicating a relatively strong relationship between the variables. The standard error of the estimate shows the standard deviation of the residuals to be 0.0110344. This value can be used to construct prediction limits for new observations by selecting the Forecasts option from the text menu.



Rango de 0-8 ppm

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

Dependent variable: A2

Independent variable: ppm2

Parameter	Estimate	Standard Error	T Statistic	P-Value
Intercept	0.0000479042	0.0234201	0.00204543	0.9984
Slope	0.12574	0.00444873	28.2641	0.0000

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	0.754383	1	0.754383	798.86	0.0000
Residual	0.00472162	5	0.000944324		
Total (Corr.)	0.759105	6			

Correlation Coefficient = 0.996885

R-squared = 99.378 percent

Standard Error of Est. = 0.0307299

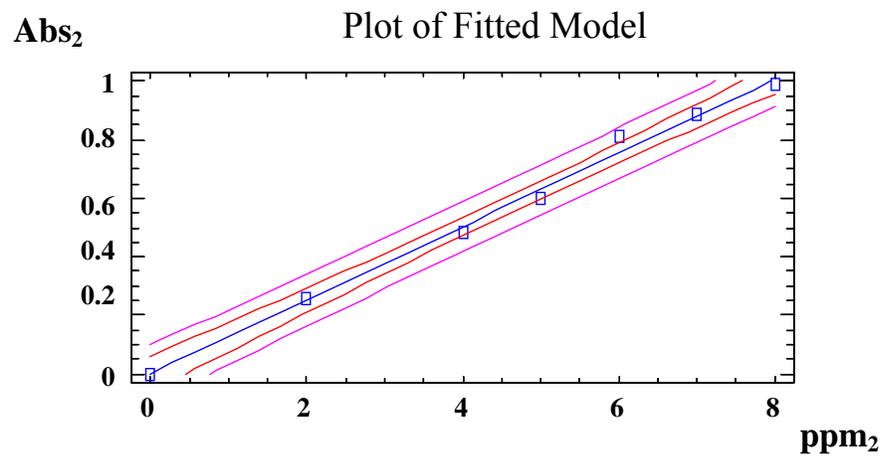
The StatAdvisor

The output shows the results of fitting a linear model to describe the relationship between A2 and ppm2. The equation of the fitted model is

$$A_2 = 0.0000479042 + 0.12574 * \text{ppm}_2$$

Since the P-value in the ANOVA table is less than 0.01, there is a statistically significant relationship between A_2 and ppm_2 at the 99% confidence level.

The R-Squared statistic indicates that the model as fitted explains 99.378% of the variability in A_2 . The correlation coefficient equals 0.996885, indicating a relatively strong relationship between the variables. The standard error of the estimate shows the standard deviation of the residuals to be 0.0307299. This value can be used to construct prediction limits for new observations by selecting the Forecasts option from the text menu.



Anexo 3: Análisis estadístico del diseño 2^{4-1} relativo a condiciones de trabajo

Análisis de varianza del nuevo diseño

Analysis of Variance for A - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:Acetonitrilo	0.0002205	1	0.0002205	5.21	0.1067
B:Na ₂ CO ₃	0.000648	1	0.000648	15.31	0.0297
C:Polietilenglicol	0.000002	1	0.000002	0.05	0.8419
D:tiempo	0.0000845	1	0.0000845	2.00	0.2526
RESIDUAL	0.000127	3	0.0000423		
TOTAL (CORRECTED)	0.001082	7			

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

The StatAdvisor

The ANOVA table decomposes the variability of A 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 A at the 95.0% confidence level.

Análisis de los intervalos LSD

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

Level	Count	Std. Mean	Lower Error	Upper Limit	Limit
GRAND MEAN	8	0.28			
Acetonitrilo					
-1	4	0.27475	0.0032532	0.264397	0.285103
1	4	0.28525	0.0032532	0.274897	0.295603
Na ₂ CO ₃					
-1	4	0.289	0.0032532	0.278647	0.299353
1	4	0.271	0.0032532	0.260647	0.281353
Propilenglicol					
-1	4	0.2805	0.0032532	0.270147	0.290853
1	4	0.2795	0.0032532	0.269147	0.289853
tiempo					
-1	4	0.28325	0.0032532	0.272897	0.293603
1	4	0.27675	0.0032532	0.266397	0.287103

The StatAdvisor

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

Gráficos LSD

Gráfico 1

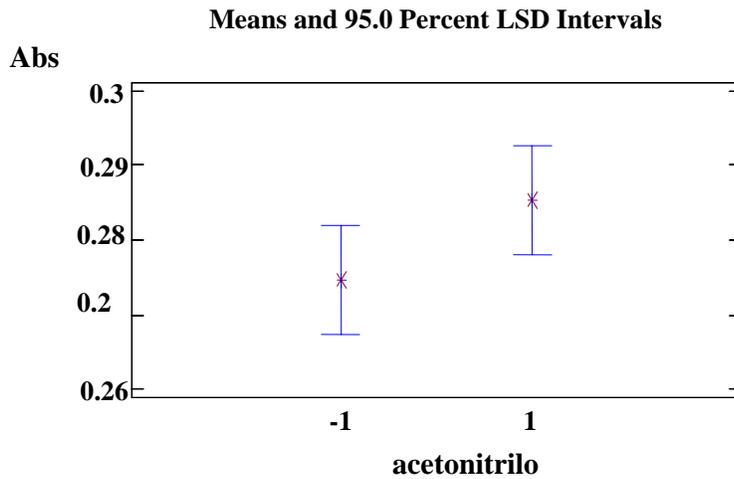


Gráfico 2

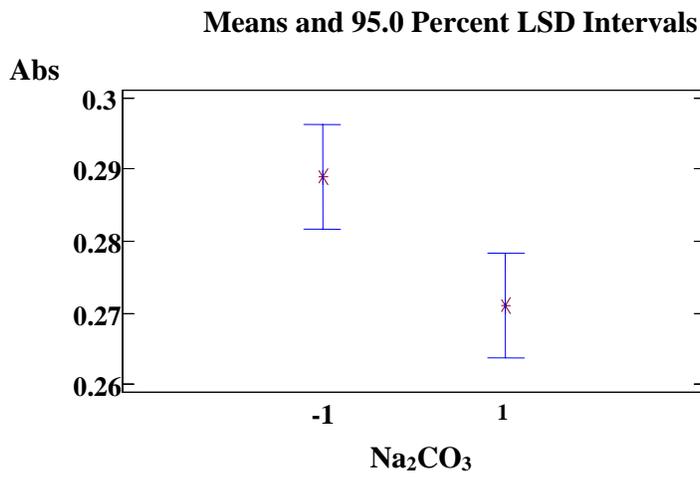
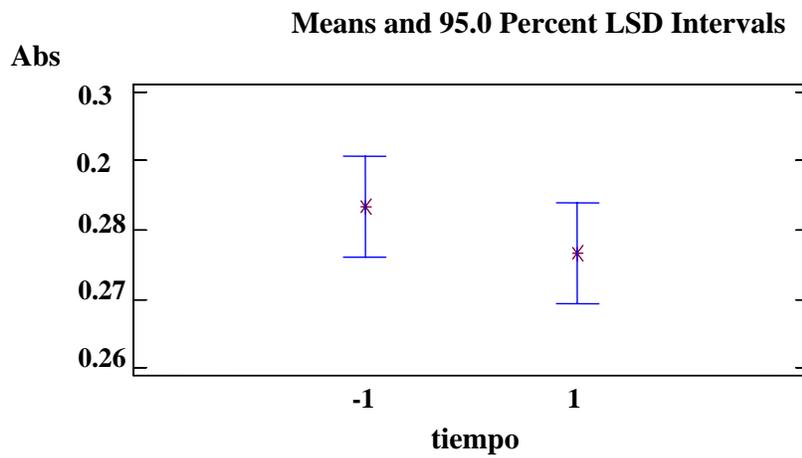
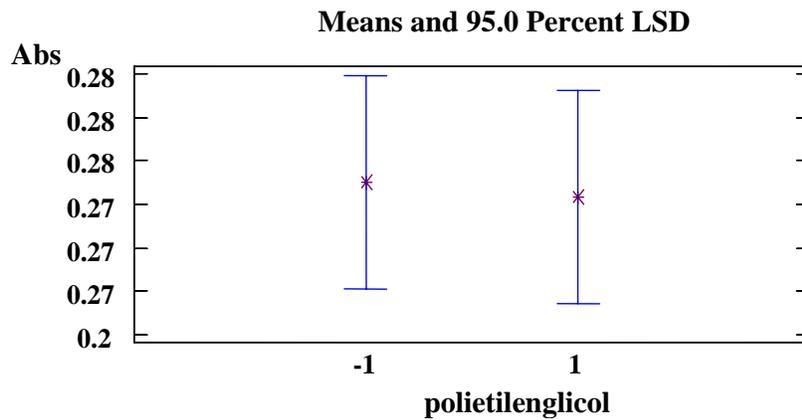


Gráfico 3



Analysis of regression multiple

Multiple Regression Analysis

Dependent variable: A

Parameter	Standard Estimate	T Error	Statistic	P-Value
CONSTANT	0.28	0.00230036	121.72	0.0000
CetNitril	0.00525	0.00230036	2.28225	0.1067
Na2CO3	-0.009	0.00230036	-3.91243	0.0297
PropGli	-0.0005	0.00230036	-0.217357	0.8419
tiempo	-0.00325	0.00230036	-1.41282	0.2526

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	0.000955	4	0.00023875	5.64	0.0935
Residual	0.000127	3	0.0000423333		
Total (Corr.)	0.001082	7			

R-squared = 88.2625 percent

R-squared (adjusted for d.f.) = 72.6124 percent

Standard Error of Est. = 0.00650641

Mean absolute error = 0.00325

Durbin-Watson statistic = 1.55512

The StatAdvisor

The output shows the results of fitting a multiple linear regression model to describe the relationship between A and 4 independent variables. The equation of the fitted model is

$$\mathbf{Abs = 0.28 + 0.00525*acetonitrilo - 0.009*Na_2CO_3 - 0.0005*Polietilenglicol - 0.00325*tiempo}$$

Since the P-value in the ANOVA table is less than 0.10, there is a statistically significant relationship between the variables at the 90% confidence level.

The R-Squared statistic indicates that the model as fitted explains 88.2625% of the variability in A. The adjusted R-squared statistic, which is more suitable for comparing models with different numbers of independent variables, is 72.6124%. The standard error of the estimate shows the standard deviation of the residuals to be 0.00650641. 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 0.00325 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 0.8419, belonging to PropGli. 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 PropGli from the model.

Anexo 4: Resultado estadístico de la curva de calibrado del segundo diseño (2^{4-1})

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

Dependent variable: Abs

Independent variable: CNMpmmm

Parameter	Standard Estimate	T Error	Statistic	P-Value
Intercept	-0.0147193	0.00505213	-2.91347	0.0073
Slope	0.101041	0.00104376	96.8049	0.0000

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	1.09094	1	1.09094	9371.20	0.0000
Residual	0.00302678	26	0.000116415		
Total (Corr.)	1.09397	27			

Correlation Coefficient = 0.998616

R-squared = 99.7233 percent

R-squared (adjusted for d.f.) = 99.7127 percent

Standard Error of Est. = 0.0107896

Mean absolute error = 0.00870455

Durbin-Watson statistic = 2.09982 (P=0.3716)

Lag 1 residual autocorrelation = -0.0860961

The StatAdvisor

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

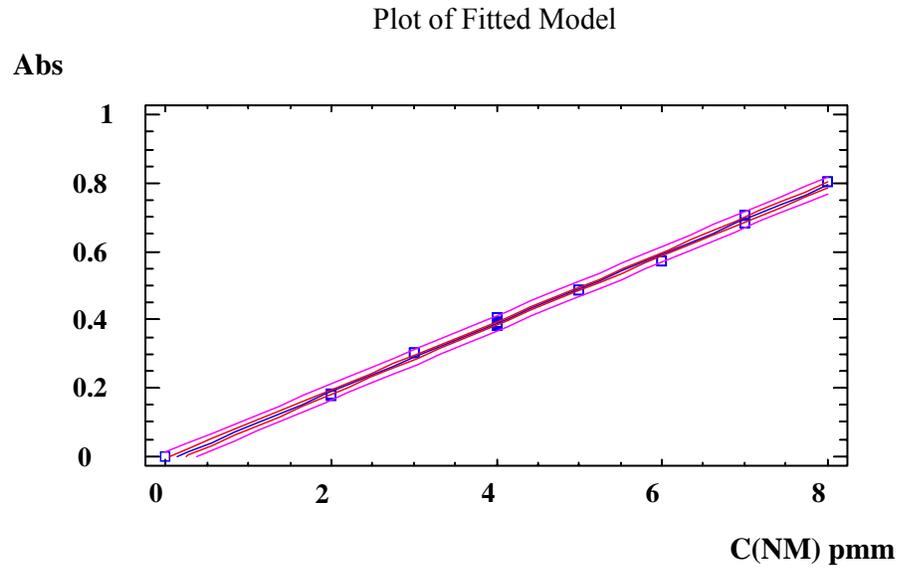
$$\text{Abs} = -0.0147193 + 0.101041 * \text{CNMpmmm}$$

Since the P-value in the ANOVA table is less than 0.01, there is a statistically significant relationship between Abs and CNMpmmm at the 99% confidence level.

The R-Squared statistic indicates that the model as fitted explains 99.7233% of the variability in Abs. The correlation coefficient equals 0.998616, indicating a relatively strong relationship between the variables. The standard error of the estimate shows the standard deviation of the residuals to be 0.0107896. This value can be used to construct prediction limits for new observations by selecting the Forecasts option from the text menu.

The mean absolute error (MAE) of 0.00870455 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 P-value is greater than 0.05, there is no indication of serial autocorrelation in the residuals.



Anexo 5: Análisis estadístico de los diseños de interferencias

1-Diseño 2³

Analysis of Variance for Absorb - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value

MAIN EFFECTS					
A:Etanol	0.00546012	1	0.00546012	4.05	0.1146
B:Hipoclorito	0.100128	1	0.100128	74.19	0.0010
C:Piridina	0.000300125	1	0.000300125	0.22	0.6618
RESIDUAL	0.0053985	4	0.00134962		

TOTAL (CORRECTED)		0.111287	7		

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

The StatAdvisor

The ANOVA table decomposes the variability of Absorb 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 Absorb at the 95.0% confidence level.

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

Level	Count	Std. Mean	Lower Error	Upper Limit	Limit

GRAND MEAN	8	0.067875			
Etanol					
-1	4	0.094	0.0183686	0.0430004	0.145
1	4	0.04175	0.0183686	-0.009249	0.0927496
Hipoclor					
-1	4	0.17975	0.0183686	0.12875	0.23075
1	4	-0.044	0.0183686	-0.094999	0.00699962
Piridina					
-1	4	0.074	0.0183686	0.0230004	0.125
1	4	0.06175	0.0183686	0.0107504	0.11275

The StatAdvisor

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

Gráficos LSD

Gráfico 1

Means and 95.0 Percent LSD Intervals

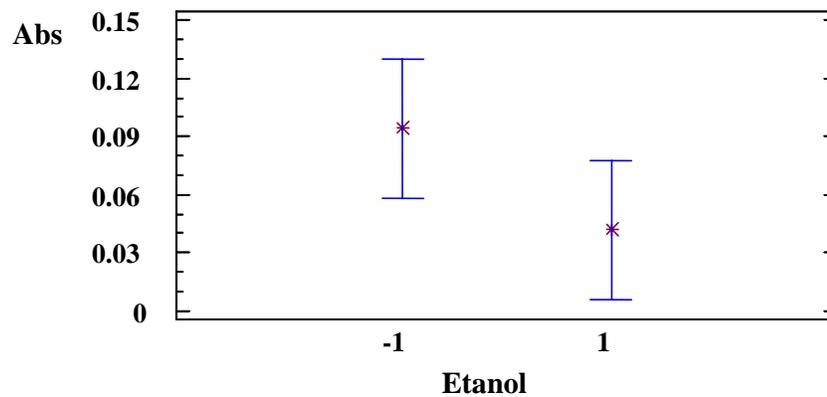


Gráfico 2

Means and 95.0 Percent LSD Intervals

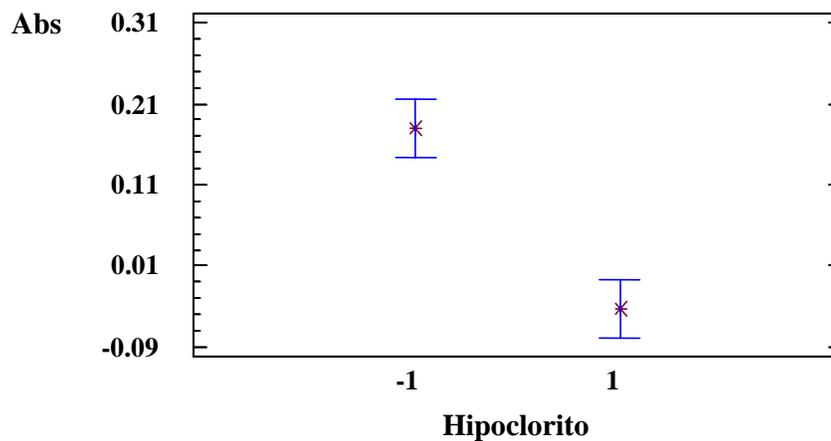
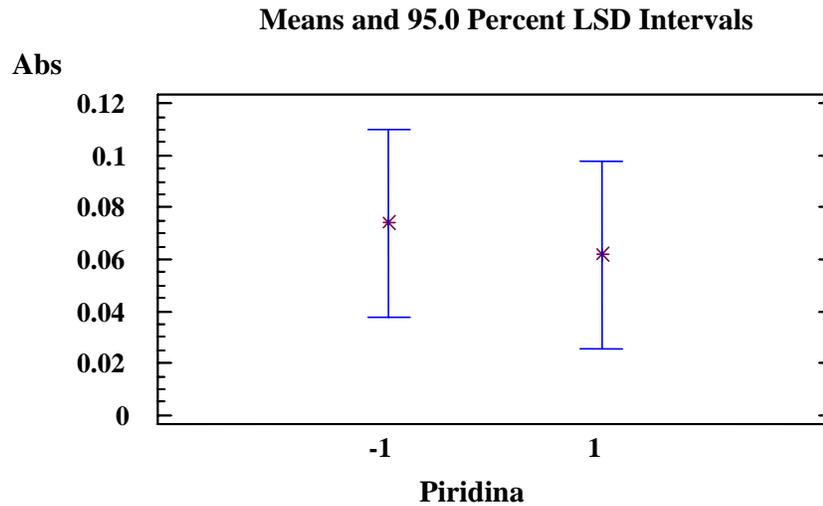


Gráfico 3



Multiple Regression Analysis

Dependent variable: Absorb

Parameter	Standard Estimate	T Error	Statistic	P-Value
CONSTANT	0.067875	0.0129886	5.22575	0.0064
Etanol	-0.026125	0.0129886	-2.01138	0.1146
Hipoclor	-0.111875	0.0129886	-8.61334	0.0010
Piridina	-0.006125	0.0129886	-0.471568	0.6618

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	0.105888	3	0.0352961	26.15	0.0043
Residual	0.0053985	4	0.00134963		
Total (Corr.)	0.111287	7			

R-squared = 95.149 percent

R-squared (adjusted for d.f.) = 91.5108 percent

Standard Error of Est. = 0.0367372

Mean absolute error = 0.0215625

Durbin-Watson statistic = 1.17742 (P=0.0582)

Lag 1 residual autocorrelation = 0.264761

StatAdvisor

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

$$\text{Abs} = 0.067875 - 0.026125 * \text{Etanol} - 0.111875 * \text{Hipoclorito} - 0.006125 * \text{Piridina}$$

Since the P-value in the ANOVA table is less than 0.01, there is a statistically significant relationship between the variables at the 99% confidence level.

The R-Squared statistic indicates that the model as fitted explains 95.149% of the variability in Absorb. The adjusted R-squared statistic, which is more suitable for comparing models with different numbers of independent variables, is 91.5108%. The standard error of the estimate shows the standard deviation of the residuals to be 0.0367372. 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 0.0215625 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 P-value is greater than 0.05, there is no indication of serial autocorrelation in the residuals.

In determining whether the model can be simplified, notice that the highest P-value on the independent variables is 0.6618, belonging to Piridina. 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 Piridina from the model.

2- Diseño 2

Analysis of Variance for Abs - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:ACET	1.25E-7	1	1.25E-7	0.01	0.9296
B:Br ⁻	0.000001125	1	0.000001125	0.11	0.7952
C:Furfural	0.000010125	1	0.000010125	1.00	0.5000
D:G-1	0.000001125	1	0.000001125	0.11	0.7952
E:G-O	0.000231125	1	0.000231125	22.83	0.1313
F:IBA	1.250000000	1	1.250000	0.01	0.9296
RESIDUAL	0.000010125	1	0.000010125		

TOTAL (CORRECTED)	0.000253875	7			

The StatAdvisor

The ANOVA table decomposes the variability of Abs 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 Abs at the 95.0% confidence level.

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

Level	Count	Std. Mean	Error	Lower Limit	Upper Limit
GRAND MEAN	8	0.011375			
A. Acético					
-1	4	0.0115	0.00159099	-0.00871545	0.0317154
1	4	0.01125	0.00159099	-0.00896545	0.0314654
Br					
-1	4	0.01175	0.00159099	-0.00846545	0.0319654
1	4	0.011	0.00159099	-0.00921545	0.0312154
Furfural					
-1	4	0.01025	0.00159099	-0.00996545	0.0304654
1	4	0.0125	0.00159099	-0.00771545	0.0327154
G-1					
-1	4	0.011	0.00159099	-0.00921545	0.0312154
1	4	0.01175	0.00159099	-0.00846545	0.0319654
G-O					
-1	4	0.006	0.00159099	-0.0142154	0.0262154
1	4	0.01675	0.00159099	-0.00346545	0.0369654
IBA					
-1	4	0.01125	0.00159099	-0.00896545	0.0314654
1	4	0.0115	0.00159099	-0.00871545	0.0317154

The StatAdvisor

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

Gráficos LSD

Gráfico 1

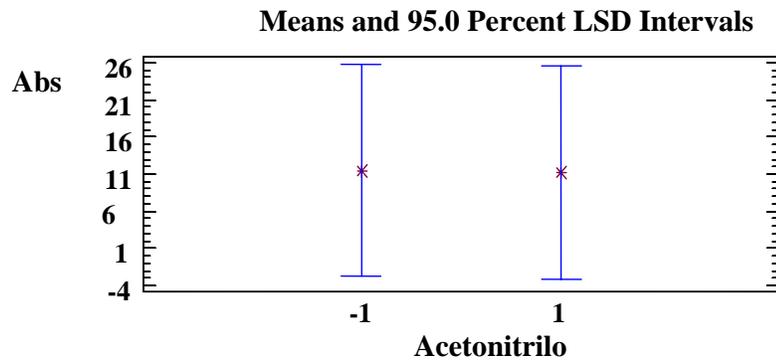


Gráfico 2

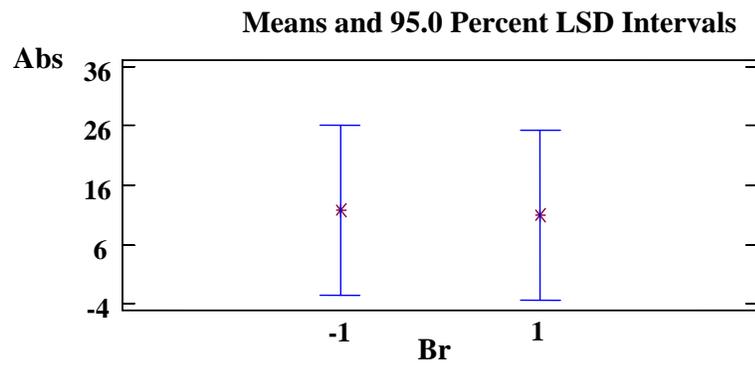


Gráfico 3

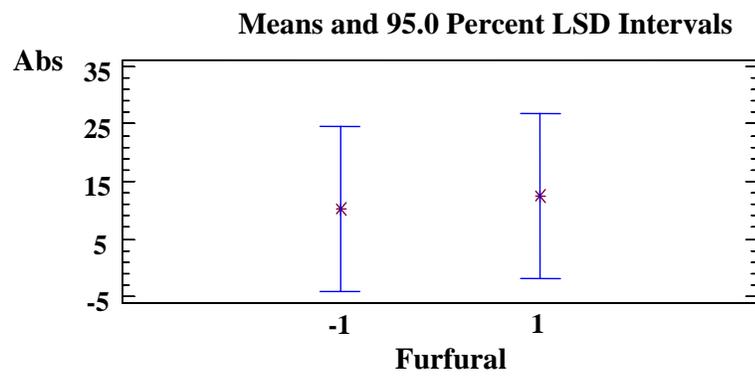


Gráfico 4

Means and 95.0 Percent LSD Intervals

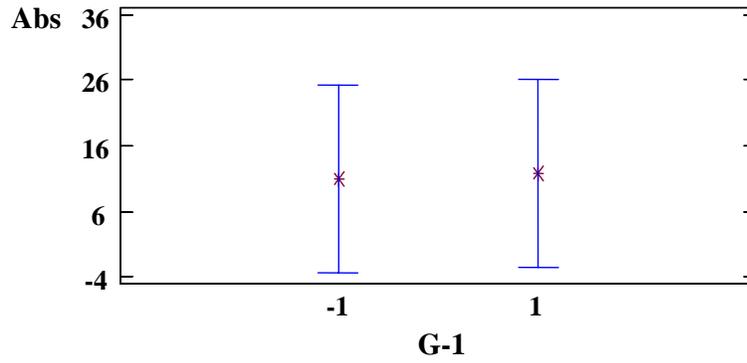


Gráfico 5

Means and 95.0 Percent LSD Intervals

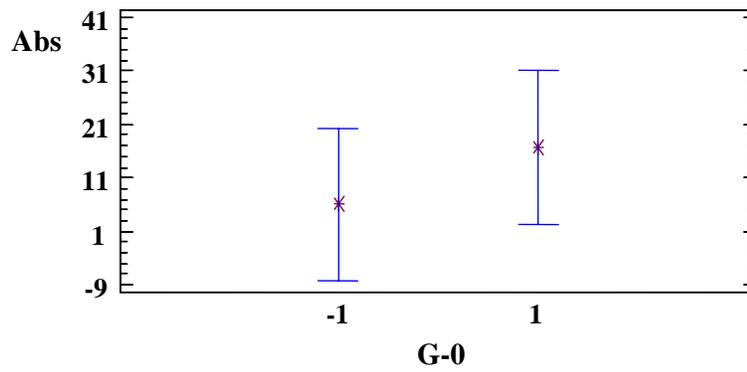
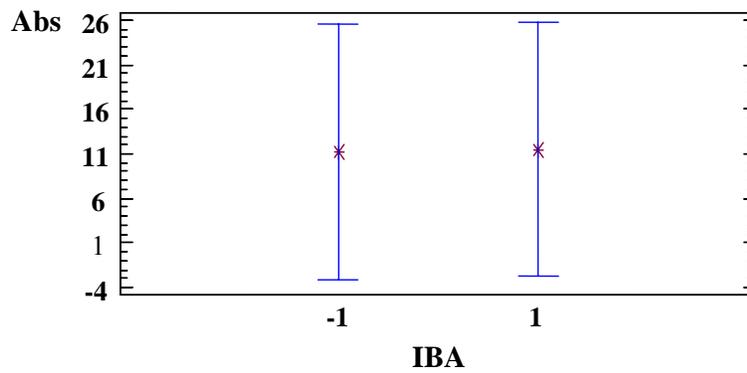


Gráfico 6

Means and 95.0 Percent LSD Intervals



Analysis of regression

Dependent variable: Abs

Parameter	Standard Estimate	T Error	Statistic	P-Value
CONSTANT	0.011375	0.001125	10.1111	0.0628
AACET	-0.000125	0.001125	-0.111111	0.9296
Br	-0.000375	0.001125	-0.333333	0.7952
Furfural	0.001125	0.001125	1.0	0.5000
G-1	0.000375	0.001125	0.333333	0.7952
G-0	0.005375	0.001125	4.77778	0.1313
IBA	0.000125	0.001125	0.111111	0.9296

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	0.00024375	6	0.000040625	4.01	0.3595
Residual	0.000010125	1	0.000010125		
Total (Corr.)	0.000253875	7			

R-squared = 96.0118 percent

R-squared (adjusted for d.f.) = 72.0827 percent

Standard Error of Est. = 0.00318198

Mean absolute error = 0.001125

Durbin-Watson statistic = 3.0

The StatAdvisor

The output shows the results of fitting a multiple linear regression model to describe the relationship between Abs and 6 independent variables. The equation of the fitted model is

$$\text{Abs} = 0.011375 - 0.000125 \cdot \text{AAcético} - 0.000375 \cdot \text{Br} + 0.001125 \cdot \text{Furfural} + 0.000375 \cdot \text{G-1} + 0.005375 \cdot \text{G-O} + 0.000125 \cdot \text{IBA}$$

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.

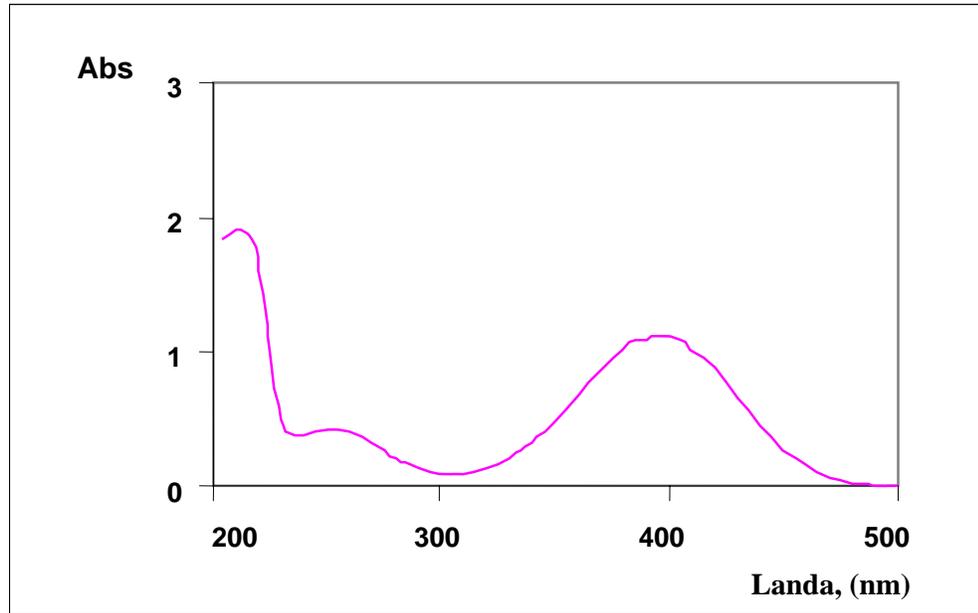
The R-Squared statistic indicates that the model as fitted explains 96.0118% of the variability in Abs. The adjusted R-squared statistic, which is more suitable for comparing models with different numbers of independent variables, is 72.0827%. The standard error of

the estimate shows the standard deviation of the residuals to be 0.00318198. 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 0.001125 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.

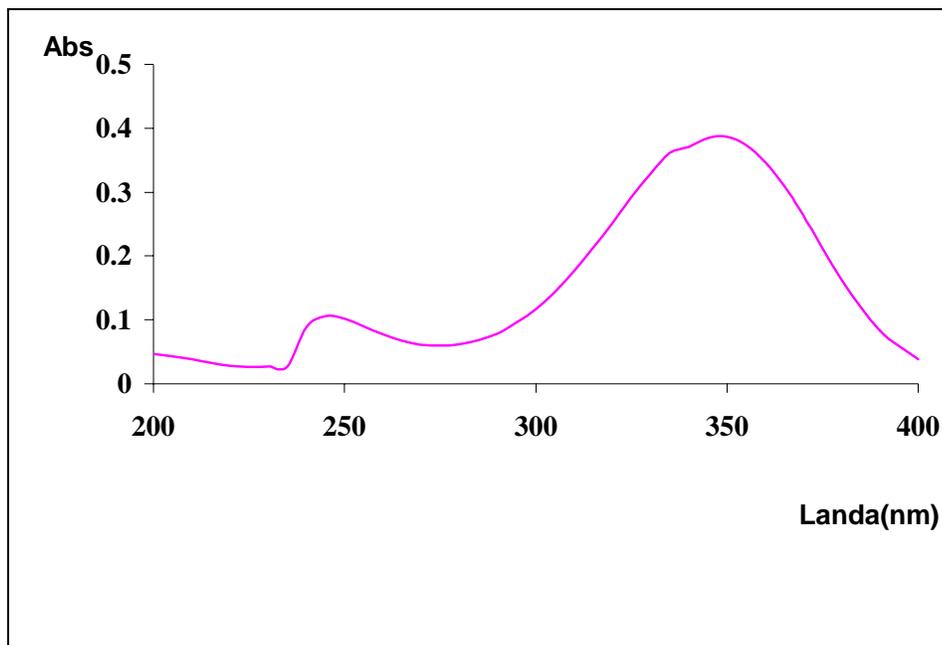
In determining whether the model can be simplified, notice that the highest P-value on the independent variables is 0.9296, belonging to AACET. Since the P-value is greater or equal to 0.10, that term is not statistically significant at the 90% or higher confidence level. Consequently, you should consider removing AACET from the model.

Anexo 6: Espectros de absorción en la región (uv-vis) de los principales componentes del residual mezclado

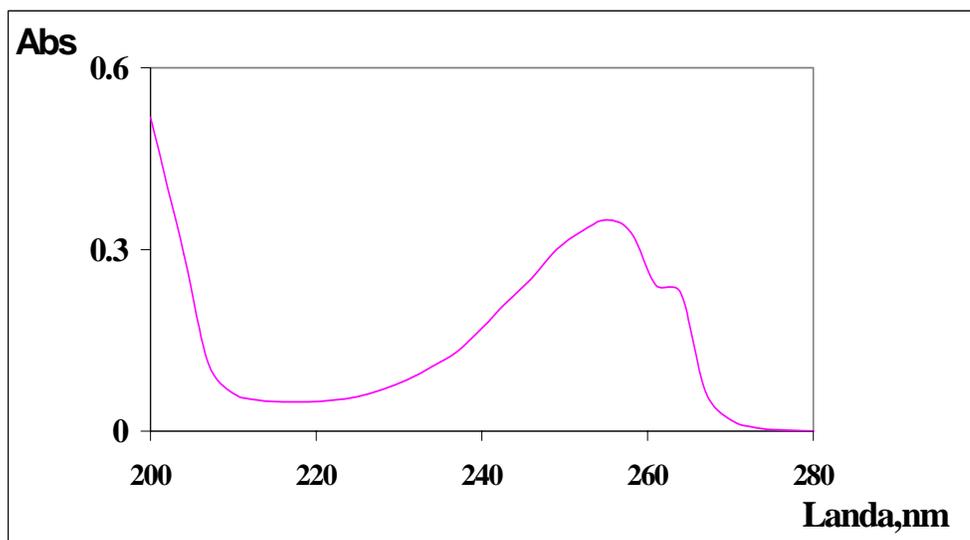
1. G-1



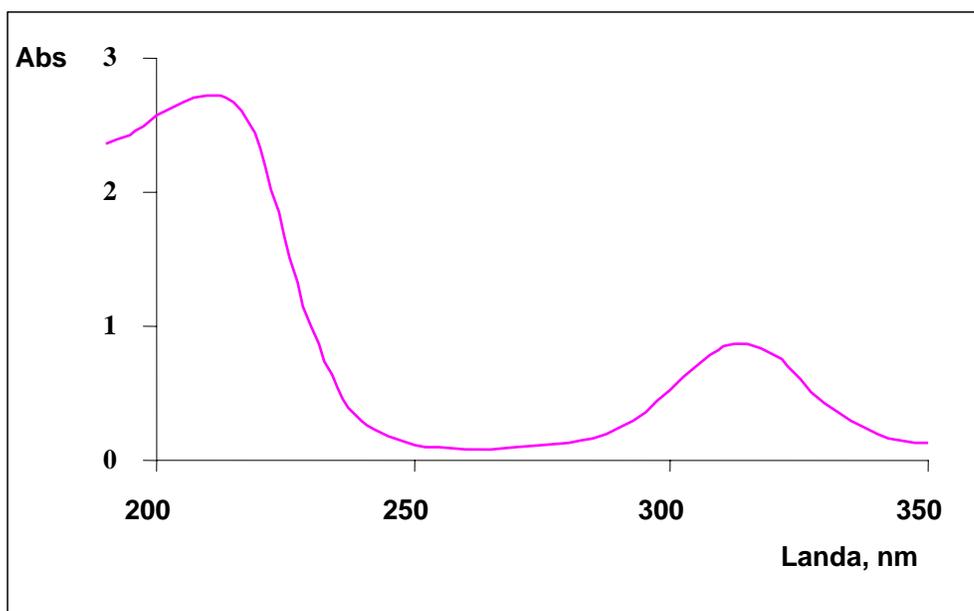
2. G-O



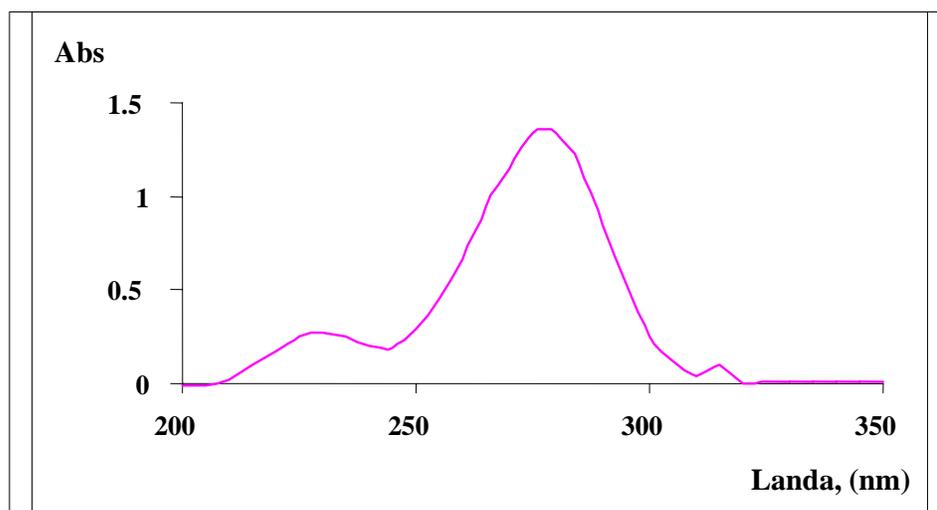
3. Piridina



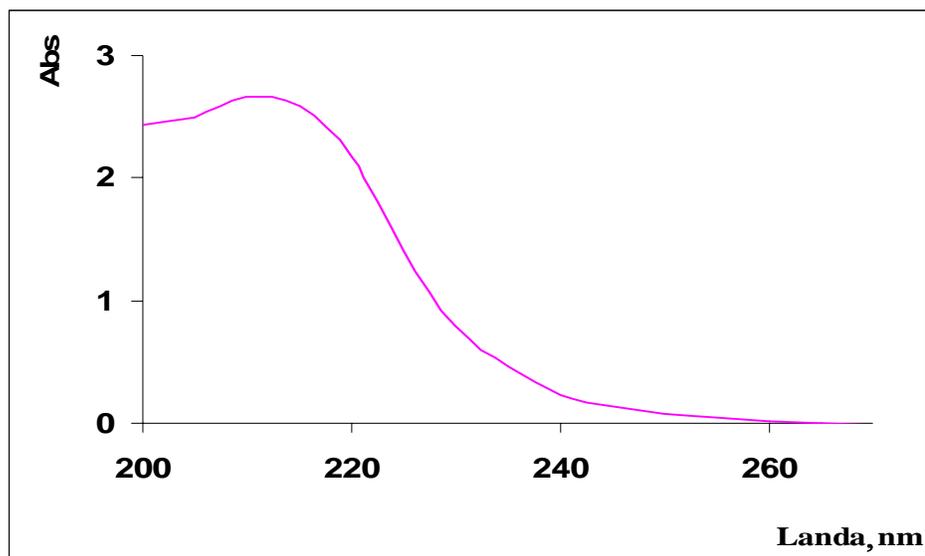
4. Disulfuro de carbono



5. Furfural

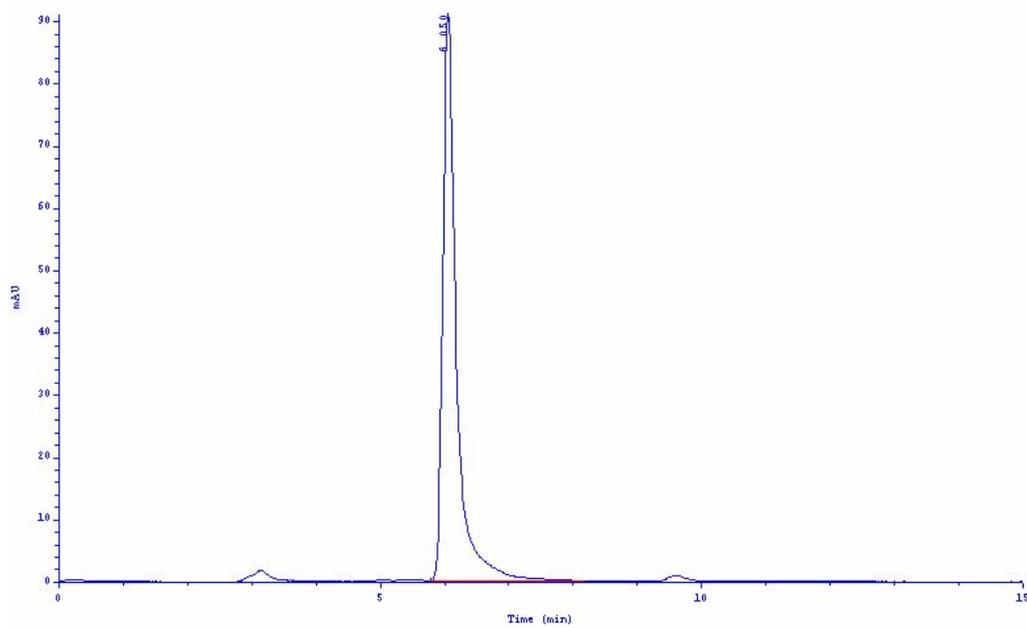


6. Anhídrido acético

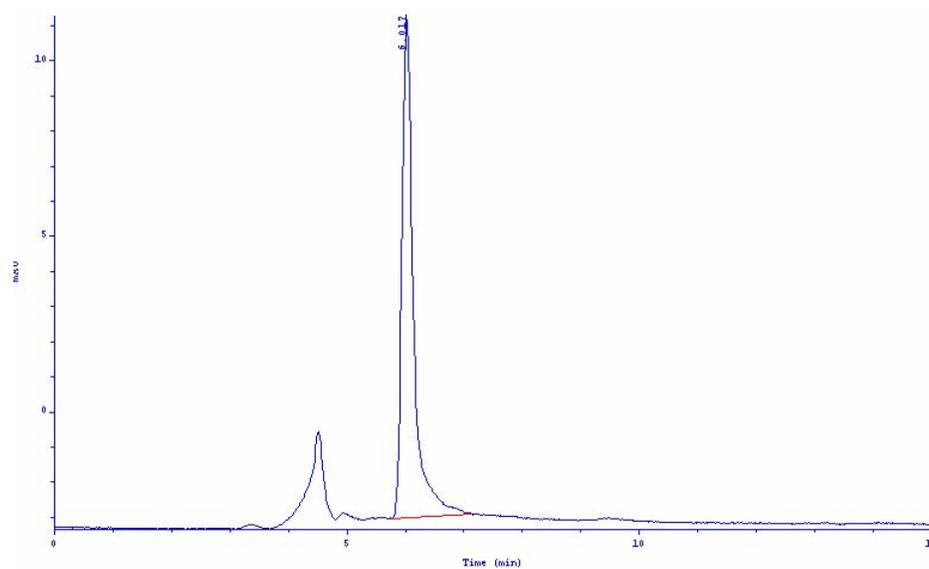


Anexo 7: Cromatogramas de las especies químicas estudiadas por HPLC

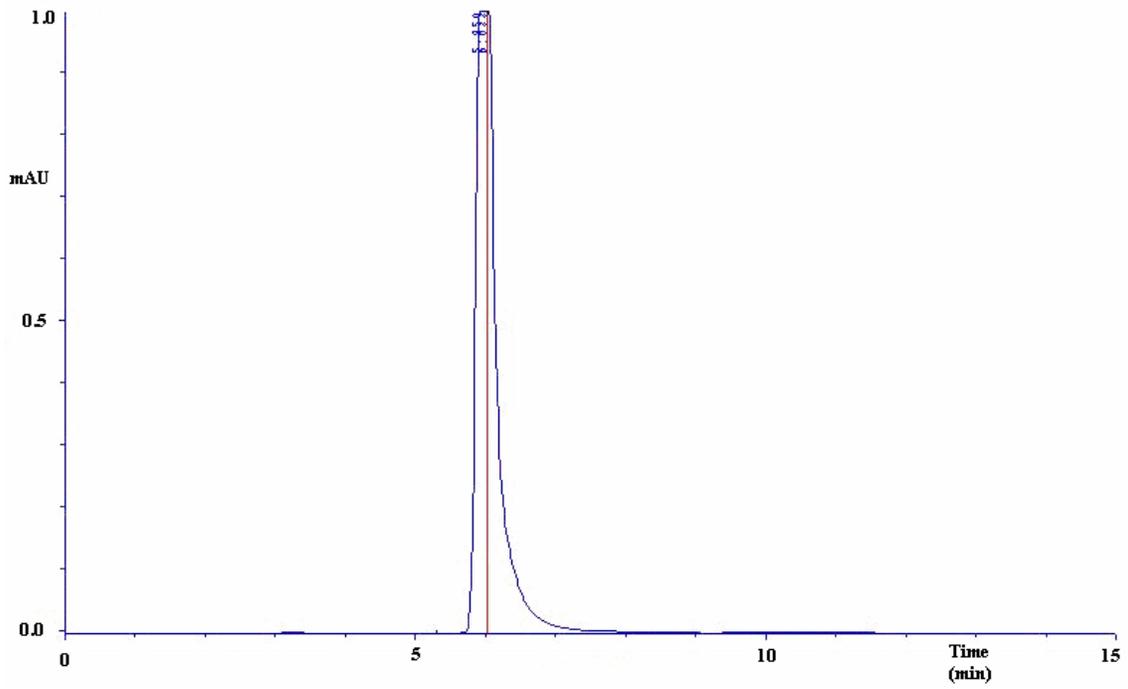
1. Piridina



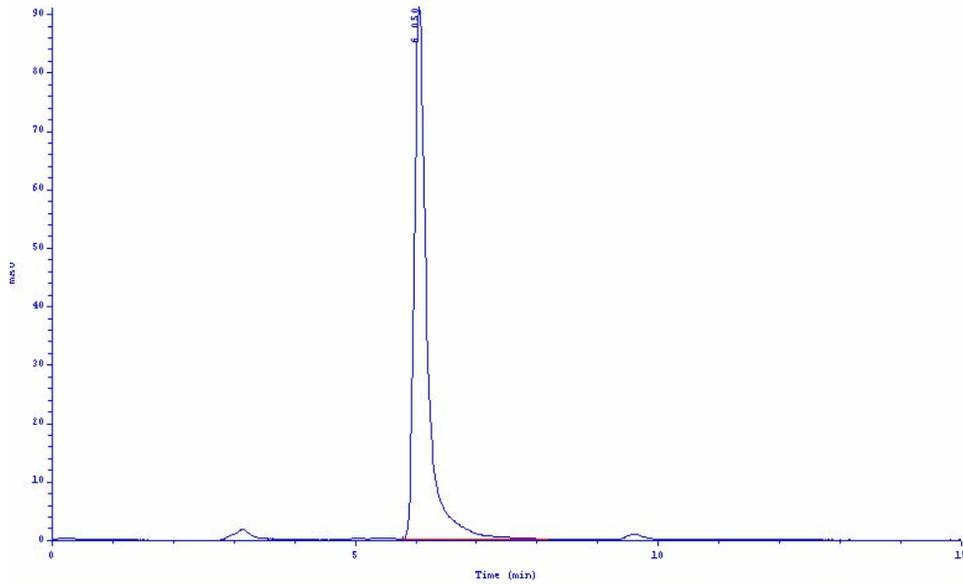
2. Anhídrido acético.

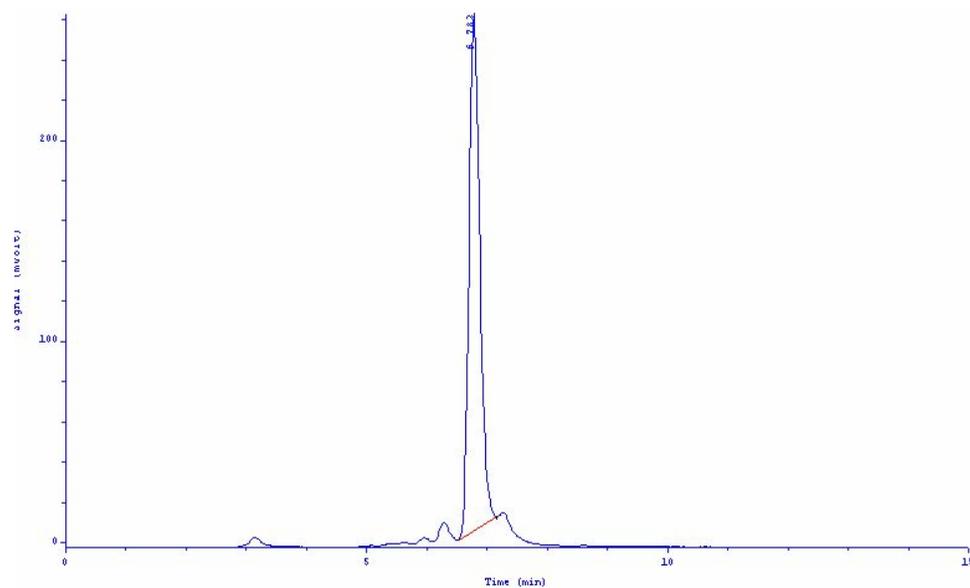
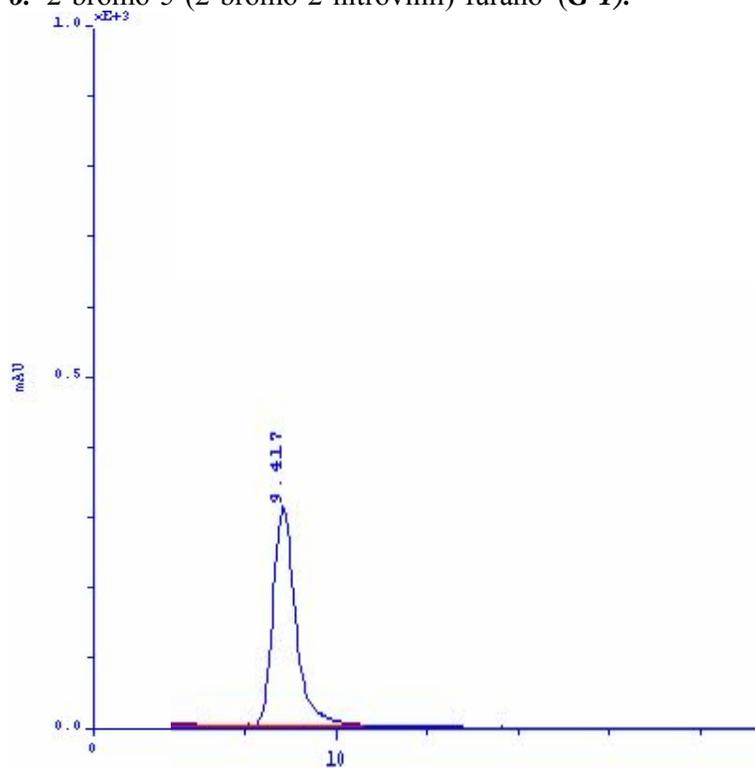


3. Furfural

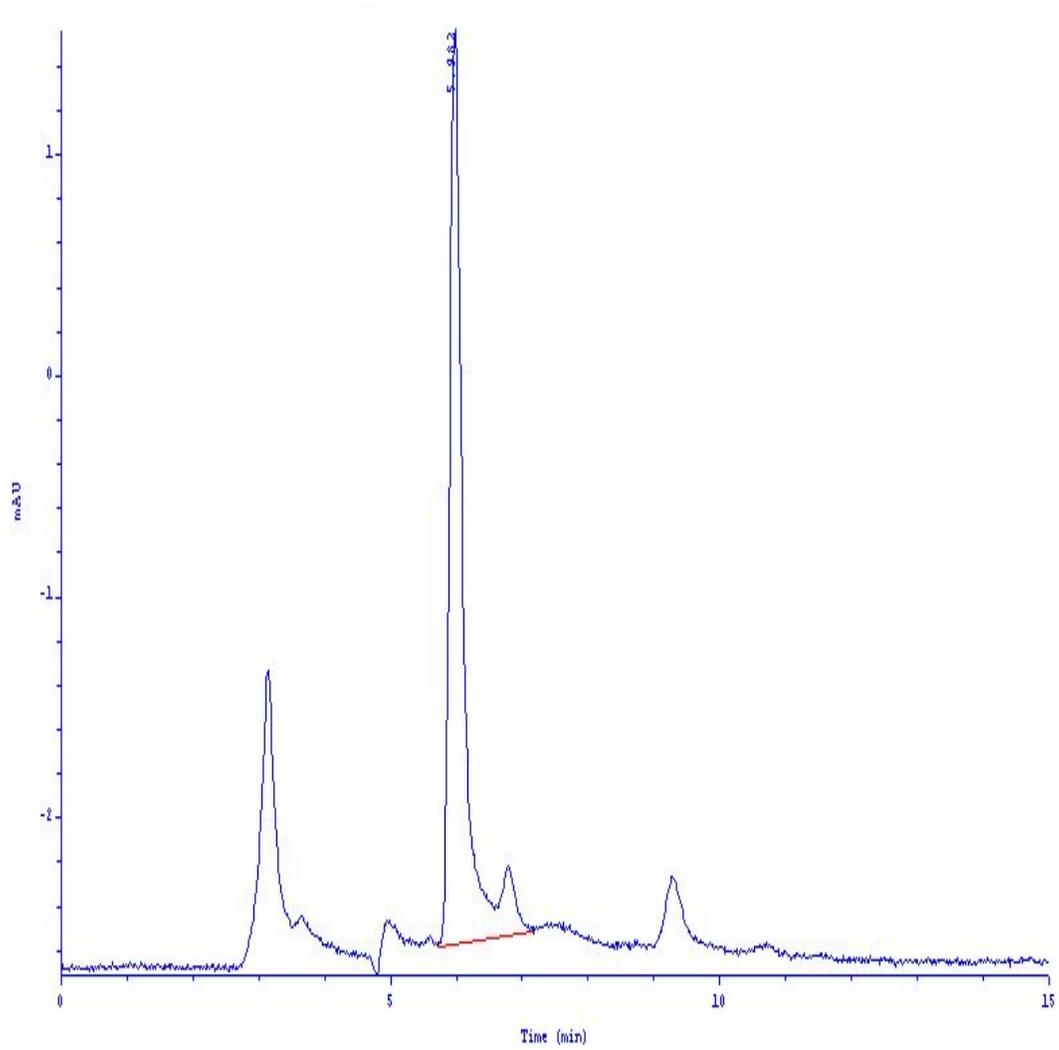


4. Nitrometano



5. 2-(2-nitrovinil) furano (**G-0**)6. 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano (**G-1**).

7. *Disulfuro de carbono*



Anexo 7: Medidas de protección e higiene que deben ser aplicadas en presencia de nitrometano (42-43)

En el laboratorio cuando se trabaja directamente con el nitrometano deben: protegerse los ojos, usar la bata y usar guantes apropiados.

Para el almacenamiento tener en cuenta el código coloreado donde la raya roja significa que se debe guardar separado.

Medidas de primeros auxilios

La inhalación:

Los vapores pueden causar irritación al ser inhalados. Es un narcótico débil, las concentraciones más altas pueden causar: náusea, vómito, diarrea, y dolores de cabeza. Salir al aire fresco y si es necesario recibir la respiración artificial y recibir tratamiento médico. La ingestión:

Inducir el vomito inmediatamente y recibir asistencia médica

El Contacto superficial con la piel:

Puede causar irritación, enrojecimiento, y dolor. Además puede absorberse a través de la piel con síntomas similares a los de la inhalación.

Al contacto con la piel lavar con jabón suficiente y enjuagar con abundante agua por lo menos durante 15 minutos. Recibir la asistencia médica.

El contacto con los ojos:

Puede causar irritación y daño de la córnea.

Inmediatamente al contacto con los ojos enjuáguese con agua suficiente durante 15 minutos, lavando los párpados superiores de vez en cuando. Recibir asistencia médico de inmediato.

Manejo y almacenamiento

Debe protegerse el producto contra el daño físico. Guardar en un frasco seco, fuera de cualquier área donde el riesgo de fuego pueda ser agudo y almacenarse en un lugar aislado. En caso de traslados deben unirse los recipientes y conectarse con tierra para evitar las chispas estáticas. Proteger el área del almacenamiento de la exposición a los fuegos externos. No destile el nitrometano. Proteja de las fuentes de condensación adiabáticas. Nunca lave los recipientes vacíos con los agentes de limpieza alcalinos. Después de que este recipiente se ha vaciado, puede contener los vapores explosivos;

deben observarse todas las advertencias y precauciones relacionadas para el producto. No se puede cortar, o soldar delante o cerca de este recipiente.

Métodos de recogida y limpieza:

Se debe recoger con materiales absorbentes (Absorbente General Panreac, Kieselguhr, etc.) o en su defecto arena o tierra secas y depositar en contenedores para residuos para su posterior eliminación de acuerdo con las normativas vigentes. Limpiar los restos del producto con abundante agua.

Tabla 34: Información reglamentaria

Etiquetado según Directiva de la CE	
Símbolo	
Frases R	5-10-22 Peligro de explosión en caso de calentamiento. inflamable. Nocivo por ingestión.
Frases S	41 En caso de incendio y/o de explosión, no respire los humos.
Número de índice CE	609-036-00-7

Anexo 8: Riesgos de incendio y medios de Extinción (44)



Riesgos de incendio y exposición:

Cerca de la temperatura de inflamación (95F) pueden formarse las mezclas de vapor-aéreas explosivas. Los vapores inflamables que son más pesados que el aire pueden aumentar en las áreas bajas y/o pueden extenderse a lo largo de la tierra. Puede detonar si se guarda en un recipiente cerrado y se calienta. Se pone más sensible a la detonación por la contaminación con ciertos compuestos químicos, como las aminas y ácidos. Hay riesgo de inflamación hay baja presión. El nitrometano es sensible al impacto mecánico y sensible a la descarga estática.

Medios de Extinción:

El nitrometano puede ser extinguido con anhídrido carbónico, la espuma del alcohol y el rocío de agua. En los fuegos del nitrometano no usar extintores de incendios químicos secos que contengan sodio o bicarbonatos de potasio. En estos casos usar la ropa de protección y el aparato respiratorio.

Otras medidas en caso de accidentes

- Ventilar el área donde ha sido derramado el producto.
- Quitar todas las fuentes de ignición.
- Llevar el equipo de la protección personal apropiado.
- Aislar el área de riesgo.
- Impedir el personal innecesario en el local.

Debe recuperarse el líquido cuando sea posible. Coleccionar el líquido en un recipiente apropiado o absorba con un material inerte (la arena seca, la tierra). No usar materiales combustibles, como el polvo de la sierra. ¡No vaciar al vertedero! Si el derramamiento no se ha encendido, usar el rocío de agua para dispersar los vapores.

Precauciones

Evitar el calentamiento de este producto, además alejarlo de cualquier fuente de ignición, no dejarlo reaccionar con ninguna de las sustancias incompatibles y evitar los choques

Anexo 9: Medidas de protección en el laboratorio e higiene que deben ser aplicadas en presencia de la sal sódica de ácido 1,2-naftoquinona-4-sulfónico (45)

Medidas de primeros auxilios

El Contacto con los ojos:

Inmediatamente al contacto con los ojos enjuagar con abundante agua durante 15 minutos, puede usarse agua fría y buscar asistencia médica.

El Contacto con la piel:

Si se ha derramado sobre la piel, lavarse inmediatamente con agua suficiente además se puede utilizar un jabón desinfectante y cubrir la piel contaminada con una crema antibacteriana. Tener cuidado al limpiar, zonas quemadas, o partes dañadas. Cubrir la piel irritada con un emoliente. Si la irritación persiste, buscar asistencia médica

La ingestión:

Inducir el vomito. Examinar los labios y enjuagar de inmediato con abundante agua Si la víctima no respira, realice la respiración de boca-a-boca y busque la asistencia médica.

Medidas en caso de accidentes

En caso de derrame recoger el sólido para ponerlo en un recipiente adecuado y limpiar el lugar rápidamente. En el caso de que ocurra fuego usar polvo químico seco, rocío de agua, niebla o espuma.

Manejo y almacenamiento

Debe ser guardado en un recipiente seco y cerrado herméticamente, en un lugar ventilado lejos de fuentes de ignición. Los recipientes vacíos son un riesgo de fuego, por lo que debe evaporarse el residuo bajo una capa de humo.

Protección personal en caso de derrame:

Usar la bata de laboratorio, los guantes y botas. Además para evitar la inhalación del producto protegerse con un aparato respiratorio y proteger los ojos con la careta