



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

*Facultad de Química Farmacia  
Departamento de Licenciatura en Química  
Centro de Bioactivos Químicos*

## *Trabajo de Diploma*

*Título: Obtención de un principio activo, con acciones frente a Ectoparásitos a escala de 6 moles.*

*Autor: William Echevarría Silveira*

*Tutoras: Dra. Zenaida Rodríguez Negrín  
M.Sc. Gisela Peralta Mesequer*

*Curso: 2006 – 2007*

## INDICE

Resumen.....	1
Introducción.....	2
Capítulo I: Parte Teórica.....	3
1.1 Desarrollo de un principio activo.....	4
1.2 Parámetros para el análisis de la materia prima.....	6
1.3 Características y síntesis del UC-244.....	12
1.4 Materias primas de la síntesis del UC-244.....	14
1.5 Importancia y utilización del UC-244.....	16
1.6 Arácnidos.....	19
1.7 Aspectos fármaco-toxicológicos del UC-244.....	20
1.8 Estudios anteriores de la síntesis y purificación del UC-244.....	22
1.9 Diseño de experimentos.....	23
1.10 Fundamentos de las técnicas analíticas.....	25
Capítulo II: Materiales y Métodos.....	30
2.1 Reactivos y equipos.....	30
2.2 Preparación del patrón de UC-244.....	30
2.3 Determinación de parámetros de calidad del UC-244 como materia prima.....	30
2.4 Método combinado de CCD-espectrofotometría UV-VIS.....	32
2.5 Comprobación de algunos parámetros de validación de la técnica analítica.....	32
2.5.1 Preparación de la curva calibración.....	33
2.5.2 Determinación de la precisión.....	33
2.5.3 Determinación del límite de cuantificación.....	33

2.6 Aplicación de las condiciones óptimas de síntesis del diseño $2^{5-2}$ al escalado a 4 moles.....	34
2.7 Aplicación de las condiciones óptimas de síntesis del diseño $2^{5-2}$ al escalado a 6 moles.....	35
2.8 Influencia de diferentes factores en el proceso de síntesis a escala de 6 moles.....	36
2.9 Replicado de las mejores condiciones de síntesis en el diseño $2^{5-2}$ a 6 moles, al evaluar la Función Respuesta: Rendimiento.....	37
2.10 Influencia de diferentes factores en el proceso de purificación.....	38
2.11 Replicado de las mejores condiciones de purificación al evaluar la Función Respuesta: Pureza.....	38
2.12 Aplicación de las mejores condiciones de síntesis y purificación.....	39
Capítulo III: Discusión de los resultados.....	40
3.1 Preparación del patrón de UC-244.....	40
3.2 Parámetros Calidad para una materia prima.....	41
3.3 Comprobación de algunos parámetros de validación de la técnica analítica....	42
3.3.1 Linealidad.....	42
3.3.2 Precisión.....	44
3.3.3 Exactitud.....	44
3.3.4 Determinación del límite de cuantificación.....	45
3.4 Aplicación de las condiciones óptimas de síntesis del diseño $2^{5-2}$ al escalado a 4 moles.....	46
3.5 Aplicación de las condiciones óptimas de síntesis del diseño $2^{5-2}$ al escalado a 6 moles.....	46
3.6 Influencia de diferentes factores en el proceso de síntesis a escala de 6 moles.	47

3.7 Replicado de las mejores condiciones de síntesis en el diseño $2^{5-2}$ a 6 moles al evaluar la Función Respuesta: Rendimiento.....	49
3.8 Influencia de diferentes factores en el proceso de purificación.....	50
3.9 Replicado de las mejores condiciones de purificación al evaluar la Función Respuesta: Pureza.....	51
3.10 Aplicación de las mejores condiciones de síntesis y purificación.....	52
Conclusiones.....	53
Recomendaciones.....	54
Bibliografía.....	55
Anexos.....	59

*Para Ivette.*

*Quiero agradecer especialmente a mis tutoras Zenaida y Gisela por su paciencia y dedicación para conmigo. Por enseñarme y confiar en mí.*

*A mis padres por darme aliento y a mi esposa querida por estar a mi lado.*

*Gracias infinitas a Josefa, por su dedicación y compromiso en el laboratorio. A todo el Centro de Bioactivos Químicos, especialmente, al Departamento de Control de la Calidad por tenderme la mano.*

### **Resumen:**

El Centro de Bioactivos Químicos tiene como misión el desarrollo de principios activos con acción biológica. El 1-nitro-2-metilvinilfurano conocido como UC-244 presenta propiedades demostradas en Cuba y otros países frente a los ectoparásitos. En este trabajo se realiza la síntesis y cuantificación de esta materia prima hasta escala de 6 mol empleando diseño de experimentos y técnicas analíticas combinan la espectrofotometría UV-VIS con una separación previa mediante la cromatografía de capa delgada.

Palabras claves: espectrofotometría UV-VIS, cromatografía de capa delgada, 1-nitro-2-metilvinilfurano, síntesis química.

### **Abstract:**

The Chemical Bioactive Center has as a mission the development of active ingredients with biological action. The 1-nitro-2-methylvinylfuran that is known as UC-244 presents properties demonstrated in Cuba and other countries against the ectoparasists. In this work is carried out the synthesis and quantification of this raw material until scale of 6 mole using experimental designs and a combined analytical technique, such as UV-VIS spectrophotometry with a previous separation of thin layer chromatography.

Key words: UV-VIS spectrophotometry, thin layer chromatography, 1-nitro-2-methylvinylfuran, chemical synthesis.

## **INTRODUCCIÓN**

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

El 1-nitro-2-metilvinilfurano, más conocido como UC-244, presenta entre otras propiedades acción garrapaticida y bactericida, las que auguran potenciales aplicaciones en la medicina veterinaria (Olazábal, E.; 1991). Es por ello que el presente trabajo reviste una especial importancia para el Centro de Bioactivos Químicos, en el cual se investigan diversos principios activos que pueden conducir al desarrollo de medicamentos de aplicación veterinaria o para la salud humana.

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

Es necesario contar con técnicas analíticas fiables y factibles que permitan evaluar las funciones respuestas de los diseños de experimentos. Para este fin pueden ser aplicadas la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) y la Cromatografía de Gases (GC), pero ellas requieren de un equipamiento costoso y en algunos casos de difícil mantenimiento, por lo que más frecuentemente se recurre a otras técnicas más factibles como la Espectrofotometría UV-VIS, la Polarografía Diferencial de Pulso (PDP), la Potenciometría auxiliados de procedimientos de separación y concentración tales como la extracción líquido-líquido, la volatilización o la cromatografía de capa delgada, entre otros.

El presente trabajo se dirige a la solución del siguiente **Problema Científico**:

El proceso de obtención del UC-244 tiene bajos rendimientos en la etapa de síntesis y la pureza con que se obtiene el producto es aún insuficiente para los requerimientos de formulación de un principio activo de aplicación en medicina veterinaria.

Como vía para solucionar el problema científico se formula la siguiente **Hipótesis**:

Es posible elevar los rendimientos de los procesos de síntesis y de purificación de UC-244 y alcanzar una pureza de la sustancia bioactiva superior a un 98 %, que es la requerida para la formulación como producto veterinario.

Se propone el siguiente **Objetivo general**:

Lograr las mejores condiciones del proceso de síntesis y purificación de UC-244 a escala de 6 moles mediante un aumento del rendimiento y de la pureza del principio activo, que permita alcanzar una eficiencia total del proceso, superior a la alcanzada en trabajos anteriores.

Para el logro del mismo se proponen los siguientes **Objetivos Específicos**:

- Obtener las mejores condiciones para la síntesis y la purificación del UC-244 a escala de 6 moles en las condiciones de laboratorio, mediante diseños de experimentos.
- Aplicar los parámetros de síntesis y purificación obtenidos mediante los diseños experimentales desarrollados a fin de comprobar experimentalmente su validez.
- Aplicar la técnica de Espectrofotometría UV-CCD a la determinación de la pureza del producto obtenido en los experimentos de síntesis y purificación, así como otros parámetros indicativos de su calidad.

## CAPÍTULO I: PARTE TEÓRICA

### 1.1 Desarrollo de un principio activo.

Un problema fundamental del mundo moderno es el envejecimiento poblacional. Las personas del mundo occidental son cada vez más longevas. Incluso en los países vías en desarrollo, el porcentaje de personas de la tercera edad crece sin cesar. Además, cada día, somos más resistentes a los medicamentos que hasta ahora conocíamos. Estos cambios mundiales incrementan la demanda de medicamentos novedosos y de una mejor asistencia sanitaria.

Para poder lanzar al mercado medicamentos innovadores más efectivos y menores efectos secundarios, las empresas farmacéuticas invierten hoy cifras importantes. Los costes de desarrollo de un nuevo medicamento suelen cifrarse entre 800 y 1000 millones de dólares. Las empresas farmacéuticas dedicadas a la investigación invierten una media del 15% de su facturación en el desarrollo de nuevos medicamentos. Atendiendo a la cantidad de nuevos medicamentos autorizados, los gastos de investigación y desarrollo (I+D) que afronta la industria farmacéutica han aumentado desproporcionadamente en los últimos años, es decir, que para desarrollar un nuevo medicamento, las empresas deben invertir, por término medio, cada vez más dinero. En la figura 1 se muestran las inversiones en I+D en los últimos años.

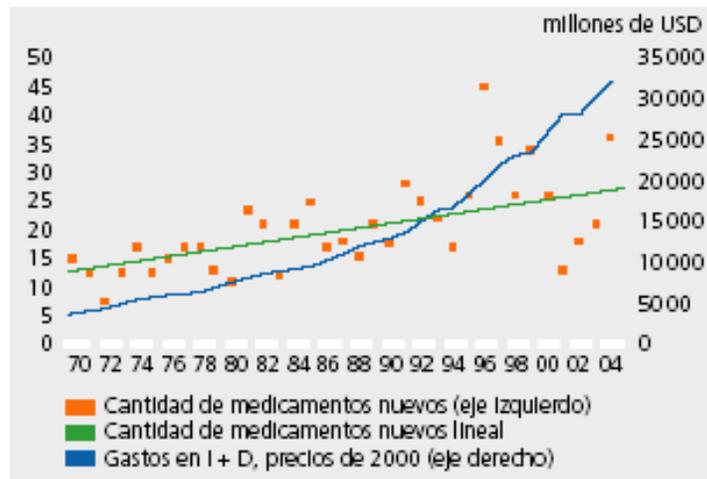


Figura 1: Inversiones en I+D hasta el 2004.

Ante todo, los costes de I+D son muy elevados porque los prometedores ensayos de laboratorio que se realizan con un principio activo no garantizan que la compañía pueda lanzarlo más adelante como un medicamento nuevo. Apenas los investigadores hallan un principio activo de interés, se solicita la patente para este principio activo. Esta patente suele tener una validez de 20 años. Pero antes de que surja un nuevo producto, el principio activo deberá pasar por una serie de fases de ensayos. Así, hasta que la empresa obtiene la autorización para la comercialización, transcurren, por lo general, de diez a quince años. Muchos de estos principios activos no resultan ser aptos durante el proceso de ensayos de varias fases y deben ser dejados a un lado. De 5 000 a 10 000 moléculas sometidos a ensayos en laboratorio o con animales, sólo uno llega a ser un medicamento como producto final.

Cuando se identifica una molécula que influye en la evolución de una enfermedad, la institución comienza una serie de ensayos preclínicos con este principio activo. En esta fase, los ensayos de laboratorio y los ensayos con animales demuestran si el principio activo es tóxico, cómo lo absorbe el cuerpo, qué repercusiones tiene en el metabolismo y cómo lo elimina el cuerpo. La acción que este medicamento tiene en las personas se probará, luego, en tres fases de ensayos clínicos.

**Fase I:** En un pequeño grupo de personas sanas se determina la posología correcta y se prueban los efectos secundarios del medicamento.

**Fase II:** En un pequeño grupo de pacientes se prueban las acciones y los efectos secundarios.

**Fase III:** En un grupo suficientemente grande de pacientes se prueba la relevancia estadística de la acción y de los efectos secundarios.

Si un medicamento logra la acción deseada sin efectos secundarios prohibidos, podrá solicitarse la autorización en los organismos correspondientes, por ejemplo, ante la Federal Drug Administration (FDA, EE.UU.) o ante la Agencia Europea para la Evaluación de Medicamentos (EMA, UE).

En la figura 2 se muestra de manera gráfica las distintas etapas para el desarrollo de un medicamento en función del tiempo.

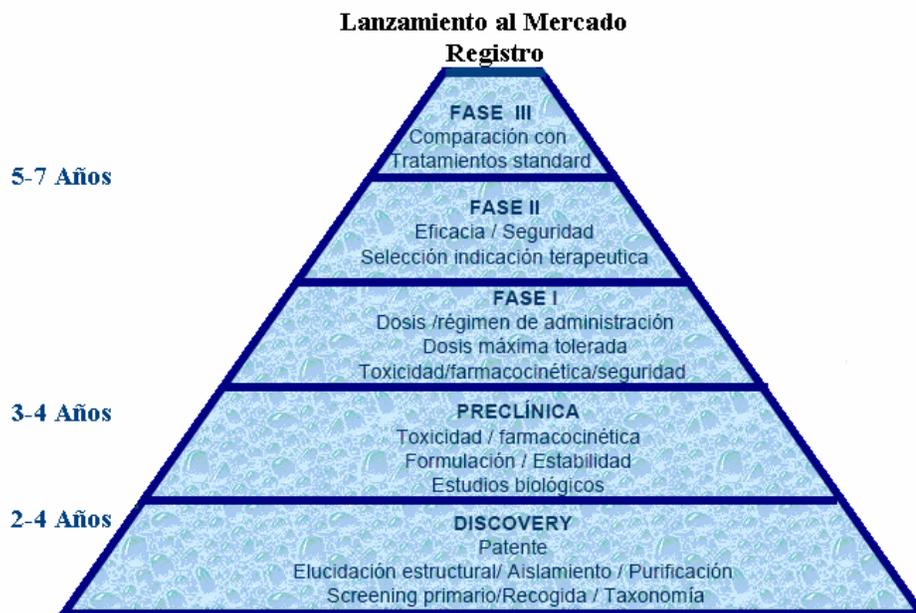


Figura 2: Etapas para el desarrollo de un medicamento en función del tiempo.

## 1.2 Parámetros para el análisis de la materia prima

A continuación se enumeran los principales análisis que deben realizarse a una materia prima en la Industria Farmacéutica (USP XXIII, 1986)

- 1.- Descripción: Color, olor, sabor.
- 2.- Solubilidad.
- 3.- Pérdidas por desecación.
- 4.- Cenizas.
- 5.- Identificación: reacciones de calor, reacciones de precipitación, determinación de constantes físicas, absorción en el UV y el IR, identificación por métodos cromatográficos.
- 6.- Identificación y determinación de impurezas.
  - Determinación de metales pesados.
  - Determinación de arsénico.
  - Otros contaminantes: Fe,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Cl}^-$ , etc.
- 7.- Ensayos para determinar cuantitativamente la pureza del producto y conocer si esta adentro de los límites establecidos.

Algunos detalles de estas determinaciones:

*Solubilidad:*

Esta una de las propiedades de los compuestos orgánicos que más se utiliza desde el punto de vista de su caracterización e identificación. A continuación se muestra cómo se establece la solubilidad de los diversos compuestos (Colectivo de autores, 1984; USP XXIII, 1986):

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

*Pérdidas por Deseccación:*

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

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

La desecación de las sustancias que se descompone por debajo de 100 grados se realiza en desecadoras con algunos agentes deshidratantes como el  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (ac),  $\text{CaCl}_2$ , etc o en desecadoras especiales a las cuales se les realiza vacíos previamente con el objetivo de disminuir la temperatura de desecación.

*Determinación de agua por Kart Fischer*

Se basa en la reacción cuantitativa que se produce entre el agua y un reactivo constituida por SO<sub>2</sub> y I<sub>2</sub> en forma anhidra y metanol, de acuerdo con las siguientes reacciones:



Después de que el agua ha reaccionando con el I<sub>2</sub> libre, en las soluciones se produce un cambio de color y además el punto final de la titulación se puede determinar eléctricamente utilizando un microamperímetro. Para llevar a cabo esta titulación es indispensable tomar las precauciones adecuadas para evitar que los reactivos y el recipiente donde se efectúe la reacción tengan contacto con la humedad atmosférica.

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

*Cenizas:*

Un ensayo oficial, considerado un índice importante en el análisis de la sustancia es el residuo de ignición. Los compuestos inorgánicos a excepción de algunos que arden o se subliman, siempre dejan un mayor o menor residuo de ignición.

Los compuestos orgánicos se carbonizan previamente y no dejan residuo alguno. Si en una sustancia orgánica hay presentes otros elementos además de carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno y azufre (tales como compuestos orgánicos que contienen metales), por ejemplo fósforo, arsénico, mercurio, plomo; queda después de la combustión un residuo de ignición o cenizas correspondientes a estos últimos.

*Identificación del compuesto. Reacciones de identificación.*

En muchas ocasiones las reacciones de identificación responden al análisis de los grupos funcionales presentes en la estructura, por lo que sus resultados no se deben a la

estructura completa sino a parte de ella. En las farmacopeas más modernas las pruebas de identificación vienen acompañadas de ensayos de identificación cromatográficos, para confirmar claramente la presencia de la estructura como tal y la no degradación de la misma. (Castiñeiras Díaz, 1986).

*Punto de Fusión*

De las constantes físicas que se deben ser determinadas a un compuesto ninguno otra debe ser tan utilizada por el analista para identificar a un compuesto sólido como el punto de fusión.

Desde el punto de vista práctico la temperatura de fusión de un sólido cristalino se puede definir como la temperatura a la que el sólido se transformara en líquido a una atmósfera de presión. En una sustancia pura el cambio de estado es muy rápido debido a que el punto de fusión se altera por algunas impurezas, estas constantes constituyen un valioso criterio de pureza cuando una sustancia se mezcla con otra ya que el punto de fusión disminuye a la vez que aumenta el intervalo del mismo. Basado en este hecho se observara un aumento progresivo del punto de fusión a medida que las impurezas disminuyen y alcanzara su valor máximo cuando estos hallan desaparecidos mediante la aplicación de los métodos de purificación. Existe para determinarlo desde un equipo a diario de Rhiel hasta un microscopio (Farmacopea británica, 1988).

*Absorción en el UV:*

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

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

*Absorción en el IR:*

La región IR del espectro electromagnético se extiende entre las regiones visibles y de microonda. Este método constituye un arma de trabajo muy utilizada para la investigación y análisis de sustancias puras o mezclas de sustancias.

Aunque la espectroscopia IR puede utilizarse en determinaciones analíticas cuantitativas basadas en la ley de Ver, la dificultad de obtener espectros reproducibles, en el campo del análisis, limita su utilización y se remite su empleo del análisis cualitativo.

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

*Cromatografía de capa delgada.*

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

La cromatografía en capa delgada tiene grandes ventajas:

- Rapidez
- Estabilidad de la capa respecto a los reveladores agresivos y al calentamiento.
- El equipamiento que se utiliza es generalmente simple.
- Es posible, debido a su gran sensibilidad, utilizar algunos agentes reveladores que permitan descubrir masas mínimas (0.01 – 0.005g) de sustancias.

Los absorbentes inorgánicos no fluorescentes empleados permiten un mayor contacto de las manchas que sobre papel. (Castiñeiras Díaz, 1986).

*Identificación y determinación de impurezas:*

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

FÁRMACO	CONTAMINANTES	MÁXIMO ADMISIBLE (%)
Acido acetil salicilico	Acido salicilico	0.75
Epinefrina	Arteronol	4
Ergocarciferol	Hidroquinona	0.1
Fenatecina	p-cloroacetanilida	0.03
Sodio amobarbitol	Amobarbitol	0.5

Algunas impurezas como metales pesados y el arsénico son altamente tóxicos y pueden producir trastornos graves aún en concentraciones pequeñas, además la mezcla de partículas extrañas puede alterar la concentración del medicamento produciendo la

precipitación de los insolubles y disminuyendo su efecto. Cuando al realizar estos ensayos la muestra tiene más del límite establecido como norma, este tiene que ser desechado y no puede ser utilizado en la preparación de la formulación.

La cromatografía de capa delgada es de gran valor en trabajos como medio de asignación de bajas concentraciones de impurezas en medicamentos. Para este propósito la sustancia se aplica y se corre el cromatograma; cualquier mancha secundaria que aparezca después de el relevado se comprara en tamaño e intensidad con los correspondientes a las impurezas esperadas y que simultáneamente han sido presentados en la placa.

Ensayos para la determinación cuantitativa de la pureza del producto:

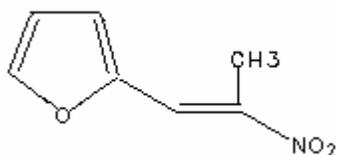
Teniendo en cuenta las estructuras de los compuestos se refieren (Baez,R. y Bernal, N.; 1988) diferentes métodos a utilizar en la determinación de su pureza:

PRODUCTO	MÉTODOS CUANTITATIVOS
G-0	<ol style="list-style-type: none"><li>1. – Métodos volumétricos Determinación del nitrógeno total (Kjedhal} Reducción del grupo nitro y posterior valoración.</li><li>2. – Espectrofotometría UV</li><li>3. – Cromatografía gaseosa</li><li>4. – Calorimetría de exploración diferencial</li><li>5. – Polarografía</li></ol>
G-1	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Métodos volumétricos: Reflujo con KOH y valoración con Ag NO<sub>3</sub> Determinación de N<sub>2</sub> total.</li><li>2. - Espectrofotometría UV</li><li>3. - Cromatografía gaseosa</li><li>4. – Calorimetría de exploración diferencial (11]</li><li>5. – Polarografía</li><li>6. – Métodos de combustión en balón de oxígeno.</li></ol>

### 1.3 Características y síntesis del UC-244

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

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



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

Masa molar: 153.137 g/mol.

Fórmula global: C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>O<sub>3</sub>N.

En estado cristalino es un sólido de olor penetrante y de color amarillo. Tiene la capacidad de sublimar. (Ugalde, M.;1993). Funde entre 47 y 49 °C, es prácticamente insoluble en agua y muy soluble en solventes orgánicos polares. Se descompone a la luz tomando colores en las tonalidades del carmelita oscuro al negro. Posee elevada reactividad con solventes nucleofílicos, la que se cataliza por la luz.

#### *Características espectroscópicas:*

##### Infrarrojo

$$\gamma_{C=C} \quad 1635 \text{ cm}^{-1}$$

$$\gamma_{NO_2} \quad 1500 \text{ y } 1340 \text{ cm}^{-1}$$

$$\gamma_{C-O-C} \quad 1270 \text{ cm}^{-1}$$

$$\gamma_{C=C} \quad 760 \text{ cm}^{-1}$$

$$\gamma_{C-H} \quad \text{del CH}_3 \quad 2930 \text{ cm}^{-1}$$

En el ultravioleta visible las bandas de máxima absorción se hayan corridas hacia longitudes de onda mayores producto de transiciones  $\Pi$ -  $\Pi^*$  y n-  $\Pi^*$  fundamentalmente. (Delgado, 1993).

En el UC-244 a medida que aumenta la polaridad del solvente hay un desplazamiento batocrómico de la banda de absorción.

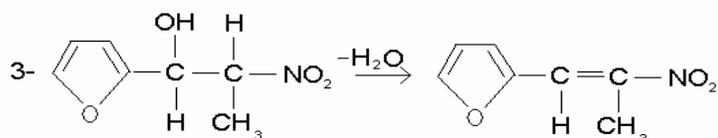
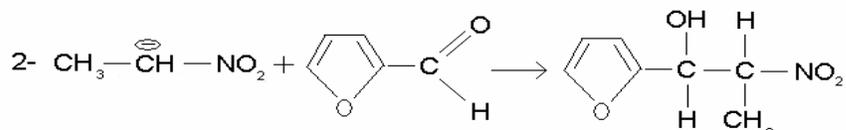
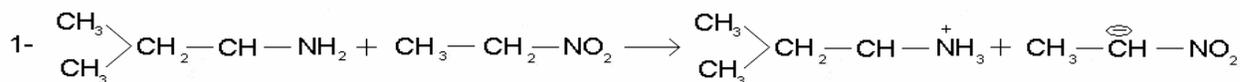
*Influencia de la polaridad del solvente en la posición del máximo de absorción.*

Es de suponer que es una transición  $\Pi$ -  $\Pi^*$ ; esta asignación esta hecha sobre la base del conocimiento de que estas transiciones dan lugar a bandas intensas que pueden aparecer en el ultravioleta cercano o visible si hay presente instauraciones conjugadas y al hecho de que las bandas originadas por este tipo de transición pueden tener corrimiento batocrómico cuando la polaridad del solvente aumenta. (Delgado, 1993).

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

SOLVENTES	UC-244 $\lambda$ (nm)
n- heptano	331.0
Éter de petróleo (70 – 100 °C )	331.2
Ciclohexano	332.8
Tetracloruro de carbono	338.5
Éter dietílico	339.6
Metanol	348.0
Etanol	349.6

Mecanismo de reacción:



UC-244

#### 1.4 Materias primas de la síntesis de UC-244

##### Furfural, o furfuraldehído:

Aldehído orgánico líquido, de fórmula  $\text{C}_5\text{H}_4\text{O}_2$ , que se obtiene por la destilación con ácido clorhídrico o sulfúrico del salvado de la cascarilla de arroz y otros productos ricos en pentosas. El grupo de compuestos al que pertenece el furfural se denominan furanos. El furfural, en estado puro, es un líquido aceitoso incoloro, con un olor a almendras agrias, que expuesto al aire se vuelve pardo rojizo.

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

**Nitroetano:**

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

A continuación se relacionan algunas de sus propiedades:

Fórmula general:  $C_2H_5NO_2/CH_3CH_2NO_2$

Masa molar: 75.1 g/mol

Punto de ebullición: 114°C

Punto de fusión: -50°C

Densidad relativa (agua = 1): 1.053 g/cm<sup>3</sup>

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

Presión de vapor (a 20°C) : 2.08 kPa

Punto de inflamación: 28°C

Temperatura de auto ignición: 414°C

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

Puede estallar por calentamiento rápido a altas temperaturas. Con álcalis fuertes, ácidos o combinación de aminas y óxidos de metales pesados se forman compuestos inestables frente al choque. En combustión, formación de gases tóxicos (dióxido de nitrógeno). La sustancia se descompone al calentar intensamente por encima de 300°C, produciendo humos tóxicos (óxidos de nitrógeno) que irrita los ojos, la piel y el tracto respiratorio, además de causar tos y dolor de cabeza. La exposición podría causar disminución de la conciencia. Puede atacar algunos tipos de plástico.

**Isobutilamina:**

La isobutilamina es un líquido incoloro a temperatura ambiente, de olor característico.

Algunas de sus propiedades principales se relacionan a continuación:

Temperatura de ebullición: 68-69 °C

Temperatura de fusión: -85 °C

Densidad relativa (agua = 1): 0.7

Solubilidad en agua: miscible.

Presión de vapor, a 18.8°C: 13.3 kPa

Densidad relativa de vapor (aire = 1): 2.5

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

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

### **1.5 Importancia y utilización del UC-244**

Este compuesto aun bajo estudio, se ha demostrado su gran eficacia en la eliminación y el control de plagas muy dañinas, como son los coleópteros de las especies *Dermester ater deg* y *Alphitobius diaperinus* envaludados en gallinas ponedoras a concentraciones de 0.5 y 1% en solución acuosa (Rodríguez, R. 1994). Otro insecto al cual también ataca es la mosca (*Musca domestica*) mostrando su efectividad a 0.1 – 1%, aunque el G-0, otro compuesto furánico también sintetizado el Centro de Bioactivos Químicos, mostró mayor efectividad.

El UC-244 también ataca a ácaros que son perjudiciales para los granos almacenados, tanto en larvas como adultos. Los vapores logran difundirse por todo el material y logran eliminar el *Sitophilus oryzae* (Gorgojo del arroz), el *Tribolium casteneum* (Escarabajo rojo de la harina) y el *Crytolestos sp* (Gorgojo del trigo o gorgojo plano de los granos) obteniéndose los mejores resultados a 5g/m<sup>3</sup>. Además es activo a concentraciones de 2.5 g/m<sup>3</sup> ante el *Zabroles subfasciatus* el cual ataca al frijol Chiclayo o Caupí. Además ante las concentraciones ensayadas no presentaron afectaciones las semillas almacenadas ante su posterior germinación y produjo un efecto residual que protege al grano durante 30 días aproximadamente. Tampoco afecta su utilización como sustrato para el desarrollo de hongos trichoderma sp y beauveria bassiana e impide el desarrollo de los

entomopatógenos cultivados sobre estos sustratos. La harina almacenada también es atacada por los gorgojos a los que los vapores del compuesto eliminan con eficacia en una semana, incluyendo sus larvas. (Machado, R.).

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

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

Se estudió el efecto sobre el pienso industrial del insecto plaga *Rhizoperta dominica* (Polilla de los cereales), mediante el producto UC-244 (en forma sólida), presentándose un efecto letal a los 12 días.

Además se avaluó el UC-244 en cultivos de habichuelas y frijoles ante plagas de *Thrips palmi kany* siendo eficaz a concentraciones de 0.1%

También se estudió el UC-244 frente a *Artemia salina* Leach y *Hemisia tabacci* Genn.

La *Artemia spp* son camarones minúsculos de cuerpo blando, de color carmelita y transparentes a la luz. El ensayo se basa en que la mayoría de los compuestos activos son tóxicos a las larvas de *Artemia spp*. Es un ensayo general de amplio uso, que determina el efecto letal de los materiales sobre las larvas de *Artemia spp.*, y de esta manera se predice su habilidad para producir la muerte de células cancerígenas en cultivo de tejidos, matar insectos y ejercer un amplio rango de efectos farmacológicos. Este estudio mostró que el UC-244 en el rango de concentraciones de 10 a 1000 µg/mL frente la *Artemia salina* posee acción plaguicida potencial e induce a considerar su evaluación en ensayos más específicos.

La *Hemisia tabacci* Genn conocida comúnmente como mosca blanca del algodónero o de la batata, ocasiona afectaciones a numerosos cultivos y constituye un problema de vital importancia para la agricultura de un gran número de países a nivel mundial. Como

resultado de su ataque pueden reducir el rendimiento de forma directa al alimentarse del tejido de la hojas, proceso en el cual inyectan toxinas a través de la saliva, lo que ocasiona el debilitamiento de la planta, manchas cloróticas, síntomas de deshidratación, detención y disminución del crecimiento, por otra parte la secreción de melaza de las moscas, favorece la aparición del hollín negro o negrilla y posterior asentamiento del hongo (*Cladosporium sp.*) en hojas, flores y frutos; lo que provoca asfixia vegetal, dificultad en la fotosíntesis, disminución en la calidad de la cosecha y se les reconoce su eficacia en la transmisión de enfermedades. El UC-244 produjo una mortalidad superior al 50% a la concentración más baja evaluada a las 48 horas (16 µg/mL). A concentraciones superiores (2000 y 1000 µg/mL) causó la muerte de todas las moscas evaluadas antes de que estas fueran transferidas al vial de las plantas.

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

Tabla 1: Principales acciones del UC-244

ACCIONES DEL UC-244 FRENTE A:		EVALUADOS EN:
Coleópteros de las especies: <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Dermester ater deg</i></li> <li>• <i>Alphitobiusdiaperinus</i></li> </ul>	0.5% y 1%	Gallinas Ponedoras
<i>Thrips palmi kany</i>	0.1%	Habichuela
<i>Thrips palmi kany</i>	0.1%	Frijoles
<i>Musca domestica</i>	0.1%-0.25%	
<i>Sitophilus oryzae</i> (Gorgojo del arroz)	5g/m <sup>3</sup>	Arroz
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Rhizopertha dominica</i></li> <li>• (Bostrico de los granos)</li> </ul>	0.1% No afecta la brotación, ni tamaño de las hojas	Ajo
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Tribolium casteneum</i> (Escarabajo Rojo de la harina)</li> <li>• <i>Crytolestos sp</i> (Gorgojo del trigo o gorgojo plano de los granos)</li> </ul>	5g/m <sup>3</sup>	Trigo
<i>Zabroles subfasciatus</i>	2.5g/m <sup>3</sup>	Frijol Chiclayo o Caupí
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Sitophilus sp</i> (<i>Sitophilus oryzae</i>, <i>Sitophilus zea mais</i> y <i>Sitophilus granarius</i>)</li> </ul>		Sorgo ( <i>Sorghum bicolor</i> )
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Hemisia tabacci</i> Genn (mosca blanca del algodónero o de la batata)</li> </ul>	16 µg/mL	Plantas
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Artemia spp</i></li> </ul>	10 a 1000 µg/mL	Larvas de <i>Artemia spp</i>

### 1.6 Arácnidos

Término que se aplica al escorpión, la araña, el opilión, el ácaro, la garrapata y algunos otros animales invertebrados. Por lo general, los arácnidos son carnívoros y terrestres; el registro fósil sugiere que estuvieron entre los primeros animales en vivir en tierra firme, tal vez a comienzos del período devoniano, hace casi 400 millones de años. Hoy existen una 60.000 especies, agrupadas en 11 órdenes y dentro de estas esta la garrapata (Encarta, 2000).

Garrapata:

Este es el nombre común de unos arácnidos de mayor tamaño que los ácaros que son parásitos del ganado vacuno, los perros, las aves, los reptiles y algunos otros animales, incluido el ser humano. Viven en los bosques o entre la vegetación densa. La garrapata tiene un cuerpo similar al del ácaro con una piel correosa y cuatro pares de patas terminadas en garra. Las piezas bucales consisten en un órgano par de anclaje, llamado rostro, cubierto de garfios curvados hacia atrás, equivalente a un 'labio maxilar' o a los pedipalpos de otros arácnidos, y un par de mandíbulas afiladas que se deslizan hacia atrás y hacia adelante a lo largo de dos canales longitudinales presentes en el rostro. La garrapata se fija sobre la piel de un animal, la perfora y le succiona sangre. Las garrapatas transmiten varias enfermedades al hombre a través de su mordedura o de sus excrementos. En cuanto a la clasificación científica de las garrapatas se consideran pertenecientes al orden Acari.

Las garrapatas, de mayor tamaño que los ácaros, succionan sangre y transmiten agentes patógenos como protozoos, virus y bacterias; pueden tener varios huéspedes en su ciclo vital (Encarta, 2000).

**1.7 Aspectos fármaco-toxicológicos de la molécula del UC-244.**

Los estudios farmacológicos que sustentan, desde el punto de vista científico, el empleo de la molécula UC-244 en el campo de la terapéutica se refieren a sus acciones antiinflamatoria y acaricida fundamentalmente. La actividad antiinflamatoria de esta molécula ha sido demostrada mediante ensayos farmacológicos desarrollados en el Departamento de Farmacia de la Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas (UCLV) (Loy 1998), así como en el Centro de Química Farmacéutica (CQF) de la Habana (Caveda 1991).

Por otra parte la acción acaricida se determinó por el Grupo de Parasitología de la Estación Nacional Experimental de Parasitología (ENEP) y el Grupo de Parasitología del Centro de Bioactivos Químicos (CBQ) de la UCLV, (Cordobés 1993, Olazábal 1991).

Los estudios toxicológicos de esta molécula la clasifican como de toxicidad moderada, ya que su dosis letal media oral ( $DL_{50}$ ) es de 561,6 y 448 mg/kg. de masa corporal (m.c.)

para ratas Wistar de sexo macho y hembras respectivamente. El criterio técnico toxicológico no considera esta molécula con limitaciones para ser empleada como medicamento, puesto que en este rango es común encontrar la inmensa mayoría de los medicamentos. En estudios desarrollados en la Universidad de Leipzig, Alemania, se demostró que el órgano diana en caso de intoxicación aguda por sobredosis es el hígado, donde se produce la biotransformación de la molécula (Pérez 1988). En estudio subcrónico de 90 días de aplicación por vía oral la molécula de UC-244 a ratas de laboratorio Wistar no se apreciaron efectos tóxicos a la dosis más baja y sí se apreció un aumento de los niveles plasmáticos de las enzimas AlAT y fosfatasa alcalina (FA) para el resto de las dosis. Estos aumentos enzimáticos sin daños celulares marcados, indican que las dosis relativamente altas, no ejercen un considerable efecto tóxico para la vía y especie estudiada (Pérez 1988).

En lo referente al contacto con estructuras oculares, piel y mucosa se debe evitar el contacto de la sustancia pura, así como en concentraciones altas por ser muy irritante (Pérez 1988).

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

### 1.8 Estudios anteriores de la síntesis y purificación del UC-244

Otros investigadores del Centro de Bioactivos Químicos han realizado trabajos con el objetivo de mejorar las condiciones de síntesis y purificación, así como encontrar las condiciones para el escalado sucesivo de ambos procesos.

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

En otro trabajo, Z.Rodríguez y col. (2006), obtienen las mejores condiciones de síntesis y purificación del UC-244 para un escalado de 2 moles. A continuación se presentan las mejores condiciones obtenidas al evaluar el diseño de síntesis  $2^{5-2}$  mediante dos funciones respuesta diferentes: el rendimiento del producto crudo y la pureza del producto crudo.

**Tabla 2: Mejores condiciones de síntesis a escala de 2 moles evaluando la función respuesta rendimiento en el diseño  $2^{5-2}$  (Z. Rodríguez, 2006).**

VARIABLES	NIVELES	MEJORES CONDICIONES
Nitroetano (mL)	-	168
Isobutilamina (mL)	+	10
Tiempo contacto (h)	-	0.5
Temperatura ( $^{\circ}$ C)	+	120
Tiempo reacción (h)	-	3.5

**Tabla 3: Mejores condiciones de síntesis a escala de 2 moles evaluando la función respuesta pureza en el diseño  $2^{5-2}$ .**

VARIABLES	NIVELES	MEJORES CONDICIONES
Nitroetano (mL)	+	210
Isobutilamina (mL)	-	5
Tiempo contacto (h)	-	1
Temperatura ( $^{\circ}$ C)	-	100
Tiempo reacción (h)	-	3.5

Estas condiciones constituyen el punto de partida para el escalado del proceso de síntesis que es el objetivo central de este trabajo.

### 1.9 Diseño de experimentos

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

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

Los métodos de diseño de experimentos permiten sistematizar la forma de realización de

las corridas experimentales y obtener la máxima información posible con la mínima cantidad de experimentos.

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

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

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

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

Un parámetro de optimización debe ser: efectivo desde el punto de vista investigativo, de naturaleza universal, cuantitativo y expresado mediante un valor único así como efectivo estadísticamente. (Fernández. 2003).

Algunos conceptos generales relacionados con el diseño factorial experimental:

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

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

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

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

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

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

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

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

### **1.10 Fundamento de las técnicas analíticas.**

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

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

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

Se busca con este trabajo montar una técnica sencilla, no demasiado costosa y que se pueda realizar en el centro con los aditamentos y reactivos con los que cuenta este.

#### Cromatografía de capa delgada:

La cromatografía comprende un grupo de métodos de separación variada e importante que permite al científico separar, identificar y determinar compuestos afines en mezclas

complejas que no podrían separarse de otra manera. La cromatografía de capa delgada constituye un método de separación eminentemente físico en el cual los componentes a separar se reparten entre dos fases no miscibles, una de las cuales es la fase o lecho estacionario, que es un sólido finamente dividido diseminado como una capa delgada sobre un soporte rígido de cristal, de plástico o de aluminio de gran desarrollo superficial y la otra es un fluido que pasa a lo largo del lecho estacionario. A esto podría añadirse que la velocidad de migración de cada componente es función de la distribución de equilibrio de ambas fases (la estacionaria y la móvil).

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

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

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

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

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

$$R_f = D_1/D_2$$

$D_1$ : distancia del centro de la mancha al origen.

$D_2$ : distancia del frente del eluyente al origen.

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

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

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

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

#### Espectrofotometría directa UV-VIS:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Esta ley se expresa como:

$$A = a b c$$

Donde:

a: absorptividad.

b: camino óptico.

c: concentración. (Para que la absorptividad sea  $\epsilon$  la conc. debe ser molar)

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

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

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

Método combinado de CCD – Espectrofotometría UV:

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

## **CAPÍTULO II: PARTE EXPERIMENTAL**

### **2.1 Reactivos y Equipamiento**

#### **Reactivos químicos:**

Etanol técnico clase A, cloroformo (p.a.), éter de petróleo, isobutilamina, furfural (recién destilado), nitroetano y carbón activado.

#### **Utensilios y medios de medición:**

Balanza analítica Sartorius.

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

Microjeringuilla Hamilton 88000 de 5µL.

Espectrofotómetro UV-VIS

Cubetas de cuarzo de 6 mm.

Papel negro

Pipeta graduada de 5 mL y 10 mL

Pipeta aforada de 5 mL

Matraces aforados de 10, 25 y 50 mL.

### **2.2 Preparación del patrón de UC-244**

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

### **2.3 Determinación de Parámetros de Calidad del UC-244 como materia prima**

#### **Descripción:**

- Color.
- Olor.
- Sabor.

**Residuos de ignición:**

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

Primeramente se colocan los crisoles en una mufla a 900° C durante una hora, posteriormente se transfieren a una desecadora con sílica gel hasta que alcancen la temperatura ambiente, se pesan y son introducidos nuevamente en la mufla siguiendo este procedimiento hasta que la diferencia entre dos pesadas consecutivas sea inferior a 0,5 mg.

Una vez tarados los crisoles se pesa en una balanza analítica 1.0 g de UC-244. Se calienta en una plancha hasta su total carbonización y luego se humedece el residuo con 1 mL de ácido sulfúrico y se calienta suavemente hasta que no se observen humos densos blancos. Se incinera entonces dos horas a 800° C en la mufla y se coloca en una desecadora con sílica gel hasta que alcance la temperatura ambiente. Posteriormente se pesa y se introduce nuevamente en la mufla durante 30 minutos y se repite este procedimiento hasta que la diferencia entre dos pesadas consecutivas no sea mayor de 0,5 mg. (US Pharmacopea XXIII).

**Metales pesados:**

El método se basa en la reacción del ión sulfuro con los iones de las impurezas metálicas contenidas en las muestras, lo que produce una coloración cuya intensidad se compara visualmente con la de una disolución de referencia.

Primeramente se procede a la preparación de una solución de referencia de plomo la cual será utilizada como solución de referencia, conteniendo 20 µg/g de plomo.

Luego se pesa en una balanza analítica 1.0 g de UC-244 y se transfiere a un crisol de porcelana. Se humedece la muestra con ácido sulfúrico y se calienta a baja temperatura. Una vez se ha carbonizado la masa se añade 1 mL de ácido nítrico y 3 gotas de ácido sulfúrico, y se calienta hasta que no se desprendan humos blancos. Posteriormente se incinera en la mufla a 500° C hasta que las cenizas sean de color blanco grisáceo. Se deja enfriar y se añaden 4 mL de ácido clorhídrico 6 mol/L, se tapa el crisol y se evapora a sequedad. Luego se adicionan 10 mL de agua caliente y se digesta la muestra durante 2 minutos. Se procede entonces a adicionar hidróxido de sodio hasta que el medio esté

alcalino al papel indicador. Se diluye con agua y se ajusta el pH nuevamente. A cada uno de los tubos que contienen la disolución de ensayo y la disolución de comparación se añaden respectivamente 10 mL de disolución de sulfuro de hidrógeno, recientemente preparado y se deja en reposo durante 5 minutos. Luego se compara visualmente donde el color de disolución de ensayo no debe ser más intenso que el de la disolución de comparación el cual tiene una concentración de 20 µg/g de metales pesados (US Pharmacopea XXIII).

**Registro de las señales por HPLC:**

Se registra el espectro de HPLC para el patrón de UC-244, para ello se toma una masa de 0.001 g y se enrasa en un matraz aforado de 10 mL (100 ppm) en acetonitrilo:agua (80:20), de esta disolución se toma una alícuota de 2 mL y se lleva a un matraz aforado de 10 mL (20 ppm). Se compara el tiempo de retención de la señal obtenida con la referida por otros investigadores (Z.Rodríguez, (2005).

**Registro del espectro UV:**

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

**2.4 Método combinado de CCD – Espectrofotometría UV-VIS.**

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

**2.5 Comprobación de algunos parámetros de validación de la técnica analítica**

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

### ***2.5.1 Preparación de la curva de calibración***

Se pesa en balanza analítica 1.0 g de UC-244, se disuelve en etanol y se enrasa en un matraz de 50 mL. De esta disolución se toman alícuotas de 4, 5, 7, 8, 9 y 10 mL y se enrasan en volumétricos de 10 mL. De estas soluciones se aplican 5  $\mu$ L en la placa; luego de desarrollado el cromatograma se recorta y se eluye la mancha de color amarillo perteneciente al UC-244 en 5 mL de etanol y se procede a realizar la lectura de la absorbancia a 350 nm.

### ***2.5.2 Determinación de la precisión***

#### **Repetibilidad:**

Se pesa 1.0 g de UC-244, se disuelve en etanol y se enrasa en un matraz de 25 mL. De este se toma una alícuota de 5 mL y se lleva a un matraz de 10 mL. Luego se toman 5  $\mu$ L y se corre el cromatograma, se recorta la mancha, se eluye en 5 mL de etanol y se procede a realizar la lectura de la absorbancia a 350 nm.

Se realizan réplicas de este ensayo.

#### **Reproducibilidad**

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

#### **Exactitud**

Se pesa en balanza analítica 1.0 g de UC-244, se disuelve en etanol y se enrasa en un matraz de 50 mL. De esta disolución se toma una alícuota de 4, 5 y 7 mL y se enrasa en un volumétrico de 10 mL. De esta solución se aplica 5  $\mu$ L en la placa; luego de desarrollado el cromatograma se recorta y se eluye la mancha de color amarillo perteneciente al UC-244 en 5 mL de etanol y se procede a realizar la lectura de la absorbancia a 350 nm.

### ***2.5.3 Determinación del límite de cuantificación***

Se pesa en balanza analítica 1.0 g de UC-244, se disuelve en etanol y se enrasa en un matraz de 50 mL. De esta disolución se toman alícuotas de 1, 2 y 3 mL (muy cercanas al límite inferior de la curva de calibración) y se enrasan en volumétricos de 10 mL. De

estas soluciones se aplican 5  $\mu$ L en la placa; luego de desarrollado el cromatograma se recorta y se eluye la mancha de color amarillo perteneciente al UC-244 en 5 mL de etanol y se procede a realizar la lectura de la absorbancia a 350 nm.

## **2.6 Aplicación de las condiciones óptimas de síntesis del diseño 2<sup>5-2</sup> al escalado a 4 moles.**

Se realizaron 2 réplicas de la síntesis en las mejores condiciones obtenidas en el diseño referido en el capítulo I, aumentando las cantidades necesarias de reactivos para sintetizar 4 moles de UC-244. Para ello se tomaron las siguientes condiciones:

**Tabla 4: Condiciones de síntesis para el escalado a 4 moles.**

VARIABLES	CONDICIONES
Nitroetano (mL)	285.28 (4 mol)
Isobutilamina (mL)	15.67 (0.15 mol)
Furfural (mL)	331.32 (4 mol)
Tiempo de contacto (h)	0.5
Temperatura (°C)	120
Tiempo de reacción (h)	3.5

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en las purificaciones del principio activo en trabajos anteriores (Z.Rodríguez y col. (2006), se plantearon las siguientes condiciones de purificación:

**Tabla 5: Condiciones para la purificación.**

VARIABLES	CONDICIONES
Etanol (mL/g de UC-244)	4
Carbón Activado (g/g de UC-244)	0.5
Tiempo de Contacto (min)	10
Temperatura (°C)	50

**2.7 Aplicación de las condiciones óptimas de síntesis del diseño 2<sup>5-2</sup> al escalado a 6 moles.**

Con el objetivo de lograr obtener una mayor masa de este principio activo, para lograr satisfacer las posibles demandas que se requieran, dada las múltiples aplicaciones probadas que tiene el UC-244, se decide realizar un estudio a un escalado mayor, para ello se toman las cantidades necesarias de reactivos para lograr sintetizar 6 moles de UC-244. Se realizaron 2 réplicas de la síntesis en las mejores condiciones obtenidas del diseño a 2 moles, pero variando la cantidad de nitroetano, actuando el furfural como sustancia limitante.

**Tabla 6: Condiciones de síntesis para el escalado a 6 moles.**

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

Se mantuvieron las mismas condiciones de purificación que se plantearon anteriormente.

**Tabla 7: Condiciones para la purificación, escalado 6 moles.**

VARIABLES	CONDICIONES
Etanol (mL/g de UC-244)	4
Carbón Activado (g/g de UC-244)	0.5
Tiempo de Contacto (min)	10
Temperatura (°C)	50

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

Se aplica un diseño factorial fraccionado  $2^{5-2}$  que consta de 8 experimentos para seleccionar las mejores condiciones de síntesis del principio activo a escala de 6 moles. Las 5 variables seleccionadas, así como los niveles estudiados se muestran en la tabla 8:

**Tabla 8: Variables y niveles del diseño  $2^{5-2}$  en la síntesis de 6 moles.**

VARIABLES		NIVEL INFERIOR	NIVEL SUPERIOR	INCREMENTO
X <sub>1</sub>	Nitroetano	456.4 ml (6.4 mol)	484.97 ml (6.8 mol)	28.57 ml (0.4 mol)
X <sub>2</sub>	Isobutilamina	23.5 ml (0.224 mol)	27.41 ml (0.261 mol)	3.91 ml (0.037 mol)
X <sub>3</sub>	Tiempo de contacto	0.5 h	1 h	0.5 h
X <sub>4</sub>	Temperatura	120°C	130°C	10°C
X <sub>5</sub>	Tiempo de reacción	4.5 h	5 h	0.5 h

La matriz del diseño se presenta en la tabla 9. Las funciones respuestas seleccionadas para evaluar este diseño son: *el rendimiento analítico de la síntesis y la pureza del UC-244 crudo.*

**Tabla 9: Matriz del diseño  $2^{5-2}$  aplicado a la síntesis a escala de 6 moles.**

	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>
<b>1</b>	-	-	-	+	-
<b>2</b>	+	-	-	-	+
<b>3</b>	-	+	-	-	+
<b>4</b>	+	+	-	+	-
<b>5</b>	-	-	+	+	+
<b>6</b>	+	-	+	-	-
<b>7</b>	-	+	+	-	-
<b>8</b>	+	+	+	+	+

$$X_4 = X_1X_2$$

$$X_5 = X_1X_2X_3$$

Al evaluar los resultados de los experimentos del diseño se aplicó el programa Statgraphics plus versión 4.1 para obtener los coeficientes de la función respuesta (% de rendimiento y la pureza de UC-244 crudo) y su significación estadística.

### **2.9 Replicado de las mejores condiciones de síntesis en el diseño $2^{5-2}$ a 6 moles, al evaluar la Función Respuesta: Rendimiento.**

Se realizan dos réplicas en las mejores condiciones obtenidas en el diseño factorial fraccionado  $2^{5-2}$  referido en el acápite 2.8, aplicado al proceso de síntesis del UC-244, al evaluar la Función Respuesta: Rendimiento.

Para ello se toman 456.4 mL nitroetano y 27.5 mL de isobutilamina, se ponen en contacto por un tiempo de 0.5 horas a una temperatura de 130°C, luego de pasado este período se agregan el 497 mL de furfural dejándolo reaccionar por un espacio de 5 horas. Posteriormente se filtra el producto crudo que ha sido cristalizado a baja temperatura.

### **2.10 Influencia de diferentes factores en el proceso de purificación.**

Para garantizar la homogeneidad del producto que se sometería a la purificación se realiza una mezcla tres crudos obtenidos en síntesis anteriores y se purifica aplicando un diseño factorial  $2^3$  que consta de 8 experimentos, a fin de seleccionar las mejores condiciones. Para ello se tomaron 50 g del principio activo para cada purificación y se disuelven en etanol. Luego se pone en contacto el UC-244 disuelto en etanol con el carbón activado por un espacio de 15 minutos. Se filtra y se enfría a baja temperatura. Posteriormente, se realiza un proceso de recristalización, para ello se disuelve el UC-244 en etanol, se filtra dejándolo enfriar a bajas temperaturas. El UC-244 obtenido, se seca en una estufa a 32°C durante una hora y luego se mantiene en una desecadora por un tiempo de 24 horas.

La matriz del diseño, así como las variables estudiadas y sus niveles se muestran en las tablas 10 y 11, respectivamente. Las funciones respuestas seleccionadas para evaluar este diseño son: *el rendimiento de la purificación y la pureza del UC-244.*

**Tabla 10: Factores y niveles del diseño fraccionado  $2^3$  aplicado al proceso de purificación del UC-244.**

VARIABLES		NIVEL INFERIOR	NIVEL SUPERIOR
X <sub>1</sub>	Carbón Activado (g/g de UC-244)	0.3	0.5
X <sub>2</sub>	Etanol (mL/g de UC-244)	4	5
X <sub>3</sub>	Temperatura (°C)	40	50

**Tabla 11: Matriz del diseño  $2^3$  aplicado a la purificación.**

	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>
<b>1</b>	-	-	+
<b>2</b>	+	-	-
<b>3</b>	-	+	-
<b>4</b>	+	+	+
<b>5</b>	+	-	+
<b>6</b>	-	+	+
<b>7</b>	+	+	-
<b>8</b>	-	-	-

Al evaluar los resultados de los experimentos del diseño se aplicó el programa Statgraphics plus versión 4.1 para obtener los coeficientes de la función respuesta (% de rendimiento de purificación y pureza del UC-244) y su significación estadística.

### **2.11 Replicado de las mejores condiciones de purificación al evaluar la Función Respuesta: Pureza.**

Se realizaron 2 réplicas de la purificación en las mejores condiciones obtenidas en el diseño  $2^3$ , referido en el acápite 2.10, al evaluar la Función Respuesta: Pureza.

Para ello se tomaron 50 g del principio activo para cada purificación y se disuelven en 200 mL de etanol a 40°C. Luego se pone en contacto el UC-244 disuelto en etanol con 25 g de carbón activado por un espacio de 15 minutos. Se filtra y se enfría a baja temperatura. Posteriormente, se realiza un proceso de recristalización, para ello se

disuelve el UC-244 en etanol, se filtra dejándolo enfriar a bajas temperaturas. El UC-244 obtenido, se seca en una estufa a 32°C durante una hora y luego se mantiene en una desecadora por un tiempo de 24 horas.

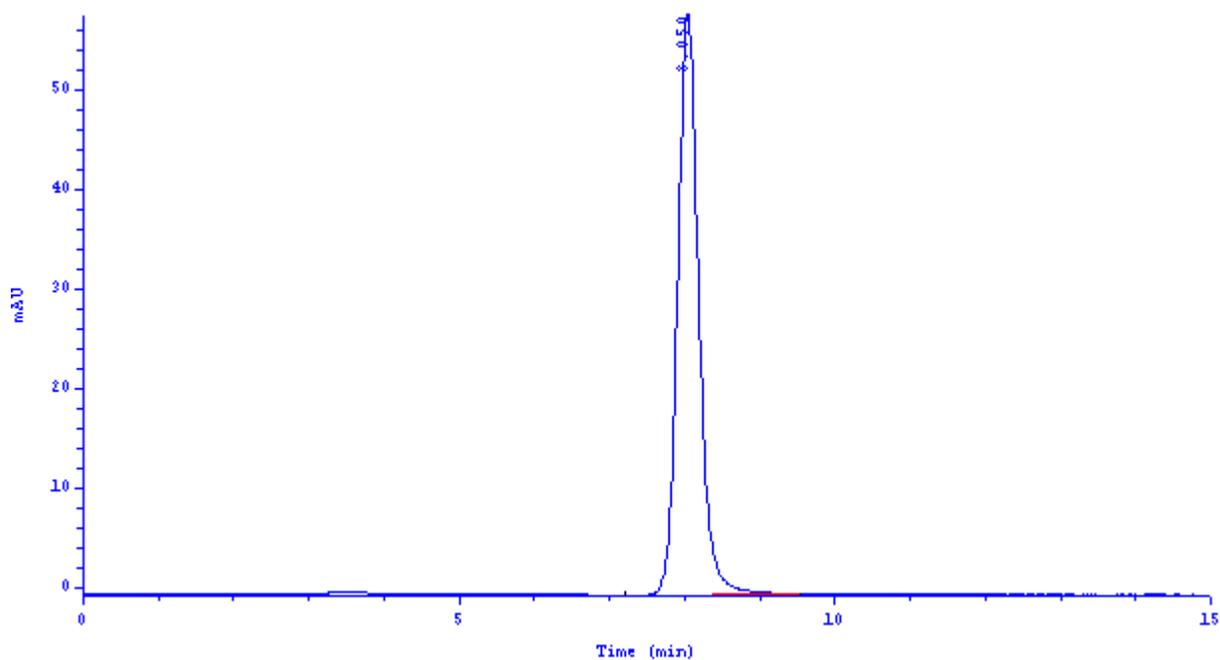
### **2.12 Aplicación de las mejores condiciones de síntesis y purificación**

Se realiza una síntesis en las mejores condiciones obtenidas en el diseño factorial fraccionado  $2^{5-2}$  referido en el acápite 2.8, aplicado al proceso de síntesis del UC-244, al evaluar la Función Respuesta: Rendimiento. A este crudo obtenido se le aplica el proceso de purificación en las mejores condiciones obtenidas en el diseño  $2^3$ , referido en el acápite 2.10, al evaluar la Función Respuesta: Pureza. Con el fin de evaluar el balance total del proceso de síntesis y purificación.

## **CAPÍTULO III: ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS**

### **3.1 Preparación del patrón de UC-244.**

Se obtiene un lote de UC-244 mediante purificaciones sucesivas con etanol y carbón activado y tres recristalizaciones con etanol, y se determina su pureza por HPLC resultando el área bajo la curva de 100 % y un tiempo de retención de 8.050 min. Se le determinó la temperatura de fusión, encontrándose esta entre los 46.7 y 47.7 °C, lo que se encuentra acorde a lo señalado en la literatura. En la figura 2 se muestra el cromatograma por HPLC de una muestra patrón de UC-244.



**Figura 2: Cromatograma por HPLC del patrón de UC-244.**

### **3.2 Parámetros Calidad para una materia prima.**

#### **Descripción:**

En la figura 3 se observa el patrón de UC-244 utilizado. En estado cristalino es un sólido de color amarillo, de olor penetrante y sabor característico.



**Figura 3: Muestra patrón de UC-244.**

#### **Residuos de ignición:**

Al realizar el análisis de residuos de ignición a una muestra del patrón de UC-244, se comprobó que contiene 0.05 % de materia no volátil, por lo que está por debajo del valor máximo permisible de 0.1 %.

#### **Metales pesados:**

Al realizar el análisis de metales pesados a una muestra del patrón de UC-244, se comprobó que cumple con los límites establecidos, al encontrarse por debajo de los 20 $\mu$ g/g (0.002 %) de metales pesados.

#### **Registro del espectro UV:**

En la figura 4 se muestra el espectro realizado para el UC-244 en etanol con el objetivo de corroborar la longitud de onda de máxima absorción, siendo esta de 350 nm.

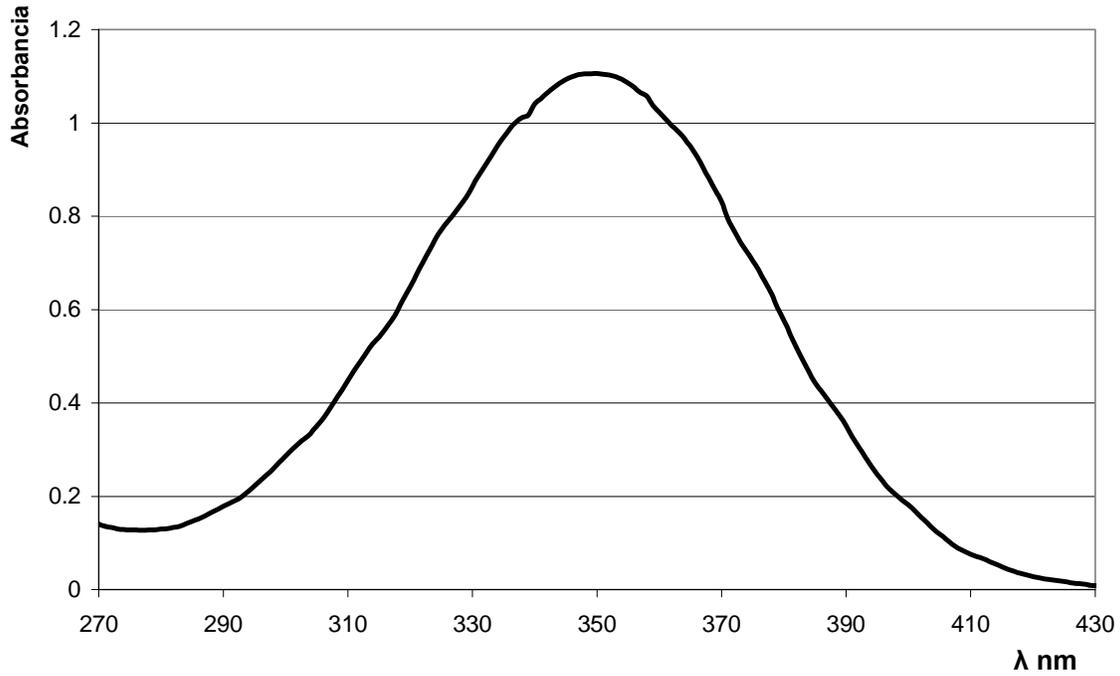


Figura 4: Espectro de UC-244.

### 3.3 Comprobación de algunos parámetros de validación de la técnica analítica

#### 3.3.1 Linealidad

En la figura 5 y el Anexo 1 se muestra los resultados del estudio de linealidad realizado al patrón de UC-244.

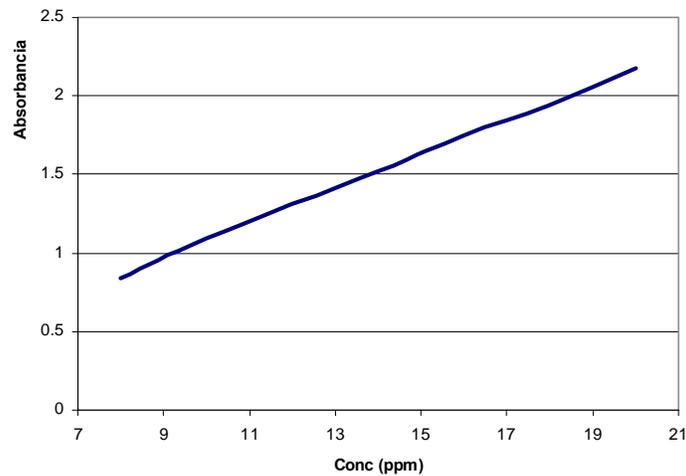


Figura 5: Curva de calibración de UC-244

### Capítulo III: Análisis y Discusión de los Resultados

Ecuación de la curva de calibración:  $Abs = -0.0437707 + 0.111156 * Conc$

Coefficiente de correlación: 0.9983.

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

**Tabla 12: Resultados del estudio de linealidad en la determinación de UC-244.**

Conc (ppm)	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs 4	f 1	f 2	f 3	f 4
7.9984	0.837	0.785	0.855	0.794	0.1046	0.0981	0.1069	0.0993
8.0048	0.873	0.828	0.811	0.851	0.1091	0.1034	0.1013	0.1063
9.998	1.091	1.029	1.095	1.091	0.1091	0.1029	0.1095	0.1091
10.006	1.093	1.103	1.091	1.074	0.1092	0.1102	0.1090	0.1073
13.9972	1.523	1.537	1.511	1.498	0.1088	0.1098	0.1080	0.1070
14.0084	1.537	1.494	1.477	-	0.1097	0.1067	0.1054	-
15.9968	1.78	1.751	1.749	1.733	0.1113	0.1095	0.1093	0.1083
16.0096	1.761	1.752	1.758	1.751	0.1100	0.1094	0.1098	0.1094
17.9964	1.927	1.94	1.972	1.952	0.1071	0.1078	0.1096	0.1085
18.0108	1.901	1.937	1.971	-	0.1055	0.1075	0.1094	-
19.996	2.174	2.186	-	-	0.1087	0.1093	-	-
20.012	2.154	2.172	-	-	0.1076	0.1085	-	-

Siendo el coeficiente de variación de la función respuesta 2.69 %, el cual es menor que el 5 %, que es el criterio de aceptación para este parámetro.

#### Test de linealidad de la pendiente:

$$t_{exp} > t_{tabulada} \quad (\alpha = 0.05 \text{ y } v = 40)$$

111.3006 >> 2.021 (Se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa  $m \neq 0$ ).

Límites de confianza:

$$0.111156 \pm 0.0020183$$

Este valor indica que la probabilidad de ser  $m \neq 0$  es elevada, superior al 99.9%.

#### Test de Proporcionalidad del intercepto:

$$t_{exp} < t_{tabulada} \quad (\alpha = 0.05 \text{ y } v = 40)$$

-3.062 < 2.021 (Se acepta la hipótesis nula  $b=0$ ).

Límites de confianza:

$$-0.0437707 \pm 0.028888$$

El intervalo de confianza incluye al cero por tanto se cumple la condición de proporcionalidad.

Con los resultados anteriores se corrobora la linealidad de la respuesta analítica de la técnica.

### 3.3.2 Precisión

En la tabla 13 y 14 se muestran los resultados de la repetibilidad y reproducibilidad respectivamente, realizados con un patrón de UC-244.

**Tabla 13: Resultados de repetibilidad.**

Analista	Réplicas	Abs	Conc.(ppm)	Tratamiento estadístico
1	1	1.091	10.23	$X_m = 10.2$ $S = 0.108$ $CV = 1.05\%$
	2	1.103	10.32	
	3	1.091	10.21	
	4	1.074	10.06	

**Tabla 14: Resultados de reproducibilidad**

Analista	Réplicas	Abs	Conc. (ppm)	Tratamiento estadístico
1	1	1.091	10.21	$X_m = 10.1$ $S = 0.21$ $CV = 2.08\%$
	2	1.029	9.65	
	3	1.095	10.24	
	4	1.091	10.21	
2	1	1.091	10.23	
	2	1.103	10.32	
	3	1.091	10.21	
	4	1.074	10.06	

Siendo los coeficientes de variación para la repetibilidad y la reproducibilidad menores que el 3% y el 5 % respectivamente que son los criterios de aceptación, por tanto el método es preciso.

### 3.3.3 Exactitud.

Los resultados de la evaluación de la exactitud en el rango de concentraciones entre 8 y 14 ppm de UC-244 se muestran en la tabla 15.

**Tabla 15: Resultados del estudio de la exactitud.**

CONCENTRACIÓN TEÓRICA	8 ppm	10 ppm	14 ppm
Recobro (%)	99.06	102.10	100.70
	93.21	96.52	101.60
	101.09	102.46	99.92
	94.22	102.10	99.09
	103.03	102.20	101.51
	97.97	103.10	98.75
	96.06	102.02	97.66
	100.56	100.49	
Recobro Medio (%)	98.15	101.37	99.89
Coef. Variación (%)	3.51	2.06	1.48
T de Student Exp.	1.66	1.88	0.19
T de Student Tab.	3.499		3.707

Como se observa los valores de la  $t_{exp} < t_{tab}$  en los niveles de concentración ensayados por lo que el método analítico es exacto.

### 3.3.4 Determinación del límite de cuantificación.

En las tablas 16 y 17 se muestran los valores del estudio del límite de cuantificación y el porcentaje de recobro en las cercanías del límite de cuantificación respectivamente.

**Tabla 16: Límite de cuantificación.**

REPLICAS	2 ppm	4 ppm	<b>6 ppm</b>	8 ppm
1	2.166	4.172	5.971	8.247
2	2.103	4.001	5.647	7.842
3	2.265	4.316	5.998	7.689
4	2.265	4.064	6.061	8.049
CV (%)	3.61	3.33	<b>3.10</b>	3.07

**Tabla 17: Porcentaje de recobro en las cercanías del límite de cuantificación.**

REPLICAS	2 ppm	4 ppm	6 ppm	8 ppm
1	108.25	104.26	99.48	103.03
2	105.11	99.99	94.08	97.97
3	113.20	107.86	99.93	96.06
4	113.20	101.56	100.98	100.56
RECOBRO MEDIO (%)	109.94	103.42	<b>98.62</b>	99.40

Los resultados de la precisión obtenidos en niveles de concentraciones muy bajos son aceptables hasta

### 3.4 Aplicación de las condiciones óptimas de síntesis del diseño $2^{5-2}$ al escalado a 4 moles.

Los resultados obtenidos al escalar a 4 moles, en las mejores condiciones del diseño  $2^{5-2}$  a 2 moles (Función Respuesta: Rendimiento), se presentan en la tabla 18.

**Tabla 18: Resultados de las síntesis a 4 moles, al aplicar las mejores condiciones del diseño  $2^{5-2}$  a 2 moles, evaluando la Función Respuesta: Rendimiento.**

NO RÉPLICA	MASA TEÓRICA	MASA CRUDO	% REND. SÍNTESIS	MASA PURO	%REND. PURIF	%REND. PROCESO
1	612.54 g	439.0 g	71.66	326.0 g	74.25	53.22
2	612.54 g	502.0 g	81.95	400.5 g	79.78	65.38

Se obtiene un Rendimiento Promedio de Síntesis de 76.80 %, superior a los valores de rendimiento obtenidos en el escalado a 2 moles, por lo que se decide proceder a realizar un escalado mayor.

### 3.5 Aplicación de las condiciones óptimas de síntesis del diseño $2^{5-2}$ al escalado a 6 moles.

Los resultados obtenidos al escalar a 6 moles en las mejores condiciones del diseño  $2^{5-2}$  evaluado a 2 moles (Función Respuesta: Rendimiento), se presentan en la tabla 19.

**Tabla 19: Resultados de las síntesis a 6 moles, al aplicar las mejores condiciones del diseño  $2^{5-2}$  a 2 moles , evaluando la Función Respuesta: Rendimiento.**

NO RÉPLICA	MASA TEÓRICA	MASA CRUDO	% REND. SÍNTESIS	MASA PURO	%REND. PURIF	%REND. PROCESO
1	918.82 g	371.0 g	40.37	316.52 g	86.12	34.39
2	918.82 g	488.5 g	53.16	374.0 g	76.56	40.70

Media Rendimiento de Síntesis: 46.76%

Los resultados obtenidos en este escalado solamente llegan a un 46%, encontrándose por debajo de los resultados obtenidos en el escalado a 4 moles. Por estas razones se realiza el estudio de los factores de síntesis a esa escala.

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

En la tabla 20 se presentan los resultados de las funciones respuesta: rendimiento y pureza, del diseño  $2^{5-2}$  aplicado en 6 moles.

**Tabla 20: Resultados obtenidos al aplicar el diseño factorial fraccionado  $2^{5-2}$  en la síntesis del principio activo a escala de 6 moles.**

NO RÉPLICA	MASA TEÓRICA	MASA CRUDO	%REND. SÍNTESIS	% PUREZA
1	918.82 g	401.0 g	43.64	93.25
2	918.82 g	461.0 g	50.17	86.17
3	918.82 g	734.3 g	79.91	82.52
4	918.82 g	542.7 g	59.06	87.01
5	918.82 g	555.5 g	60.45	88.31
6	918.82 g	402.0 g	43.75	93.64
7	918.82 g	461.2 g	50.19	90.34
8	918.82 g	683.3 g	74.36	77.23

### Capítulo III: Análisis y Discusión de los Resultados

Al procesar los resultados evaluando las funciones respuesta: rendimiento y pureza, en los experimentos realizados se obtienen las mejores condiciones que se presentan a continuación en la tabla 21 y 22 respectivamente.

**Tabla 21: Mejores condiciones de síntesis a escala de 6 moles evaluando la Función Respuesta: Rendimiento, en el diseño  $2^{5-2}$ .**

VARIABLES	NIVELES	MEJORES CONDICIONES
Nitroetano (mL)	-	456.4 (6.4 mol)
Isobutilamina (m)	+	27.5
Tiempo contacto (h)	-	0.5
Temperatura ( $^{\circ}$ C)	+/-	130
Tiempo reacción (h)	+	5

Del análisis de varianza y de regresión múltiple realizado (Anexo 2) resultan todos los coeficientes de las variables no significativos, obteniéndose la siguiente ecuación estimada para la función respuesta % de Rendimiento:

$$\% \text{ Rendimiento} = 57.6913 - 0.85625 * \text{Nitroetano} + 8.18875 * \text{IBA} - 0.50375 * \text{Tiempo de Contacto} + 1.68625 * \text{Temperatura} + 8.53125 * \text{Tiempo de Reacción}$$

**Tabla 22: Mejores condiciones de síntesis a escala de 6 moles evaluando la Función Respuesta: Pureza, en el diseño  $2^{5-2}$ .**

VARIABLES	NIVELES	MEJORES CONDICIONES
Nitroetano (mL)	-	456.4 (6.4 mol)
Isobutilamina (m)	-	23.5
Tiempo contacto (h)	+/-	1 / 0.5
Temperatura ( $^{\circ}$ C)	-	120
Tiempo reacción (h)	-	4.5

### Capítulo III: Análisis y Discusión de los Resultados

Del análisis de varianza y de regresión múltiple realizado (Anexo 3) resultan significativos los coeficientes de las variables IBA y Tiempo de reacción, obteniéndose la siguiente ecuación estimada para la función respuesta % de Pureza:

$$\% \text{ Pureza} = 87.3088 - 1.29625 * \text{Nitroetano} - 3.03375 * \text{IBA} + 0.07125 * \text{Tiempo de Contacto} - 0.85875 * \text{Temperatura} - 3.75125 * \text{Tiempo de Reacción}.$$

#### 3.7 Replicado de las mejores condiciones de síntesis en el diseño $2^{5-2}$ a 6 moles al evaluar la Función Respuesta: Rendimiento.

En la tabla 23 se muestran los resultados de las síntesis realizadas en las mejores condiciones obtenidas al evaluar la Función Respuesta: Rendimiento, el diseño experimental fraccionado  $2^{5-2}$  a escala de 6 moles.

**Tabla 23: Resultados de las síntesis, al aplicar las mejores condiciones del diseño  $2^{5-2}$  a 6 moles, evaluando la Función Respuesta: Rendimiento.**

NO RÉPLICA	MASA TEÓRICA	MASA CRUDO	% REND. SÍNTESIS	% PUREZA
1	918.82 g	645.0 g	70.19	82.43
2	918.82 g	793.8 g	86.39	81.28

Media del Rendimiento de Síntesis: 80.22 %

Los resultados obtenidos en el escalado a 6 moles llegan a un 80.22%, siendo superior al resultado obtenido en el escalado a 4 moles (76.80%).

### 3.8 Influencia de diferentes factores en el proceso de purificación.

En la tabla 24 se presentan los resultados de las funciones respuesta: rendimiento y pureza, del diseño  $2^3$  aplicado.

NO RÉPLICA	MASA INICIAL	MASA PURA	%REND. PURIF.	% PUREZA
1	50.0 g	30.71 g	61.42	96.65
2	50.0 g	23.80 g	47.60	96.27
3	50.0 g	33.17 g	66.34	96.16
4	50.0 g	24.67 g	49.34	97.16
5	50.0 g	25.50 g	51.00	96.12
6	50.0 g	34.54 g	69.08	78.22
7	50.0 g	23.50 g	47.00	95.55
8	50.0 g	30.50 g	61.00	95.15

Al procesar los resultados evaluando las funciones respuesta: rendimiento y pureza, en los experimentos realizados se obtienen las mejores condiciones que se presentan a continuación en la tabla 25 y 26 respectivamente.

**Tabla 25: Mejores condiciones de purificación evaluando la Función Respuesta: Rendimiento, en el diseño  $2^3$ .**

VARIABLES	NIVELES	MEJORES CONDICIONES
Carbón Activado (g/g de UC-244)	-	0.3
Etanol (mL/g de UC-244)	+	5
Temperatura (°C)	+	50

Del análisis de varianza y de regresión múltiple realizado (Anexo 4) se obtiene la siguiente ecuación estimada para la función respuesta % de Rendimiento, resultando significativo el coeficiente de la variable Carbón Activado:

$$\% \text{ Rendimiento} = 56.5975 - 7.8625 * \text{Carbón Activado} + 1.3425 * \text{Etanol} + 1.1125 * \text{Temperatura}.$$

**Tabla 26: Mejores condiciones de purificación evaluando la Función Respuesta: Pureza, en el diseño 2<sup>3</sup>.**

VARIABLES	NIVELES	MEJORES CONDICIONES
Carbón Activado (g/g de UC-244)	+	0.5
Etanol (mL/g de UC-244)	-	4
Temperatura (°C)	-	40

Del análisis de varianza y de regresión múltiple realizado (Anexo 5) no resulta significativo ninguno de los coeficientes, obteniéndose la siguiente ecuación estimada para la función respuesta % de Pureza:

$$\% \text{ Pureza} = 93.91 + 2.365 * \text{Carbón Activado} - 2.1375 * \text{Etanol} - 1.8725 * \text{Temperatura}.$$

### 3.9 Replicado de las mejores condiciones de purificación al evaluar la Función Respuesta: Pureza.

En la tabla 27 se muestran los resultados de las dos réplicas realizadas a la purificación de una masa del producto sintetizado en las mejores condiciones obtenidas al evaluar la Función Respuesta: Pureza, en el diseño 2<sup>3</sup> aplicado al proceso de purificación.

**Tabla 27: Resultados de las réplicas de purificación, al aplicar las mejores condiciones del diseño 2<sup>3</sup>, evaluando la Función Respuesta: Pureza.**

NO RÉPLICA	% PUREZA
1	99.09
2	98.18

Media del porcentaje de pureza: 98.63 %

Los resultados obtenidos están por encima de un 98 % de pureza, el cual es el criterio de aceptación para la formulación de medicamentos veterinarios.

### **3.10 Aplicación de las mejores condiciones de síntesis y purificación**

Los resultados obtenidos en la síntesis y purificación de a escala de 6 moles son las siguientes:

**Tabla 28: Porcentaje del rendimiento obtenido en los procesos de síntesis y purificación a escala de 6 moles**

MASA TEÓRICA	MASA CRUDO	% REND. SÍNTESIS	MASA PURO	%REND. PURIF	%REND. PROCESO
918.82 g	801.0 g	87.18	397.5 g	49.62	43.26

**Tabla 29: Porcentaje de la pureza del producto crudo y purificado.**

% PUREZA DEL CRUDO	% PUREZA DEL PURO
77.53	98.66

Tomando los rendimientos de la síntesis de 6 moles en las mejores condiciones referidos en la Tabla 23 y el resultado anterior en las mismas condiciones se obtiene un Rendimiento Promedio de Síntesis de 81.25%.

Es de resaltar que el rendimiento y la pureza obtenidos al combinar las mejores condiciones de síntesis y de purificación obtenidas mediante la aplicación de los diseños experimentales referidos anteriormente, resultan satisfactorios, obteniéndose una Eficiencia Total del Proceso de 43.26 %. A pesar de la baja eficiencia total del proceso este resultado permite llevar a cabo el proceso en la Planta con la finalidad de su formulación para uso veterinario ya que su pureza cumple los requisitos de las Normas para la fabricación de medicamentos de uso veterinario (British Pharmacopeia, 2002).

## **CONCLUSIONES**

1. La técnica de Espectrofotometría UV-VIS combinada con una separación previa de Cromatografía de capa delgada, empleando como fase móvil Éter de petróleo – cloroformo (2:1), resultó ser lineal, exacta y específica. Su límite de cuantificación se encuentra en 6 ppm.
2. El proceso de escalado a 4 moles, con las mejores condiciones obtenidas para el escalado a 2 moles permitió obtener un rendimiento promedio de síntesis de 76.80 %, superior a los valores de rendimiento obtenidos anteriormente.
3. El proceso de escalado a 6 moles, con las mejores condiciones obtenidas para el escalado a 2 moles resultó ineficiente al obtenerse un rendimiento de 46.76%.
4. Se desarrolla un procedimiento de síntesis del UC-244 a escala de 6 moles, alcanzándose purezas superiores al 98 %, donde se logra el 80 % de rendimiento de UC-244 en síntesis (base crudo), un 50 % en el rendimiento de la purificación, lo que permite obtener un rendimiento total estimado del proceso de 43 %.

## **RECOMENDACIONES**

1. Continuar los estudios de los factores que intervienen en los procesos de síntesis y purificación del UC-244, con el objetivo de elevar su Eficiencia Total.
2. Realizar estudios de posibles impurezas indeterminadas, que pudieran aparecer, producto de reacciones colaterales en la síntesis.
3. Realizar estudios sobre la desactivación de los licores, los alcoholes y el carbón que constituyen residuales de los procesos de síntesis y purificación.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria. Resolución - RDC nº 136, del 29 de mayo de 2003. Registro de Medicamento Nuevo. Sitio web visitado en abril 2007. <http://www.anvisa.gov.br/esp/index.htm>
- Agüero M. (1997) “Planteamiento y estudio de la influencia de la acomplejación de la Beta – Ciclodextrina en la estabilidad del UC-244”. Trabajo de Diploma. UCLV. Curso 1996 –1997, Cuba.
- Alpizar J. M, Albertus F. H., A.( 1993), “Métodos Electrométricos de Análisis”. Editorial Pueblo y Educación, Cuba.
- Báez R., Bernal N. (1998) “Métodos de análisis para la realización de la norma analítica de los productos G-1 y UC-244”. Trabajo de Diploma. UCLV. Cuba.
- Bernardo Noriega, Francisco. Patentes Farmacéuticas. Universidad de Barcelona. Sitio web visitado en abril de 2007. [http://www.pcb.ub.es/centredopatents/pdf/cursos/dillunsCP/bernardo\\_patentesfarmaceuticas.pdf](http://www.pcb.ub.es/centredopatents/pdf/cursos/dillunsCP/bernardo_patentesfarmaceuticas.pdf)
- British Pharmacopoeia Commission Secretariat (2002), Ed. British Pharmacopoeia.
- Castiñeiras Díaz, Mirta (1986). Control de medicamentos I. Editorial Pueblo y Educación. Ciudad Habana. 300p.
- Castro, M (1989). “Folleto de validación” Hewlett Packard. 1989.
- Caveda, LI., Padrón, JL., (1991). Evaluación de la actividad antiinflamatoria del UC-244. Informe Técnico. Centro de Química Farmacéutica, La Habana.
- Cordobés, C., (1993). Evaluación de la actividad acaricida del UC-244 mediante el test de larvas de Bophilus microplus. Informe técnico. Estación Nacional Experimental de Parasitología (ENEP). La Habana.
- Colectivo de autores (1984). Compendium de medicamentos. Editorial de Ciencias Médicas. La Habana.

- Delgado, M. (1993) “Aplicación de la espectroscopia UV-VIS en la caracterización y cuantificación de los productos G-0 y UC-244”. Trabajo de Diploma. UCLV. 1992- 1993. Cuba.
- Enciclopedia Microsoft® Encarta® 2000. © 1993-1999 Microsoft Corporation.
- Estrada, E., (1994). Relación estructura-mutagenicidad de 2- furiletilenos. Informe Técnico. Centro de Bioactivos Químicos. UCLV. Santa Clara.
- Farmacopea de los E.U.M. (2003), octava edición, México.
- García Ruiz, Antonio J. “Medicamentos Genéricos“. Universidad de Málaga. Departamento de Farmacología y Terapéutica Clínica. Facultad de Medicina. Sitio web visitado en abril de 2007. <http://www.uma.es>
- Gilbert H Ayres “Análisis Químico Cuantitativo”. University of Texas. Austin Harper Row Publisher INC. New York 1970.
- Gonzáles L. E. (1992) “Estabilidad física de diferentes formulaciones del derivado furánico UC-244 en forma de semisólido”. Trabajo de Diploma. UCLV. Curso 1991-1992.Cuba.
- Heftmann, E.(1967) “Chromatography”. Second Edition. pp 179-180. 1967.
- Laboratorios CINFA. Conceptos claves de medicamentos genéricos. Sitio web visitado en abril de 2007. <http://www.cinfa.com/es/>
- Loy, S., Garcia, D., Fernández, Y.,(1998). Evaluación de la actividad antiinflamatoria del compuesto bioactivo UC-244. Informe Técnico. Laboratorio de Farmacología Experimental. Departamento de Farmacia. Facultad de Química y Farmacia . UCLV.
- Machado R. y colaboradores. “Utilización del UC-244 para el control de plagas en granos almacenados destinados a semillas y como sustrato para la la producción de estomopatógenos”. Laboratorio de Sanidad Vegetal Minagri. Comunicación personal 2003.
- Martínez M. T. (1994) “Estudio de purificación y estabilidad del principio activo UC-244”. Trabajo de Diploma. UCLV. Curso 1993 – 1994.
- Meyer. V., Wiley, J. (1993) “Practical High-Performance Liquid Chromatography”. 1993.

- Morrinson, R.T. y Boyd, R.N. (1983). Química Orgánica. Universidad de Nueva York, versión en español, 4ta. Edición. Fondo Educativo Interamericano, México.
- Olazábal, E., (1991). Acción acaricida del UC-244. Informe Técnico. Grupo de Parasitología del Centro de Bioactivos Químicos de la UCLV. Santa Clara.
- Pérez, JA., (1988). Evaluación farmacológica y toxicológica del UC-244 en ratas y conejos de laboratorio. Tesis doctoral. Universidad de Leipzig. Alemania.
- Randerath, K. (1969) "Cromatografía de Capa Fina". Ediciones Urmo. pp 72-78. 1969.
- Rodríguez M., Valdés T. (1996) "Validación de los métodos de determinación de pureza de los principios activos G-1, G-0 y UC-244". Trabajo de Diploma. UCLV. Curso 1995-1996.
- Rodríguez R, Martín E. (1994) "Resultados preliminares a escala de laboratorio de Laboratorio del control de coleópteros de importancia en la agricultura". Comunicación personal 2003. UCLV.
- Rodríguez, Z. (2002) "Intensificación del Proceso de Producción del 2-(2-nitrovinil)-furano". Tesis de doctorado. 2002. Cuba.
- Salazar E y colaboradores (1996). "Uso de un nuevo formulado UC-244 CE 25 % para el control de acaros en ajo". Comunicación personal 2003. Cuba.
- Saucedo Castillo, O. (2004). Resultados parciales de los estudios sobre la efectividad del UC 244 CE 25% sobre el control de granos almacenados. Comunicación personal. UCLV.
- Sanchez, Celeste . Intercambiabilidad Terapéutica de Medicamentos Multiorigen. La Situación en Cuba, una Actualización Necesaria. C. CECMED. Sitio web visitado en abril de 2007. <http://www.scf.sld.cu/ppt/uso-racional/2.ppt>
- Skoog, A.D. (1997) "Análisis instrumental". McGraw-Hill 4ta edición. pp 6-10. 1997.
- Skoog, A.D. (1990), West D.M. "Análisis Instrumental". McGraw-Hill 2da edición. pp 157-213, 739-740. 1990.
- Torres L. (2003) "Desarrollo de una técnica combinada por CCD-UV para la cuantificación del 2-(2-nitrovinil)-furano". Trabajo de diploma. UCLV. Curso 2002-2003. Cuba.

## ***Bibliografía***

- Ugalde, M.(1993) “Estudios Preliminares de la estabilidad de las materias primas G-0 y UC-244”. Trabajo de Diploma. UCLV. 1992-1993. Cuba.
- US Pharmacopea XXIII (1986).
- Wealth Management / 4° trimestre 2005. Industria farmacéutica: la innovación es decisiva. Sitio web visitado en abril 2007.  
[http://www.ubs.com/1/ShowMedia/ubs\\_ch/wealth\\_mgmt\\_ch/wmmagazine/archivo?contentId=86701&name=esp%5CWm4\\_05-22\\_23-ESP-0811.pdf](http://www.ubs.com/1/ShowMedia/ubs_ch/wealth_mgmt_ch/wmmagazine/archivo?contentId=86701&name=esp%5CWm4_05-22_23-ESP-0811.pdf).
- Willard, H.(1991) “Métodos Instrumentales de Análisis”. Grupo editorial Ibero América. pp 115-190. 1991.
- Zumuoalt, R., y colaboradores. (1971). “Chromatography” 55, pp 267-280. 1971.

**ANEXOS**

**Anexo 1:**

**Análisis de linealidad de la técnica combinada CCD- UV-VIS aplicada al patrón de UC-244.**

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

Dependent variable: A

Independent variable: CONC

Parameter	Standard Estimate	T Error	Statistic	P-Value
Intercept	0.0348054	0.0318525	1.09271	0.2882
Slope	0.103359	0.00292962	35.2807	0.0000

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	6.15537	1	6.15537	1244.73	0.0000
Residual	0.093958	19	0.00494516		
Total (Corr.)	6.24933	20			

Correlation Coefficient = 0.992454

R-squared = 98.4965 percent

Standard Error of Est. = 0.0703218

**Anexo 2:****Análisis de Varianza para la Función Respuesta: Rendimiento, en el diseño  $2^{5-2}$  para la síntesis de 6 moles.**

Analysis of Variance for Rendimiento - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
<b>MAIN EFFECTS</b>					
A:IBA	536.445	1	536.445	7.87	0.1070
B:Nitroetano	5.86531	1	5.86531	0.09	0.7969
C:T Contacto	2.03011	1	2.03011	0.03	0.8789
D:Temperatura	582.258	1	582.258	8.54	0.0998
E:TReaccion	22.7475	1	22.7475	0.33	0.6218
RESIDUAL	136.293	2	68.1463		
TOTAL (CORRECTED)	1285.64	7			

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

Level	Count	Std. Mean	Lower Error	Upper Limit	Limit
GRAND MEAN	8	57.6912			
Isobutilamina					
+	4	65.88	4.12754	48.1206	83.6394
-	4	49.5025	4.12754	31.7431	67.2619
Nitroetano					
+	4	56.835	4.12754	39.0756	74.5944
-	4	58.5475	4.12754	40.7881	76.3069
Tiempo de Contacto					
+	4	57.1875	4.12754	39.4281	74.9469
-	4	58.195	4.12754	40.4356	75.9544
Temperatura					
+	4	66.2225	4.12754	48.4631	83.9819
-	4	49.16	4.12754	31.4006	66.9194
Tiempo de Reacción					
+	4	59.3775	4.12754	41.6181	77.1369
-	4	56.005	4.12754	38.2456	73.7644

**Análisis de Regresión Múltiple para la Función Respuesta: Rendimiento, en el diseño  $2^{5-2}$  para la síntesis de 6 moles.**

Regression coeffs. for Rendimiento

-----  
 constant = 57.6913  
 A:Nitroetano = -0.85625  
 B:IBA = 8.18875  
 C:T.Contacto = -0.50375  
 D:Temp = 1.68625  
 E:T.Reacción = 8.53125  
 -----

Analysis of Variance for Rendimiento

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:Nitroetano	5.86531	1	5.86531	0.09	0.7969
B:IBA	536.445	1	536.445	7.87	0.1070
C:T.Contacto	2.03011	1	2.03011	0.03	0.8789
D:Temp	22.7475	1	22.7475	0.33	0.6218
E:T.Reaccion	582.258	1	582.258	8.54	0.0998
Total error	136.293	2	68.1463		
-----					
Total (corr.)	1285.64	7			

R-squared = 89.3988 percent  
 R-squared (adjusted for d.f.) = 62.896 percent  
 Standard Error of Est. = 8.25507  
 Mean absolute error = 3.10125

**Anexo 3:****Análisis de Varianza para la Función Respuesta: Pureza, en el diseño  $2^{5-2}$  para la síntesis de 6 moles.**

Analysis of Variance for Pureza - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
<b>MAIN EFFECTS</b>					
A:IBA	73.6291	1	73.6291	25.01	0.0377
B:NE	13.4421	1	13.4421	4.57	0.1661
C:T.Contacto	0.0406125	1	0.0406125	0.01	0.9172
D:T.Reaccion	112.575	1	112.575	38.25	0.0252
E:Temperatura	5.89961	1	5.89961	2.00	0.2925
RESIDUAL	5.88703	2	2.94351		
TOTAL (CORRECTED)	211.473	7			

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

Level	Count	Std. Mean	Lower Error	Upper Limit	Limit
GRAND MEAN	8	87.3088			
IBA					
+	4	84.275	0.857833	80.584	87.966
-	4	90.3425	0.857833	86.6515	94.0335
NE					
+	4	86.0125	0.857833	82.3215	89.7035
-	4	88.605	0.857833	84.914	92.296
T.Contacto					
+	4	87.38	0.857833	83.689	91.071
-	4	87.2375	0.857833	83.5465	90.9285
T.Reaccion					
+	4	83.5575	0.857833	79.8665	87.2485
-	4	91.06	0.857833	87.369	94.751
Temperatura					
+	4	86.45	0.857833	82.759	90.141
-	4	88.1675	0.857833	84.4765	91.8585

**Análisis de Regresión Múltiple para la Función Respuesta: Pureza, en el diseño  $2^{5-2}$  para la síntesis de 6 moles.**

Regression coeffs. for Pureza

-----  
 constant = 87.3088  
 A:Nitroetano = -1.29625  
 B:IBA = -3.03375  
 C:TCont = 0.07125  
 D:Temp = -0.85875  
 E:TReacción = -3.75125  
 -----

Analysis of Variance for Pureza

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:Nitroetano	13.4421	1	13.4421	4.57	0.1661
B:IBA	73.6291	1	73.6291	25.01	0.0377
C:TCont	0.0406125	1	0.0406125	0.01	0.9172
D:Temp	5.89961	1	5.89961	2.00	0.2925
E:TReacción	112.575	1	112.575	38.25	0.0252
Total error	5.88702	2	2.94351		
-----					
Total (corr.)	211.473	7			

R-squared = 97.2162 percent  
 R-squared (adjusted for d.f.) = 90.2567 percent  
 Standard Error of Est. = 1.71567  
 Mean absolute error = 0.64875

**Anexo 4:****Análisis de Varianza para la Función Respuesta: Rendimiento, en el diseño  $2^3$  para la purificación.**

Analysis of Variance for Rendimiento - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:Temp	9.90125	1	9.90125	1.25	0.3254
B:Etanol	14.4185	1	14.4185	1.83	0.2479
C:Carbon	494.551	1	494.551	62.67	0.0014
RESIDUAL	31.567	4	7.89175		
TOTAL (CORRECTED)		550.438	7		

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

Level	Count	Std. Mean	Lower Error	Upper Limit	Limit
GRAND MEAN	8	56.5975			
Temp					
-1	4	55.485	1.40461	51.5852	59.3848
1	4	57.71	1.40461	53.8102	61.6098
Etanol					
-1	4	55.255	1.40461	51.3552	59.1548
1	4	57.94	1.40461	54.0402	61.8398
Carbon					
-1	4	64.46	1.40461	60.5602	68.3598
1	4	48.735	1.40461	44.8352	52.6348

**Análisis de Regresión Múltiple para la Función Respuesta: Rendimiento, en el diseño 2<sup>3</sup> para la purificación.**

Regression coeffs. for Rendimiento

---

constant	= 56.5975
A:Carbon Activado	= -7.8625
B:Etanol	= 1.3425
C:Temperatura	= 1.1125

---

Analysis of Variance for Rendimiento

---

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:Carbón Activado	494.551	1	494.551	62.67	0.0014
B:Etanol	4.4184	1	14.4184	1.83	0.2479
C:Temperatura	9.90125	1	9.90125	1.25	0.3254
Total error	31.567	4	7.89175		
<hr/>					
Total (corr.)	550.438	7			

R-squared = 94.2651 percent

R-squared (adjusted for d.f.) = 89.9639 percent

Standard Error of Est. = 2.80923

Mean absolute error = 1.9075

**Anexo 5:****Análisis de Varianza para la Función Respuesta: Pureza, en el diseño 2<sup>3</sup> para la purificación.**

Analysis of Variance for Pureza - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:Carbon	44.7458	1	44.7458	1.02	0.3686
B:Etanol	36.5513	1	36.5513	0.84	0.4120
C:Temp	28.05	1	28.05	0.64	0.4677
RESIDUAL	174.642	4	43.6606		
TOTAL (CORRECTED)	283.99	7			

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

Level	Count	Std. Mean	Lower Error	Upper Limit	Limit
GRAND MEAN	8	93.91			
Carbon					
-1	4	91.545	3.30381	82.3721	100.718
1	4	96.275	3.30381	87.1021	105.448
Etanol					
-1	4	96.0475	3.30381	86.8746	105.22
1	4	91.7725	3.30381	82.5996	100.945
Temp					
-1	4	95.7825	3.30381	86.6096	104.955
1	4	92.0375	3.30381	82.8646	101.21

**Análisis de Regresión Múltiple para la Función Respuesta: Pureza, en el diseño 2<sup>3</sup> para la purificación.**

Regression coeffs. for Pureza

-----  
 constant = 93.91  
 A:Carbon Activado = 2.365  
 B:Etanol = -2.1375  
 C:Temp = -1.8725  
 -----

Analysis of Variance for Pureza

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:Carbon Activado	44.7458	1	44.7458	1.02	0.3686
B:Etanol	36.5513	1	36.5513	0.84	0.4120
C:Temp	28.05	1	28.05	0.64	0.4677
Total error	174.643	4	43.6606		
Total (corr.)	283.99	7			

R-squared = 38.5039 percent  
 R-squared (adjusted for d.f.) = 0.0 percent  
 Standard Error of Est. = 6.60762  
 Mean absolute error = 3.65375