

Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas
Facultad Química y Farmacia
Departamento de Licenciatura en Química
Centro de Bioactivos Químicos

Trabajo de Diploma



Título: Estudio de las mejores condiciones de síntesis y purificación del UC-244.

Autor: Denio Perez Muñoz

**Tutoras: Dra. Zenaida Rodríguez Negrín
M.C. Gisela Peralta Meseguer**

Curso: 2005 – 06.

Índice

Introducción

Características del UC-244.....

Objetivos.....

Capítulo 1 Revisión bibliográfica

 1.1 Características del UC-244.....

 1.2 Furfural o furfuraldehido.....

 1.3 Funguicidas.....

 1.4 Arácnidos

 1.4.1 Garrapata

 1.5 Fundamento de las técnicas analíticas

 1.5.1 Cromatografía en capa delgada.....

 1.5.2 Potenciometría

 1.5.3 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

 1.5.4 Espectrofotometría directa UV-VIS

 1.6 Estudio Cinético.....

 1.7 Parámetros de validación

 1.7.1 Linealidad

 1.7.2 Precisión.....

 1.7.3 Sensibilidad, Limite de detencion y cuantificacion

Capítulo 2 Parte experimental.....

 2.1 Método combinado de CCD-Espectrofotometría UV

 2.2 Reactivos y equipamiento

 2.2.1 Reactivos químicos

 2.2.2 Utensilios y medios de medición

 2.3 Métodos.....

2.3.1 Selección de la fase móvil para la cromatografía de capa delgada.....	
2.3.2 Estudio cinético de la degradación del UC-244.....	
2.3.3 Preparación de la curva de calibración	
2.3.4 Determinación de la precisión	
2.3.5 Determinación de la especificidad	
Capítulo 3 Análisis y discusión de los resultados	
3.1 Selección de la fase móvil para la cromatografía de capa delgada.....	
3.2 Estudio cinético.....	
3.3 Validación de la técnica bajo las condiciones experimentales optimizadas	
Conclusiones	
Recomendación.....	
Bibliografía	

Introducción:

En el Centro de Bioactivos Químicos se ha trabajado en la síntesis de compuestos que presentan actividad biológica como el 1-(fur-2-il)-2-nitroprop-1-eno, más conocido como UC-244, el que presenta propiedades garrapaticidas, fungicidas y bactericidas, con potenciales aplicaciones en la medicina veterinaria (Olazábal, E.; 1991).

Para la introducción de los procesos de obtención, purificación y control de la calidad del principio activo UC-244 crudo a escala de planta piloto, resulta necesario realizar un estudio de las condiciones óptimas de síntesis y purificación del mismo, como continuación de las investigaciones realizadas por Rodríguez, Z. y otros, en las cuales se desarrolla un estudio inicial a escala de 0.5 mol, lográndose rendimientos que no cubren las exigencias para este tipo de proceso (Hernández, M.; 2004).

La aplicación del 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. Es necesario por lo tanto contar con técnicas analíticas fiables y factibles que permitan evaluar las funciones respuestas de los diseños de experimentos que se apliquen en el estudio de las condiciones de reacción y de purificación. Para este fin pueden ser aplicadas la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), la Cromatografía de Gases (GC), la Polarografía Diferencial de Pulso (PDP), 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 y la Potenciometría.

Por todo lo anterior se plantea el 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, con una reducción de los costos.

Teniendo en cuenta lo anterior, se propone el siguiente **Objetivo general:**

Lograr la optimización del proceso de síntesis y purificación de UC-244 a escala de 2 moles mediante un aumento del rendimiento y de la pureza del principio activo, que permita alcanzar rendimientos totales del proceso, superiores a los alcanzados en trabajos anteriores, siendo económicamente viable y ambientalmente compatible.

Para el logro del mismo este trabajo se propone los siguientes **Objetivos Específicos:**

- Obtener las condiciones óptimas para la síntesis y la purificación del UC-244 a escala de 2 moles en las condiciones de laboratorio, mediante diseño de experimentos.
- Aplicar los parámetros de síntesis y purificación obtenidos mediante los diseños experimentales desarrollados a fin de comprobar experimentalmente su validez.
- Aplicar las técnicas de Espectrofotometría UV-VIS y HPLC 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 1 Revisión Bibliográfica.

1.1 Requisitos para la fabricación de principios activos.

Los requisitos mínimos necesarios para las buenas prácticas de fabricación de fármacos o principios activos están normados en cada país. Son de carácter obligatorio para los establecimientos dedicados a la fabricación de los fármacos o principios activos.

Se denomina **Buenas prácticas de fabricación**, al conjunto de lineamientos y actividades relativas al control del personal, equipo, instalaciones, documentación, materiales, y de todas las etapas del proceso de fabricación a fin de garantizar que los fármacos elaborados cumplan con las especificaciones establecidas.

En general contienen:

Requisitos generales para la fabricación, Plan de contingencias, Catálogo de sustancias que se manejan en la empresa, Hojas de seguridad.

Personal: Las funciones de los puestos relacionados directamente con la producción del fármaco deben establecerse por escrito. Se debe contar con personal calificado apoyado en un programa documentado para la capacitación y entrenamiento en las funciones que le sean asignadas y en lo referente a buenas prácticas de fabricación. El personal debe portar la indumentaria y el equipo de protección necesario e idóneo, para evitar la contaminación de los productos y de las áreas de fabricación; el cual debe estar definido en un PNO.

Unidad de calidad: La unidad de calidad debe ser independiente de la unidad de producción. La unidad de calidad debe realizar las siguientes actividades:

1. Aprobar o rechazar, en su caso, materia prima, producto intermedio, terminado y material de envase y empaque de acuerdo al cumplimiento de las especificaciones de calidad.
2. Autorizar las actividades de reproceso, retrabado, recuperación de materia prima, producto intermedio y terminado.
3. Verificar el cumplimiento de los PNO's en las actividades que se llevan a cabo en los procesos de producción.
4. Establecer y controlar programas, para demostrar la estabilidad de los fármacos.
5. Mantener un museo de las muestras de retención de producto terminado, el cual debe mantenerse cuando menos un año después de la fecha de caducidad del mismo.
6. Revisar y aprobar la documentación generada por cada lote fabricado, desviaciones a los procesos, quejas de los clientes, control de productos rechazados, programa de certificación o aprobación de proveedores.
7. Emitir los certificados analíticos.

8. Revisar y aprobar los protocolos de validación.
9. Controlar y aprobar los envases, así como la emisión y el manejo de las etiquetas del fármaco.

Unidad de producción: La unidad de producción debe realizar las siguientes actividades:

1. Vigilar que las instrucciones relacionadas con las operaciones de producción se cumplan.
2. Asegurar el mantenimiento y limpieza de la unidad de producción de acuerdo al PNO correspondiente
3. Asegurar que en cada proceso de producción se realicen las calificaciones y validaciones requeridas.
4. Verificar que los documentos de producción sean evaluados y firmados por la persona autorizada antes de su envío a la unidad de calidad.
5. Elaborar y tener disponibles los PNO's de uso de los equipos y su capacidad en relación con el tamaño estándar del lote que puede producirse con una determinada tecnología, así como llevar el registro de uso de cada uno de los equipos.
6. Elaborar y tener disponibles los PNO's en los que se definan: las condiciones de operación que deben mantenerse durante la producción, el tipo de controles y los límites de las variables de operación, y los servicios necesarios para llevar a cabo las operaciones de producción.
7. Elaborar los procedimientos de operación, limpieza y mantenimiento de los equipos.
8. Elaborar, autorizar, revisar y evaluar la documentación soporte de operación de producción.

Equipos:

1. En la definición de las características de los equipos deberán participar todos aquellos involucrados en su uso a efecto de que las características de diseño y funcionamiento correspondan óptimamente a las necesidades de cada área.
2. El equipo utilizado para la fabricación de fármacos, debe tener un diseño, tamaño, construcción y ubicación que facilite su operación, limpieza y mantenimiento.
3. Debe existir un programa de calibración y mantenimiento del equipo y de los instrumentos empleados para medir las variables del proceso, así como llevar un registro del uso, mantenimiento y calibración de ellos, los que deben conservarse por lo menos un año. Asimismo, se debe contar con PNO's para la calibración y mantenimiento de cada uno de los equipos e instrumentos, en donde se indique el tiempo y el procedimiento a seguir.

4. Debe registrarse la fecha, hora y componente utilizado de acuerdo a la orden de producción correspondiente cada vez que se haga uso del equipo.
5. El equipo que se utilice para fabricar fármacos debe estar construido de tal forma que las partes que estén en contacto con el fármaco no sean reactivas, aditivas, absorbentes o adsorbentes de manera que no alteren la calidad especificada del producto terminado.
6. El equipo debe estar construido para que cualquier sustancia requerida para la operación del equipo, como lubricantes o refrigerantes, no tenga contacto con el fármaco y puedan alterar la calidad especificada.
7. Deben existir PNO's para la limpieza y mantenimiento del equipo, en el que se considere los materiales que se deben emplear para la correcta limpieza y mantenimiento de cada uno de ellos. Se debe contar además, con un registro de la limpieza y mantenimiento para cada equipo.

Orden maestra de producción: Debe incluir tamaño de lote, nombre o código del producto a producir, nombre y firma de quién elaboró, revisó y aprobó el documento, la fecha, además de los siguientes datos:

1. Nombre de cada componente y su cantidad.
2. Grado de calidad o especificaciones de cada componente, o ambos.
3. Intervalos de las variables del proceso que pueden ser permitidas.
4. Rendimiento teórico esperado del producto terminado y en las fases del proceso donde se requiera, incluyendo sus límites máximos y mínimos.
5. Descripción completa de cada operación, equipo utilizado en el proceso, controles y precauciones.
6. Control de tiempo, cuando proceda.
7. Los pasos del proceso en los que se efectúa el muestreo.

Orden de producción: La orden de producción para cada lote debe ser copia fiel de la orden maestra de producción y ser verificada para su exactitud, fechada y firmada por personal autorizado, incluyendo adicionalmente lo siguiente:

1. Número de lote del producto y de los componentes.
2. Fecha y hora en que se realiza cada etapa del proceso de producción.
3. Registro de la información requerida en cada etapa del proceso de producción y quién realiza la operación.
4. Firma de una segunda persona en las etapas críticas del proceso de producción, asentada en la orden.
5. justificación de ajustes de los componentes y de las variables del proceso.
6. rendimiento obtenido.

Expediente de lotes y partidas:

1. Se debe contar con un expediente para cada lote y partida, que incluya la información relacionada con la producción y control, como lo requiere la orden de producción.
2. Los expedientes deben conservarse cuando menos cinco años después de la fecha de producción del fármaco o un año después de su fecha de caducidad o reevaluación, pero en cualquier caso siempre será el tiempo más largo.

Procedimientos de control de la producción:

1. Los procedimientos de control deben contar con PNO's donde se establezca que:
2. Los procesos de producción deben ser supervisados por personal calificado.
3. Los controles deben ser llevados a cabo en forma manual o mediante equipo automático el cual debe estar calificado, o en el caso de equipo electrónico debe ser validado.
4. Se debe identificar el equipo, tuberías, áreas y envases durante todo el proceso de producción.
5. La manera como deben ser lavados, identificados y almacenados los envases y equipos utilizados en el proceso de producción.
6. Indiquen las medidas necesarias para prevenir la contaminación cruzada de cualquier producto durante la producción y almacenamiento.
7. El agua utilizada en el proceso de producción debe ser por lo menos de calidad potable.
8. Existan registros de los controles a intervalos establecidos dependiendo de cada proceso en particular.
9. El producto intermedio y el terminado debe mantenerse en retención temporal o resguardado debidamente identificado hasta que sea dictaminado por la unidad de calidad.
10. Los lotes de los productos intermedios y terminados que estén fuera de especificaciones, deben segregarse e identificarse, documentando la razón del dictamen y el destino del material.
11. La liberación de los productos intermedios y terminados debe ser realizada por personal de la unidad de calidad antes de su uso o distribución.
12. Cualquier desviación significativa en el proceso, en los requerimientos de control o en los rendimientos, dará lugar a una investigación realizada por el personal autorizado y la unidad de calidad, misma que debe extenderse hasta donde sea necesario realizando un informe autorizado por la unidad de calidad que incluya las conclusiones y las acciones a tomar.

Envasado y etiquetado del fármaco:

1. Los recipientes, tapas y otras partes del envase primario que entren en contacto con el fármaco no deben ser reactivos, aditivos, absorbentes o adsorbentes o que alteren de alguna manera la calidad del producto; asimismo, deben proveer protección para evitar su deterioro y contaminación.
2. Deben existir PNO's para:
3. Definir la manera cómo deben ser inspeccionados los envases.
4. El control de las operaciones de envasado y etiquetado.
5. Determinar las acciones a seguir para evitar confusiones.
6. Identificar los pasos a seguir para asegurar que sólo pueden ser distribuidos aquellos productos que cumplan con las especificaciones establecidas.
7. debe existir evidencia documentada de las operaciones de envasado y etiquetado.
8. no deben envasarse y/o etiquetarse simultáneamente dos o más productos diferentes en una misma área.
9. las etiquetas excedentes, obsoletas o defectuosas deben ser destruidas, lo cual debe ser documentado.
10. la etiqueta de identificación para venta debe contener, además de lo que establece el Reglamento, la siguiente información:
11. El nombre del producto.
12. La identificación y domicilio del fabricante y, en su caso, del distribuidor.
13. Las instrucciones para su conservación (condiciones de almacenamiento).
14. La fecha de caducidad o reevaluación.
15. El número de lote.
16. Las leyendas precautorias o precauciones de manejo, de acuerdo a las características del producto.
17. Contenido o peso neto.
18. Número de envase.

Controles de laboratorio e inspección:

1. Los controles de laboratorio e inspecciones deben apoyarse en normas, PNO's o manuales que contengan las especificaciones para garantizar la confiabilidad de sus resultados. Tales controles deben incluir:
2. Muestreo, métodos de análisis y especificaciones para la dictaminación de materias primas y materiales de envase utilizados en la fabricación, así como para el control del proceso, producto intermedio y terminado. Cuando aplique, estos procedimientos deben establecer la reinspección de materias primas y materiales de envase.
3. Uso, manejo, almacenamiento y control de reactivos analíticos, soluciones valoradas y sustancias de referencia que cumplan con las especificaciones establecidas.
4. Uso y registro de calibración de los aparatos de laboratorio e instrumentos de medición.

5. Emisión de certificados analíticos elaborados en hojas membretadas y firmados por el responsable sanitario.
6. Validación de métodos analíticos utilizados por la empresa, no farmacopeicos o farmacopeicos que tengan desviaciones frente a la farmacopea de referencia.
7. Estudios de estabilidad.
8. Uso de bioterio en caso de que para el control de algún producto terminado se requieran animales de laboratorio. Alternativamente se puede recurrir a los servicios de un laboratorio auxiliar a la regulación sanitaria.
9. Investigación para las desviaciones o errores en el laboratorio, o ambos.
10. Criterios para llevar a cabo remuestreos y reanálisis.
11. Se deben conservar muestras de retención de cada lote, envasadas e identificadas, conteniendo como mínimo la cantidad necesaria para dos análisis completos.
12. El almacenamiento de las muestras debe ser congruente con las condiciones que garanticen la estabilidad del producto indicado en la etiqueta y deben retenerse por lo menos un año después de la fecha de caducidad o reevaluación del fármaco.
13. Los registros analíticos de laboratorio deben incluir:
14. Descripción de la muestra, número de lote y fecha de recepción.
15. Referencia del método analítico utilizado, además de todos los cálculos y resultados obtenidos.
16. Relación de reactivos, soluciones, instrumentos, aparatos y sustancias de referencia utilizados en el análisis.
17. Descripción completa de cualquier modificación o desviación que se presente durante el proceso analítico, las causas de la misma y las acciones a tomar de acuerdo con el PNO correspondiente.
18. Fecha, nombre y firma de la persona que realizó el análisis y de la segunda persona que realice la verificación.

Homogeneizado:

1. Todo proceso de homogeneización debe realizarse de acuerdo con un PNO específico para cada producto y documentar la operación.
2. Los lotes de producto terminado que se utilizan en la preparación de mezclas, deben estar aprobados por la Unidad de Calidad y no haber llegado a su fecha de reanálisis o caducidad.
3. Toda mezcla debe homogeneizarse, no debiendo utilizarse lotes de productos cuyo proceso haya sido modificado y no validado.
4. El proceso de homogeneización debe ser validado.
5. La mezcla obtenida debe:
6. Cumplir con las especificaciones del producto.
7. tener un código de control que permita la rastreabilidad de los lotes de donde proviene.

8. Tener una fecha de caducidad o reevaluación que tome como base la correspondiente al lote más viejo utilizado en la mezcla.
9. No podrán realizarse homogeneizaciones de lotes que no cumplan especificaciones, remanentes de producto o de muestras para obtener un nuevo lote para venta.

Recuperación, reproceso y retrabado:

Los disolventes, materias primas, productos intermedios y productos terminados, son susceptibles de recuperarse de acuerdo con un PNO. Si están fuera de especificaciones podrán ser sometidos a reproceso o retrabajo, para que cumplan con los requisitos del proceso donde se vayan a incorporar, requiriéndose en todos los casos una orden de fabricación específica. Se pueden reprocesar, recuperar o retrabajar:

1. Disolventes y catalizadores.
2. Materias primas, producto intermedio o terminado que no cumple con sus especificaciones.
3. Producto terminado que ha sido alterado en sus especificaciones durante su manejo o almacenamiento, o ambos.
4. Producto terminado rechazado por el cliente por no cumplir con sus especificaciones.
5. Producto obtenido de aguas madres o cosechas posteriores, o ambas.
6. Aguas madres en cuyo caso:
7. deben existir los PNO's en los que se consideren las actividades a seguir para el manejo y control de las aguas madres y cosechas posteriores.
8. Se pueden utilizar incorporándolas en la etapa correspondiente del proceso o ser procesadas por separado para obtener cosechas posteriores las cuales deben cumplir las especificaciones establecidas y las operaciones se registrarán en la orden de fabricación correspondiente.
9. Podrán ser procesadas por separado para la recuperación de materia prima o producto intermedio, siempre que cumplan con sus especificaciones.
10. El remanente del producto adherido, debe contar con un PNO para su manejo que considere como mínimo lo siguiente:
11. Las características del remanente para ser incorporado en alguna etapa del proceso.
12. Que en ningún caso se podrán utilizar estos remanentes para integrar o integrarse directamente al producto terminado.
13. La disposición final de los remanentes, sí aplica.
14. La rastreabilidad de cada uno de los remanentes.

Control de almacenamiento y distribución:

1. Materias primas.

2. Deberán contar con un PNO en donde se indique que debe asignarse un número de lote y manejarse de un modo ordenado, limpio y seguro.
3. El manejo del inventario de materia prima debe llevarse a cabo bajo el sistema de primeras entradas-primeras salidas.
4. Deben mantenerse en resguardo (cuarentena) hasta que hayan sido dictaminadas por la unidad de calidad.
5. Se deben recibir los envases previamente inspeccionados de acuerdo al PNO correspondiente.
6. Las materias primas rechazadas deben ser segregadas y manejadas de acuerdo con un PNO.
7. Producto terminado.
8. El manejo del producto terminado debe contar con un PNO en donde se indiquen las condiciones bajo las cuales se deben almacenar y transportar los fármacos para que no se altere su calidad.
9. El control de almacenamiento de producto terminado, debe incluir un sistema de primeras entradas-primeras salidas.
10. Debe existir un registro de almacenamiento y distribución, que contenga como mínimo: nombre y domicilio del consignatario, orden de compra o equivalente con nombre del fármaco, cantidad embarcada, fecha y número de lote.
11. Los registros deben conservarse por un periodo de cuando menos un año después de la distribución total del producto o hasta un año después de la fecha de caducidad o reevaluación, pero en cualquier caso siempre será el tiempo más largo.

Validación

1. Los procesos deben ser validados con base en protocolos que tomen en cuenta las etapas críticas de fabricación del fármaco, equipo, condiciones de operación, limpieza, instalaciones y personal.
2. El grado y alcance de la validación dependerá de la naturaleza y complejidad del producto y proceso involucrado.
3. Los equipos de fabricación deben ser calificados de acuerdo con protocolos que tomen en cuenta su diseño, construcción, instalación y operación.
4. La documentación relativa a los estudios de validación debe estar completa, ordenada y disponible, incluyendo la evidencia que demuestre la confiabilidad, reproducibilidad y efectividad de las etapas críticas del proceso.
5. Debe existir un sistema de control de cambios que regule las modificaciones que puedan afectar la calidad del producto o la reproducibilidad del proceso, o ambos, para que en su caso se efectúe la revalidación.

Tomado de: NORMAS DE BUENAS PRACTICAS DE MANUFACTURA (Productos Farmacéuticos). (2001); NORMA Oficial Mexicana NOM-164-SSA1-1998, Buenas prácticas de fabricación para fármacos.

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, SO_4^{2-} , 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 insoluble	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 problema.

La desecación de las sustancias que se descomponen por debajo de 100 grados se realiza en desecadoras con algunos agentes deshidratantes como el H₂SO₄ (ac), CaCl₂, etc o en desecadoras especiales a las cuales se les realiza vacíos previamente con el objetivo de disminuir la temperatura de desecación (Farmacopea Japonesa).

Determinación de agua por Kart Fischer

Se basa en la reacción cuantitativa que se produce entre el agua y un reactivo constituida por SO₂ y I₂ en forma anhidra y metanol, de acuerdo con las siguientes reacciones:



Después de que el agua ha reaccionado con el I₂ 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 (Farmacopea Japonesa).

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; Farmacopea Internacional).

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 (Farmacopea Internacional).

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. (R.Pombo, 1984).

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):

Fármacos	Contaminantes	Máximo Admisibles (%)
Acido acetil salicílico	Acido Salicílico	0.75
Epinefrina	Arteronol	4
Ergocalciferol	Hidroquinona	0.1
Fenacetina	p- cloroacetanilida	0.03
Sodio amobarbital	amobarbital	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

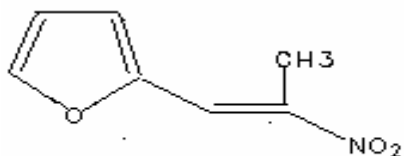
Teniendo en cuenta las estructuras de los compuestos se refieren (Baez,R. y Bernal, N.; 1988) diferentes métodos a utilizar en la determinación de su pureza:

Producto	Métodos Cuantitativos
G-0	<ol style="list-style-type: none">1. – Métodos volumétricos Determinación del nitrógeno total (Kjedhal} Reducción del grupo nitro y posterior valoración.2. – Espectrofotometría UV3. – Cromatografía gaseosa4. – Calorimetría de exploración diferencial5. – Polarografía6.
G –1	<ol style="list-style-type: none">1. Métodos volumétricos: Reflujo con KOH y valoración con Ag NO₃ Determinación de N₂ total.2. - Espectrofotometría UV3. - Cromatografía gaseosa4. – Calorimetría de exploración diferencial (11]5. – Polarografía6. – Métodos de combustión en balón de oxígeno.

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): 1-(fur-2-il)-2-nitroprop-1-eno.

Masa molar: 153 g/mol.

Fórmula global: C₇H₇O₃N.

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

$\nu_{C=C}$	1635 cm^{-1}
ν_{NO_2}	1500 y 1340 cm^{-1}
ν_{C-O-C}	1270 cm^{-1}
$\nu_{C=C}$	760 cm^{-1}
ν_{C-H}	del CH_3 2930 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.

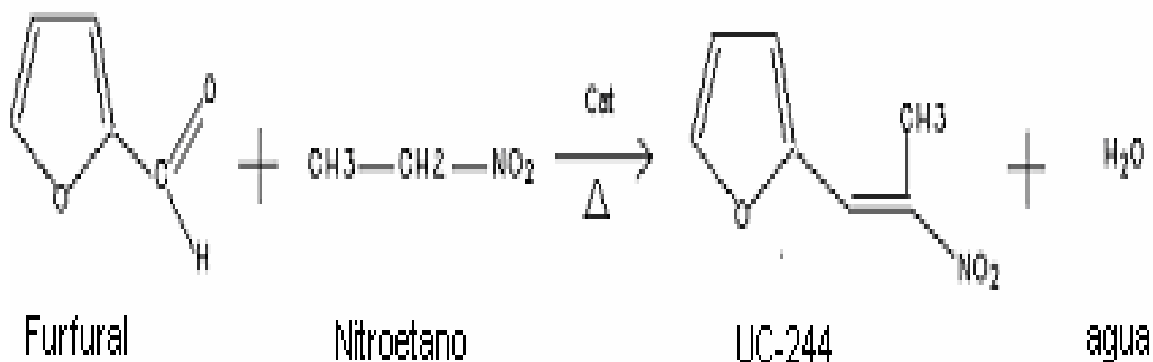
Influencia de la polaridad del solvente en la posición del máximo de absorción.

Solventes	UC-244 λ (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

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).

Mecanismo de reacción:



1.4 Materias primas de la síntesis de UC-244

Furfural, o furfuraldehído:

Aldehído orgánico líquido, de fórmula $C_5H_4O_2$, 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 $161,7\text{ }^\circ\text{C}$. 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^3

Solubilidad en agua: moderada ($4.5\text{ mL}/100\text{ mL}$ 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.

Por presentar propiedades acaricidas se ha comprobado que ataca la sarna psoróptica y zar cóptica, garrapatas ninfas, metaninfas y adultas, así como frente a la fasciola hepática. También se ha demostrado su actividad antiinflamatoria, aspecto que le confiere múltiples usos e importancia terapéutica.

En estudios toxicológicos realizados se encontró que es irritante para las mucosas y la piel en forma pura por lo que puede catalogarse como tóxico, aunque no existen criterios que lo invaliden en el aspecto terapéutico.

Este compuesto está aún bajo estudio, pero según ensayos realizados se ha demostrado su gran eficacia en la eliminación y el control de plagas muy dañinas como son una especie de coleópteros que ataca las gallinas ponedoras (Rodríguez, R. 1994). Otro insecto que ataca también es la mosca, aunque el G-0, sustancia también sintetizada en el Centro de Bioactivos Químicos es más efectivo.

El UC-244 ataca a los ácaros que tan perjudiciales son para los granos. Los estudios revelan que en el caso del ácaro del ajo del género *Rhizoglyphus*, al ser aplicado el compuesto al 25%, no afecta la brotación de la semilla ni el desarrollo posterior de la planta (Salazar, E.; 1996).

Los granos almacenados son generalmente los más afectados por esta plaga, sin embargo el UC-244 controla bastante ésta en el arroz de los almacenes. Sus vapores matan el *Zabrotes Subfasciatus* en el frijol Caupri, no afectan la posterior germinación de este y produce un efecto residual que protege al grano durante 30 días aproximadamente. Tampoco afecta su utilización como sustrato para el desarrollo de hongos *trichoderma sp* y *beauveria bassiana* e impide el desarrollo de los entomopatógenos cultivados sobre estos sustratos. 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.; 2003).

Fungicidas

Los fungicidas son sustancias tóxicas que se emplean para impedir el crecimiento o para matar los hongos y otras enfermedades perjudiciales que atacan los animales y las plantas. La mayoría de los fungicidas de uso agrícola se fumigan o espolvorean sobre las semillas, hojas o frutas para impedir la propagación de la enfermedad.

La mixtura de Burdeos, desarrollada en 1882 y compuesta de cal muerta y sulfato de cobre, fue el primer fungicida eficaz, durante muchas décadas fue empleado en una gran variedad de plantas y árboles frutales. Los fungicidas de hoy, mucho más variados, se emplean de un modo más selectivo, para combatir enfermedades en plantas específicas.

Otros fungicidas de uso común son los compuestos orgánicos de mercurio, eficaces en el tratamiento de las semillas antes de la siembra; y los ditiocarbamatos, compuestos que contienen azufre y se aplican en una gran variedad de cultivos, árboles y plantas ornamentales. Por lo general todos estos compuestos utilizados en la prevención y el combate de plagas son altamente tóxicos y la mayoría presenta metales pesados en su estructura, los que son altamente perjudiciales tanto para el hombre como para los animales las plantas y el medio ambiente en general.

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 periodo 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)

1.6 Toxicología

La molécula está compuesta fundamentalmente por el grupo nitro y el anillo furánico los que frecuentemente forman parte de sustancias de elevada toxicidad.

En el caso de compuestos con el grupo nitro, ellos son desechados por el cuerpo humano con mayor dificultad que otros compuestos lo que aumenta su acción dañina.

Los estudios farmacológicos realizados sustentan el uso de la molécula en el campo de terapéutica se refieren a sus propiedades antiinflamatorias y acaricidas.

Estas propiedades fueron demostradas en el Departamento de Farmacia de la Universidad Central Marta Abreu de las Villas (Loy, S. y otros; 1998), además por el Centro de Química Farmacéutica de la Habana (Caveda, LI. Y Padrón, JL.; 1991).

Por otra parte la acción acaricida se determinó por el grupo de parasitología de la estación nacional experimental de parasitología y el grupo de parasitología del 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 (mc) para ratas Wistar de sexo macho y hembra respectivamente. El criterio técnico toxicológico no considera esta molécula con limitaciones para ser empleadas como medicamento, puesto que en este rango es común encontrar en la inmensa mayoría de los medicamentos. En estudios realizados en la universidad de Leipzig, Alemania, se demostró que el órgano diana en caso de intoxicación por sobre dosis es el hígado, donde se produce la biotransformación de la molécula (Pérez, 1988).

Estudios teóricos basados en las características electrónicas moleculares de los grupos nitros en compuestos furiletílenos, han demostrado características

mutagénicas atribuidas a la presencia del grupo nitro sustituido en el anillo furánico, donde se favorece la reducción del mismo. Sin embargo, en el UC-244 no son susceptible a la reducción antes referida y por tanto no manifiesta la acción mutagénica (Estrada, E.; 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 cumplimentar su ruta crítica para el desarrollo de medicamento a medida que se cumplimentan los requisitos regulatorios, será posible ampliar los criterios de efectividad terapéutica e inocuidad. Hasta el momento, esta molécula muestra perspectivas en el campo de la terapéutica y no tiene limitaciones toxicológicas que limiten su uso en el campo de la industria farmacéutica.

1.7Diseño 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, cuantitativa y expresada mediante un valor único, así como efectivo estadísticamente.

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 (16) (Fernández, 2003).

1.8 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.

1.9 Espectrofotometría directa UV-VIS.

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

La región UV se divide en dos sub-regiones, la llamada UV al vacío o lejana, que se extiende desde 100 a 200 nm y la correspondiente al cercano de 200 a 350 nm. La región visible se extiende desde 350 hasta 780 nm.

Los espectros UV en estado líquido se determinan utilizando cubetas de cuarzo y a longitudes de onda superiores a los 350 nm se pueden sustituir por cubetas de vidrio. En el ultravioleta lejano hay gran absorción de oxígeno y nitrógeno, por lo que se necesita un material óptico especial y detectores especiales, además en él absorben los solventes más comunes lo que hace más compleja su selección. En el ultravioleta cercano absorben determinados grupos funcionales y requiere de cubetas de cuarzo pues el vidrio absorbe fuertemente en esta región. En el visible absorben fundamentalmente las insaturaciones conjugadas. Las bandas de absorción que presentan los compuestos orgánicos en las regiones UV- VIS se asocian comúnmente con transiciones electrónicas en la capa de valencia. Estas bandas de absorción son transiciones de tipo π - π^* , que pueden ser muy intensas (permitidas) o débiles (prohibidas); o n - π^* 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 - π^* pueden llegar a desaparecer.

En particular esto sucede en los compuestos en que las bandas n - π^* precedidas por bandas intensas π - π^* .

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 (ϵ_{\max}), 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. ;1993).

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

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

Esta ley se expresa como:

$$A = \epsilon b c$$

Donde:

ϵ : Coeficiente de extinción molar

b: camino óptico

c: concentración molar.

El comportamiento de una sustancia respecto a esta ley debe comprobarse realizando el ajuste de correlación lineal entre las absorbancias y las concentraciones correspondientes a cada disolución patron 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).

1.10 Cromatografía de capa delgada:

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

El instrumental usado es sencillo y barato, presenta alta sensibilidad y gran rapidez.

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

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

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

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

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

$$R_f = D_1/D_2$$

D₁: distancia del centro de la mancha al origen.

D₂: distancia del frente del eluyente al origen.

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

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

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

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

1.11 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Con el surgimiento de la cromatografía líquida de alta resolución se hace posible realizar determinaciones prácticamente imposibles por cromatografía de gases, como el análisis de polímeros sintéticos o naturales, de iones inorgánicos o de otras sustancias que, si bien se analizan por cromatografía de gases se obtiene mayor eficiencia y sensibilidad por HPLC.

Aunque hoy se acepta que un 85 % de los compuestos orgánicos sean analizables preferentemente por cromatografía de líquidos, queda un 15 % de sustancias cuya determinación es posible tan sólo por cromatografía de gases.

El término "cromatografía en fase líquida" significa, en su definición trivial, la "separación de mezclas de sustancias con líquidos", pero en el fondo caracteriza de forma muy acertada al conjunto de los mecanismos separadores que tienen lugar en el grupo de métodos que se basan en el mismo fundamento físico: la cromatografía en papel, la cromatografía en capa fina, la cromatografía de intercambio iónico, la cromatografía de permeación sobre gel, y las formas modernas de la cromatografía en fase líquida de alta presión, de alta velocidad o de gran eficacia.

A pesar del estudio intensivo de los mecanismos fundamentales y de las posibilidades resultantes de comprensión teórica de los procesos de separación cromatográfica, el aprovechamiento óptimo de este equipo por el químico analista requiere experiencia práctica de muchos años, que hay que ir

completando continuamente y modificar para cada problema de separación nuevo, sin poder resolver con ella en forma concluyente ciertos problemas fundamentales, como por ejemplo el de la transferencia de los resultados de una fase estacionaria a otra distinta.

La cromatografía es un método de separación el cual depende para su eficiencia de la distribución de equilibrio de las moléculas de soluto entre dos fases, una estacionaria sobre la cual fluye la segunda, aquellos solutos distribuidos preferentemente en la fase móvil podrían pasar rápidamente a través del sistema. La fase estacionaria está contenida en un tubo apropiado llamado columna; puede ser un sólido, un líquido soportado sobre un sólido o un gel y la fase móvil es bombeada (o en ocasiones fluye bajo gravedad) a través de la columna. La muestra es colocada en la punta de la columna usando un apropiado sistema de introducción de muestra y después de pasar a través de la columna los componentes separados son detectados usando un detector apropiado cuya salida se muestra en un registrador (Meyer, 1962).

Tabla 1: Resumen de las principales características del método HPLC.

HPLC	
FASE ESTACIONARIA	POCAS < 20
FASE MÓVIL	POCOS SOLVENTES(6 U 8+H₂O) SU COMBINACIÓN DA UN NÚMERO GRANDE
CAMPO DE TRABAJO (MASA MOLECULAR)	100-10⁷
FUNDAMENTO	SOLUBILIDAD DEL SOLUTO

1.12 Parámetros de validación

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

La necesidad de aplicar una validación se resume en:

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

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

Criterios numéricos para seleccionar métodos analíticos (Castro, 1989; Skoog, 1997) (ojo-se puede buscar alguna referencia más reciente)

- Linealidad
- Precisión
- Exactitud
- Sensibilidad
- Especificidad

Linealidad

Es la capacidad de un método analítico de obtener resultados linealmente proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un intervalo definido. El ensayo puede efectuarse tanto sobre soluciones patrón del analito como sobre muestras problemas que tengan concentraciones crecientes del analito. El intervalo lineal dinámico del sistema instrumental debe ser más amplio que el intervalo de las concentraciones a estudiar.

El numero de soluciones patrón puede estar comprendido entre 3 y 10 y el intervalo de concentraciones se seleccionara de acuerdo a las cantidades de analito esperadas en la muestra.

Si se supone que la concentración del analito puede variar ampliamente los patrones deberán abarcar todo el rango de concentraciones previsto. El tratamiento estadístico se realiza por el coeficiente de correlación (r) y ensayos de linealidad (Castro, 1989).

Precisión:

La precisión es el grado de concordancia entre los valores de una serie repetida de ensayos analíticos efectuados sobre una muestra homogénea. Expresa la capacidad que tiene el método de dar resultados semejantes cuando se aplican repetidamente en una muestra. La precisión mide el error aleatorio, o indeterminado de un análisis.

Los parámetros de calidad de la precisión son la desviación estándar absoluta, desviación estándar relativa, coeficiente de variación y varianza. En estas ecuaciones un valor razonable para la constante es k=3. Estos se definen a continuación:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N - 1}}$$

Desviación estándar absoluta, s

$$RSD = \frac{s}{\bar{x}}$$

Desviación estándar relativa, RSD

$$s_m = \frac{s}{\sqrt{N}}$$

Desviación estándar de la media, s_m

Coefficiente de variación, CV
Varianza,

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} \times 100\%$$
$$s^2$$

Dentro de la precisión se incluyen:

Repetibilidad: es la medida de la precisión de un método efectuado en las mismas condiciones, sobre la misma muestra, por un mismo analista, en el mismo laboratorio con los mismos equipos y reactivos efectuando estos análisis en un corto intervalo de tiempo. El ensayo se efectúa sobre una serie de porciones de una muestra homogénea que se analiza independientemente desde el principio hasta el fin bajo las mismas condiciones.

El número de repeticiones del análisis deberá ser superior a 5 y la concentración del analito suele ser similar a la declarada. Para este tipo de ensayos se realizan 6 determinaciones de la sustancia de interés al 100% del nivel normal de procedimiento, se calcula la media aritmética (\bar{x}), la desviación estándar (s), el coeficiente de variación (cv), tomando como criterio que el coeficiente de variación debe ser menor o igual al 3% (Castro, 1989).

Reproducibilidad: es la medida de la precisión de los resultados de un método analítico efectuados sobre una misma muestra pero en condiciones diferentes. Cuando la medida se realiza en laboratorios diferentes se habla de precisión inter laboratorios.

Para este tipo de estudio al igual que para la repetibilidad se recomienda hacer 6 determinaciones de la sustancia de interés al 100% del nivel normal del procedimiento y calcular el coeficiente de variación siguiendo el criterio de que el mismo sea igual o menor que el 5% para las técnicas o métodos analíticos (Castro, 1989; Chairman, W., 2000).

Selectividad y especificidad: Se define como la capacidad de un método analítico para medir exacta y específicamente el analito, sin interferencia de impurezas, producto de degradación, compuestos relacionados o excipientes que puedan estar presentes en la matriz de la muestra. Otros autores diferencian ambos términos y así consideran la selectividad como la capacidad de detectar un analito en una muestra que puede ser determinada con aceptable precisión y exactitud bajo condiciones experimentales establecidas.

La determinación de estos límites es laboriosa por lo que solo se realiza cuando el nivel inferior del rango del método analítico se acerca a los límites de detección o cuantificación (Castro, 1989).

Capítulo 2: Parte Experimental

2.1 Reactivos y Equipamiento:

Reactivos químicos:

Etanol técnico clase A, cloroformo (p.a.), isobutilamina, furfural, 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.

Micro jeringuilla Hamilton 88000 de 5 μ L.

Espectrofotómetro UV-VIS Marca Zuzi UV-4200.

Cubetas de cuarzo de 1 cm.

Pipeta graduada de 5 mL y 10 mL.

Pipeta aforada de 5 mL

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

2.2 Métodos empleados

Preparación del patrón de UC-244:

Se realiza la síntesis del UC-244 a partir de furfural, nitroetano y utilizando como catalizador la isobutilamina en las condiciones que se describen a continuación:

Posteriormente se filtra el producto crudo que ha sido cristalizado a baja temperatura. Luego se disuelve en etanol calentando y se agrega el carbón activado para eliminar impurezas, se filtra y se deja recrystalizar a bajas temperaturas. El proceso de recrystalización se repite tres veces. Se le

Se comprueba estadísticamente el cumplimiento del ajuste de correlación lineal (Coeficiente de variación de la función respuesta, Pruebas de significación de la pendiente y del intercepto y coeficiente de correlación). Para ello se aplica el programa Statgraphics plus versión 4.1.

Determinación de la precisión:

Reproducibilidad:

Se pesa en balanza analítica 0.025 g de UC-244, se disuelve en etanol y se enrasa en un matraz de 100 ml, se toman alícuotas de 4 ml se enrasan en matras de 50 de los cuales se toman alícuotas de 0.5, 1,2, 3,4, 5, 6, 7 y 8 ml y se enrasan en volumétricos de 10 ml. De estas soluciones se toman porciones de la capacidad de la cubeta de cuarzo y se procede a realizar la lectura de la absorbancia a 365 nm.

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

Especificidad

Para determinar si la longitud de onda seleccionada puede considerarse específica en las condiciones de la técnica, se registran los espectros UV-VIS de UC-244 purificado y crudo. En trabajos anteriores se ha determinado que las posibles impurezas debidas a los reactivos de síntesis, tales como furfural, nitroetano, isobutilamina, no constituyen interferencias espectrales, utilizando como solvente etanol (Maydel).

2.2.2. Cromatografía Líquida de alta resolución.

2.2.3 Cromatografía de capa delgada.

Se prepara una solución de UC-244 de aproximadamente 5 p.m., se aplica la mancha en las placas y se corren estas. La fase móvil empleada fue Eter de petróleo-Cloroformo (2:1).

En todos los casos se tomó en cuenta el color de la mancha y el Rf. para el análisis cualitativo del producto purificado..

2.3 Influencia de diferentes factores en el proceso de síntesis a escala de 0.5 moles.

Se aplica un diseño factorial fraccionado 2^{6-3} que consta de 8 experimentos para seleccionar las mejores condiciones de síntesis del principio activo. Las 6 variables seleccionadas, así como los niveles estudiados se muestran en la tabla. La matriz del diseño se presenta en la tabla. Las funciones respuestas seleccionadas para evaluar este diseño son: *el rendimiento analítico de la síntesis y la pureza del UC-244*. El diseño ha sido ajustado a un escalado de la síntesis de 0.5 moles del producto, posteriormente se llevó el diseño a un escalado de 2 moles tomando como base la función respuesta obtenida por el diseño de 0.5 moles.

Tabla 1: Factores y niveles del diseño fraccionado 2^{6-3} aplicado al proceso de síntesis del UC-244 a escala de 0.5 moles.

variables	reactivos	nivel inferior	nivel superior	nivel medio	incremento
X1	nitroetano	42	62	52	10
X2	isobutilamina	1.5	2.5	2	0.5
X3	etanol	0	10	5	5
X4	tiempo de contacto	0.5	1	0.75	0.25
X5	temperatura	100	120	110	10
X6	tiempo de reaccion	3.5	4	3.75	0.25

Tabla # 2: Matriz del diseño 2^{6-3} aplicado a la síntesis a escala de 0.5 moles.

	X1	X2	X3	X4	X5	X6
EXP.	NE	IBA	Etanol	T.cont	Temp.	t.reacc
1	-1	-1	-1	1	-1	1
2	1	-1	-1	-1	1	-1
3	-1	1	-1	-1	1	1
4	1	1	-1	1	-1	-1
5	-1	-1	1	1	1	-1
6	1	-1	1	-1	-1	1
7	-1	1	1	-1	-1	-1
8	1	1	1	1	1	1

Leyenda:

NE= nitroetano, IBA=isobutilamina, T.cont.=tiempo de contacto, Temp.=temperatura, t.reacc.=tiempo de reacción.

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.

Para comprobar experimentalmente los resultados del diseño se realizaron 6 réplicas en las condiciones óptimas obtenidas. Se evaluó la pureza del producto obtenido en cada una de las réplicas.

Para garantizar la homogeneidad del producto que se sometería a la purificación se realizó una mezcla de los crudos obtenidos en los 8 experimentos del diseño y se purificó fijando las condiciones según los valores reportados por Rodríguez, Z. y col. (), las que se detallan en la siguiente tabla:

Tabla : Condiciones aplicadas a la purificación de la mezcla de UC-244 obtenida mediante el diseño 2^{6-3} .

Variables	Carbón Activado(g)	Etanol	Temp. °C	Vel.agit. (r.p.m.)	t.cont. (min.)
	0.2g /g de UC-244	5mL/g de UC-244	60	150	20

Se evaluó la pureza de la mezcla antes y después del proceso de purificación a fin de efectuar su comparación.

2.4 Aplicación de las condiciones óptimas de síntesis del diseño 2^{6-3} de síntesis al escalado a 2 moles.

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

Tabla : Condiciones de síntesis para el primer escalado a 2 moles.

Variable	NE	IBA	Etanol	t.cont.	t.reac.	Temp.
----------	----	-----	--------	---------	---------	-------

	(mL)	(mL)	(mL)	(h)	(h)	°C
	168	10	0	1	4	120

2.5 influencia de diferentes factores en el proceso de síntesis a escala de 2 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 2 moles. Las 5 variables seleccionadas, así como los niveles estudiados se muestran en la **tabla???**.

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

Variables	Reactivos	nivel infer.	nivel medio.	nivel sup.	incremento.
X1	Nitroetano	2 mol	2.25 mol	2.5 mol	0.125 mol
X2	IBA	0.05 mol	0.075 mol	0.1 mol	0.0125 mol
X3	t.contacto	1 horas	1.25horas	1.5 horas	0.125 horas
X4	t.reacción	3.5horas	3.75horas	4 horas	0.125horas
X5	Temp.°C	100°C	110°C	120°C.	10°C

La matriz del diseño se presenta en la **tabla????**. Las funciones respuestas seleccionadas para evaluar este diseño son: el rendimiento analítico de la síntesis y la pureza del UC-244 crudo, evaluada mediante espectrofotometría UV-VIS.

Tabla # : Matriz del diseño 2^{5-2} aplicado a la síntesis a escala de 2 moles.

	X1	X2	X3	X4	X5
Experimentos	nitroetano	IBA	T.cont.	T.reac.	Temp.
1	-1	-1	-1	1	-1
2	1	-1	-1	-1	1
3	-1	1	-1	-1	1
4	1	1	-1	1	-1
5	-1	-1	1	1	1
6	1	-1	1	-1	-1
7	-1	1	1	-1	-1
8	1	1	1	1	1

Leyenda:

NE=nitroetano, IBA=isobutilamina, T.cont.=tiempo de contacto, Temp.=temperatura, t.reacc.=tiempo de reacción.

2.6 Influencia de diferentes factores en el proceso de purificación.

Para garantizar la homogeneidad del producto que se sometería a la purificación se realizó una mezcla de los crudos obtenidos en los 8 experimentos del diseño 2^{5-2} aplicado con vistas a lograr el escalado a 2 moles y se purificó aplicando un diseño factorial fraccionado 2^{3-1} que consta de 4 experimentos, a fin de seleccionar las mejores condiciones.

La matriz del diseño, así como las variables estudiadas y sus niveles se muestran en las [tablas 3 y 4](#). Las funciones respuestas seleccionadas para evaluar este diseño son: *el rendimiento de la purificación y la pureza del UC-244*.

Tabla 3: Factores y niveles del diseño fraccionado 2^{3-1} aplicado al proceso de purificación del UC-244.

Variables	Significado	Nivel inferior	Nivel superior	Nivel medio
X ₁	carbón activado (g)	1.5	2	1.75
X ₂	ETOH (mL)	25	40	32.5
X ₃	Temperatura (°C)	40	50	45

Tabla # 4: Matriz del diseño 2³⁻¹ aplicado a la purificación.

	X ₁	X ₂	X ₃
Exp.	c.activ.	ETOH	Temp.
1	-1	-1	+1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	+1

Leyenda:

c.activ.-carbón activado, ETOH- etanol, Temp.-temperatura,

En la cuantificación de la pureza de los crudos procedentes del diseño experimental se aplicó la espectrofotometría UV-VIS.

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.

Capítulo 3 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, su pureza fue determinada por HPLC resultando el área bajo la curva de 99.6%, (Fig.1) además se comprobó su temperatura de fusión y se registra del espectro UV. Se obtiene una temperatura de fusión entre los 47.6 y los 49°C. La longitud de onda de máxima absorción, 365 nm de su espectro UV-VIS (Fig.2), y sus señales cromatográficas por HPLC (Tiempo de retención = 7.617) y capa delgada ($R_f = 0.54$), Fig. 3, se corresponden con los reportados en trabajos anteriores. (Hernández .Maidel 2004).

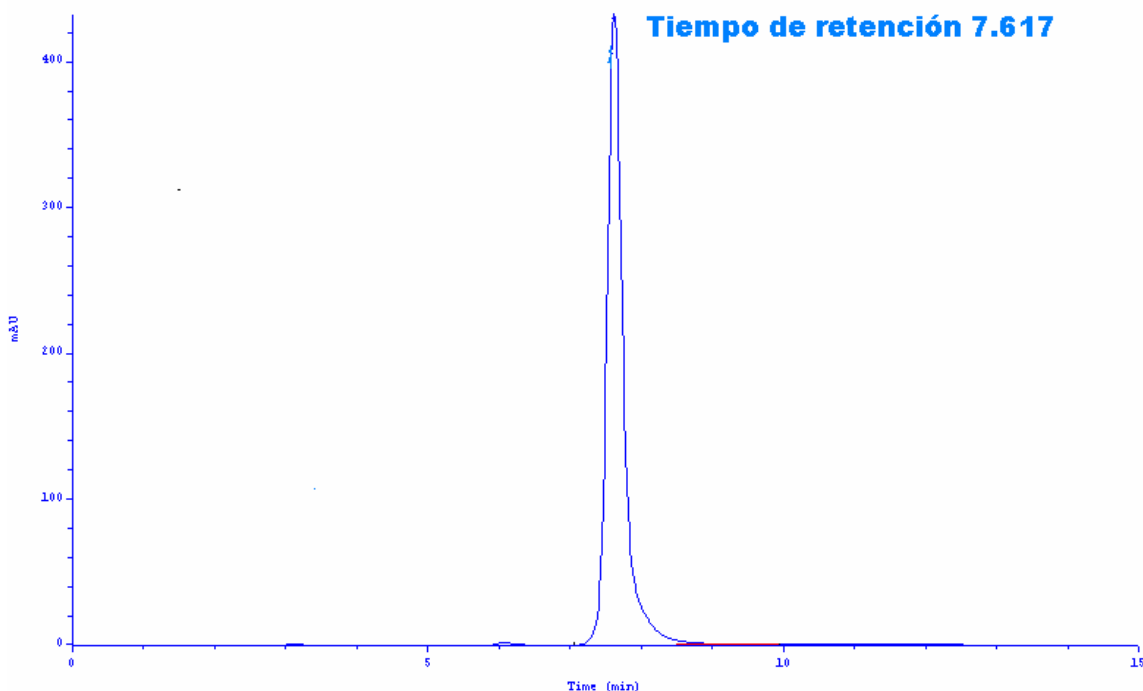


Figura 1: Cromatograma por HPLC del patrón de UC-244.

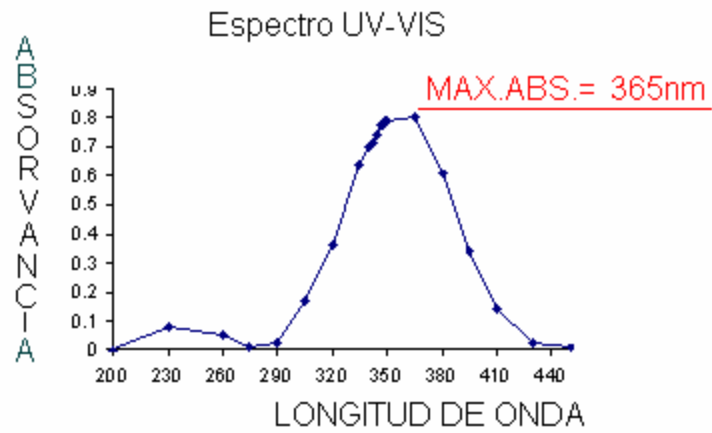


Figura 2: Espectro UV-VIS del UC-244 patrón.

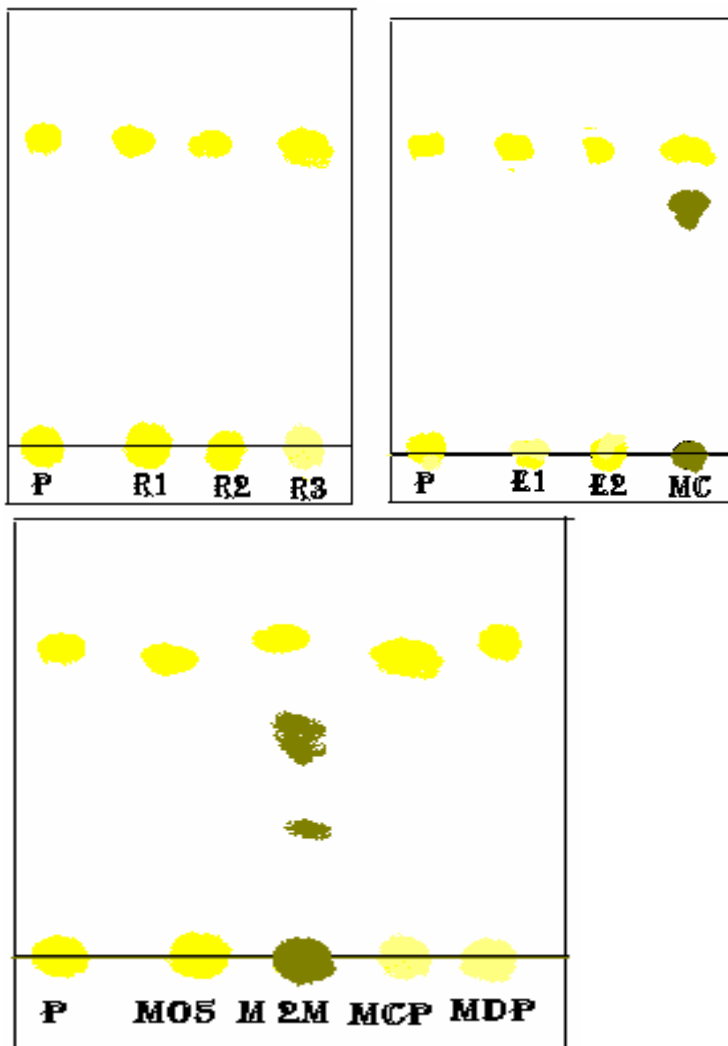


Figura 3: Cromatograma de capa delgada del patrón de UC-244 y de Muestras crudas y puras.

3.2 Comprobación de algunos parámetros de validación de la técnica de determinación espectrofotométrica UV-VIS del UC-244.

Linealidad:

En la figura 4 y el anexo 1 se muestran los resultados del estudio de linealidad realizado. A continuación se presenta la curva de calibración obtenida con el patrón de UC-244, para 27 determinaciones.

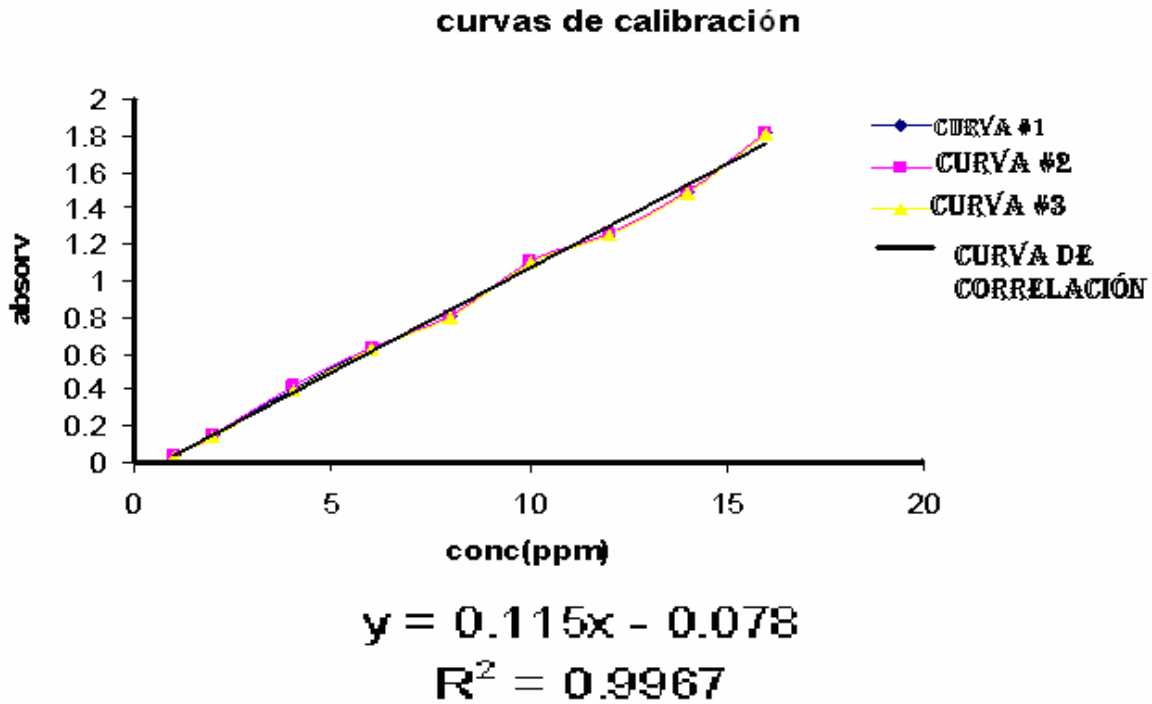


Figura 4: Curva de calibración de UC-244

Ecuación de la curva de calibración: **Abs = -0.078+ 0.115*Conc**
Coeficiente de correlación: **0.9967**.

En la tabla 1 se muestran los valores de absorbancia para cada concentración y los factores respuesta (y/x).

Tabla1: Resultados del estudio de linealidad en la determinación de UC-244.

Conc. ppm	Abs1	Abs2	Abs3	f1	f2	f3
1	0.037	0.040	0.034	0.037	0.040	0.034
2	0.149	0.151	0.143	0.075	0.076	0.072
4	0.400	0.420	0.396	0.100	0.105	0.099
6	0.632	0.635	0.627	0.105	0.106	0.105
8	0.805	0.808	0.800	0.101	0.101	0.100
10	1.104	1.109	1.098	0.110	0.111	0.110
12	1.257	1.261	1.249	0.105	0.105	0.104
14	1.492	1.495	1.487	0.107	0.107	0.106
16	1.819	1.823	1.813	0.114	0.114	0.113

Se determina el coeficiente de variación de los factores respuestas siendo este 2.06 %, el cual es menor que el 5%, que es el criterio de aceptación para este parámetro; por lo que la técnica es lineal (Castro, M 1989)).

Test de linealidad de la pendiente:

$t_{exp} > t_{tabulada}$ (para 26 g.l. y $\alpha=0,05$)

$83.88 > 2.056$ Se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa $m \neq 0$.

Límites de confianza: 0.1149 ± 0.001369

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

Tesis de Proporcionalidad del intercepto:

$t_{exp} < t_{tabulada}$ (para 26 g.l. y $\alpha=0,05$)

$-5.90 < 2.056$ (Se acepta la hipótesis nula $b=0$).

Límites de confianza -0.07701 ± 0.01353

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

Reproducibilidad

analista	REPLICAS	DIA #1 Abs	Conc ppm	DIA #2 Abs	Conc ppm
1	1	0.803	99.64	0.802	99.51
	2	0.801	99.39	0.804	99.76
	3	0.802	99.51	0.799	99.14
	4	0.804	99.76	0.800	99.26
	5	0.803	99.64	0.804	99.76
2	1	0.805	99.89	0.802	99.51
	2	0.804	99.76	0.803	99.64
	3	0.803	99.64	0.802	99.51
	4	0.801	99.39	0.803	99.64
	5	0.799	99.14	0.804	99.76

	Abs	Pureza
MEDIA	0.802	99.53
CV	0.211%	2.11%

Se obtienen coeficientes de variación para repetibilidad y reproducibilidad menores que el 3% y el 5% respectivamente que son los criterios de aceptación, por tanto el método utilizado es reproducible.

Especificidad.

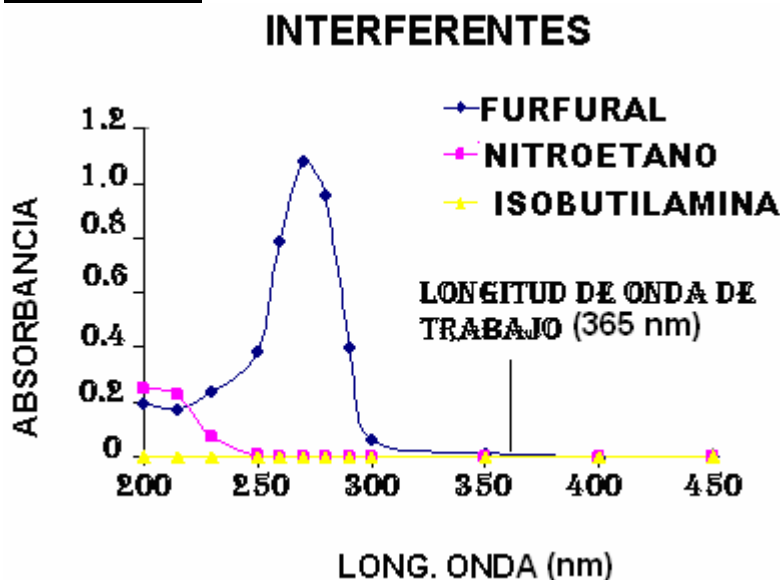


Figura #5 espectro de las posibles especies interferentes.

En la figura anterior se observa que ninguna de las posibles interferencias absorbe a la longitud de onda de máxima absorción del UC-244.

3.3 Influencia de diferentes factores en el proceso de síntesis a escala de 0.5 mol.

En la siguiente tabla se presentan los resultados del diseño experimental 2^{6-3} aplicado.

Tabla 2: Resultados obtenidos al aplicar el diseño factorial fraccionado 2^{6-3} en la síntesis del principio activo en la escala de 0.5 mol.

EXPERIMENTO	MASA TEORICA(g)	MASA EXPERIMENTAL(g)	RENDIMIENTO	PUREZA %
1	76.5	27.40	35.81	68
2	76.5	13.64	17.83	93
3	76.5	38.31	50.07	62
4	76.5	29.66	38.77	66
5	76.5	16.61	21.71	83
6	76.5	0.00	0.00	0
7	76.5	17.66	23.08	87
8	76.5	35.60	46.53	62

Al procesar los resultados de % de rendimiento en los experimentos realizados se obtienen las mejores condiciones que se presentan a continuación (anexo 2).

Tabla 3: Valores significativos de las variables en la función respuesta rendimiento.

Variables	Niveles	Mejores condiciones
Nitroetano (mL)	-1	42.0 mL
Isobutilamina (mL)	+1	2.5 mL
etanol (mL)	-1	0
Tiempo contacto (min.)	+1	1 h
Temperatura (0C)	+1	120 °C
Tiempo reacción (h)	+1	4 h

Del análisis de varianza y de regresión múltiple realizado resultan todos los coeficientes de las variables significativos, obteniéndose la siguiente ecuación estimada para la función respuesta % de rendimiento:

$$\text{REND\%} = 17.9295 - 12.79 \cdot \text{ETOH} + 20.775 \cdot \text{IBA} - 6.885 \cdot \text{NE} + 12.96 \cdot t. \text{ Contacto} + 9.62 \cdot \text{Temperatura} + 7.755 \cdot t. \text{ Reacción.}$$

Al procesar los resultados de pureza en los experimentos realizados se obtienen las mejores condiciones que se presentan a continuación (anexo 4).

Tabla 4: Valores significativos de las variables en la función respuesta pureza.

Variable	Variable	Mejores condiciones
Nitroetano (mL)	-1	42.0 mL
Isobutilamina (mL)	+1	2.5 mL
etanol (mL)	-1	0.0
Tiempo contacto (min.)	+1	1h
Temperatura (0C)	+1	120 °C
Tiempo reacción (h)	-1	3.5h

Del análisis de varianza y de regresión múltiple (anexo 5) resultan todos los coeficientes de las variables significativos, obteniéndose la siguiente ecuación estimada para la función respuesta % de pureza:

$$\text{Pureza\%} = 111.625 - 14.25 \cdot \text{ETOH} + 8.25 \cdot \text{IBA} - 19.75 \cdot \text{NE} + 9.25 \cdot t. \text{ Contacto} + 19.75 \cdot \text{Temperatura} + 34.25 \cdot t. \text{ Reacción.}$$

3.4 Aplicación de las mejores condiciones del diseño 2⁶⁻³ evaluando rendimiento a escala de 0.5 mol.

Los resultados de las réplicas del diseño de 0.5 moles utilizando las óptimas condiciones de síntesis obtenidas a partir del diseño de experimento 2⁶⁻³ (función respuesta rendimiento), se expresan en la siguiente tabla.

Tabla 5: Réplicas de la síntesis a 0.5 mol en las mejores condiciones del diseño 2⁶⁻³.

REPLICADO	MASA.TEO.	MASA.EXP.	RENDIMIENTO %	PUREZA %
1	76.5	41.405	54.3	73.0
2	76.5	59.400	77.9	60.0
3	76.5	46.403	60.9	69.0

Se obtiene un rendimiento medio del 64.36% y una pureza media de 67.33% lo cual es ligeramente superior en rendimiento y comparable la pureza a los resultados obtenidos en estudios anteriores por (Rodríguez, Z y otros).

La pureza de la mezcla homogeneizada de los crudos obtenidos en las réplicas anteriores fue de 76.9%, lográndose una pureza final de 99.2 % después de ser sometida al proceso de purificación en las condiciones especificadas en el capítulo anterior.

3.5 Aplicación de las condiciones óptimas del diseño 2⁶⁻³ de síntesis al escalado a 2 moles.

Los resultados obtenidos al escalar a 2 moles la síntesis en las mejores condiciones del diseño 2⁶⁻³ (función respuesta rendimiento), se presentan en la siguiente tabla.

Tabla 6: Rendimiento y pureza de la síntesis de 2 moles en las condiciones óptimas de rendimiento del diseño 2⁶⁻³.

ESCALADO A 2 MOLES	MASA TEORICA(g)	MASA ESPERIMENTAL(g)	% DE RENDIMIENTO	%PUREZA DEL CRUDO
1	306	82.62	27.0	98
2	306	78.33	25.6	98

Los resultados obtenidos en este escalado solamente llegan a un 50% del rendimiento alcanzado anteriormente (para 0.5 mol), mientras que la pureza se eleva considerablemente. 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 2 moles.

En la siguiente tabla se presentan los resultados del diseño experimental 2^{5-2} aplicado.

Tabla 7: Resultados obtenidos al aplicar el diseño factorial fraccionado 2^{5-2} en la síntesis del principio activo en la escala de 2 moles.

Experimento	masa teórica(g)	masa experimental(g)	% de rendimiento	% de pureza
1	306	155.24	50.73	85.50
2	306	186.00	60.78	93.54
3	306	279.00	91.18	78.00
4	306	168.70	55.13	76.00
5	306	198.90	65.00	74.00
6	306	122.55	40.04	95.75
7	306	169.83	55.49	79.00
8	306	187.57	61.29	75.00

Al procesar los resultados de rendimiento en los experimentos realizados se obtienen las mejores condiciones que se presentan a continuación (anexo 6) Los valores codificados de las variables correspondientes al diseño aparecen en la siguiente tabla.

Tabla 8: Mejores condiciones de síntesis a escala de 2 moles evaluando la función respuesta rendimiento en el diseño 2^{5-2} .

Variables	Niveles	Mejores condiciones
Nitroetano (mL)	-1	168
Isobutilamina (mL)	+1	10
Tiempo contacto (h)	-1	0.5
Temperatura ($^{\circ}$ C)	+1	120
Tiempo reacción (h)	-1	3.5

Del análisis de varianza y de regresión múltiple realizado (anexo 7) resultan todos los coeficientes de las variables significativos, obteniéndose la siguiente ecuación estimada para la función respuesta % de rendimiento.

La ecuación estimada para la función respuesta es la siguiente:

$$\text{Rendimiento\%} = 49.8657 + 11.6341 \cdot \text{IBA} - 11.2891 \cdot \text{NE} - 8.9991 \cdot \text{t.Contacto} + 19.2141 \cdot \text{Temperatura} - 3.8341 \cdot \text{t.Reacción.}$$

El rendimiento de los experimentos muestran mejores resultados que los alcanzados anteriormente. En el caso del experimento 3 existe una coincidencia de sus condiciones con los resultados obtenidos en la evaluación del diseño mediante esta función respuesta, siendo la pureza adecuada para un principio activo crudo.

Al procesar los resultados de pureza se obtienen las mejores condiciones que se presentan a continuación (anexo 8). Los valores codificados de las variables correspondientes a la función respuesta pureza.

Tabla 9: 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)	+1	210
Isobutilamina (mL)	-1	5
Tiempo contacto (h)	-1	1
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	-1	100
Tiempo reacción (h)	-1	3.5

Del análisis de varianza y de regresión múltiple realizado resultan todos los coeficientes de las variables significativos, obteniéndose la siguiente ecuación estimada para la función respuesta es la siguiente:

$$\text{Pureza\%} = 111.27 - 10.1975 \cdot \text{IBA} + 5.9475 \cdot \text{NE} - 2.3225 \cdot \text{t.Contacto} - 3.9275 \cdot \text{Temperatura} - 8.9475 \cdot \text{t.Reacción.}$$

3.7 Influencia de diferentes factores en el proceso de purificación.

En la siguiente tabla se presentan los resultados de los experimentos realizados siguiendo un diseño 2^{3-1} para el estudio de las condiciones de purificación.

Tabla 10: Resultados obtenidos al aplicar el diseño factorial fraccionado 2^{3-1} aplicado en la purificación principio activo obtenido en la escala de 2 moles.

Experimento	Masa teórica	Masa obtenida g	%Rendimiento en masa	% Pureza del Princ.act.purificado	Masa. analit.	%Rendimiento analit.
1	10	8.95	89.45	98.52	8.813	88.12
2	10	8.50	85.00	98.20	8.347	83.47
3	10	7.37	73.74	99.22	7.316	73.16
4	10	7.49	74.89	99.40	7.444	74.44

La tabla muestra resultados satisfactorios en cuanto a rendimiento y pureza esta última queda por encima de los valores que se exige que deba tener un principio activo para que pueda llegar a ser utilizado como fármaco posteriormente.

Al procesar los resultados de % pureza del producto purificado se obtienen las mejores condiciones que se presentan a continuación (anexo 7). Los valores codificados de las variables correspondientes a la función respuesta pureza obtenidos en el diseño de purificación 2^{3-1} .

Tabla 11: Mejores condiciones de purificación evaluando la función respuesta pureza del principio activo purificado en el diseño 2^{3-1} .

Variables	Niveles	Mejores condiciones
c.activado (g)	-1	1.5
Etanol(mL)	+1	40
Temperatura ($^{\circ}$ C)	+1	50

No existe un cambio significativo de la pureza entre los niveles mínimo y máximo de los valores de las variables analizadas en el diseño (obsérvese específicamente las variables temperatura y carbón activado), por lo que se puede seleccionar el nivel mínimo de ambas siguiendo un criterio económico sin afectar considerablemente los resultados.

Del análisis de varianza y de regresión múltiple realizado resultan todos los coeficientes de las variables significativos, obteniéndose la siguiente ecuación estimada para la función respuesta pureza es la siguiente:

$$\text{Pureza\%} = 97.14 - 0.07 * \text{C.activ.} + 0.95 * \text{Etanol} + 0.25 * \text{Temperatura}$$

Al procesar los resultados de %rendimiento del producto purificado se obtienen las mejores condiciones que se presentan a continuación (anexo 8).

Tabla 12: Mejores condiciones de purificación evaluando la función respuesta % de rendimiento del principio activo purificado en el diseño 2^{3-1} .

Variables	niveles	Mejores condiciones
c.activado (g)	-1	1.5
Etanol(mL)	-1	40
Temperatura ($^{\circ}$ C)	+1	50

La ecuación estimada para la función respuesta % de rendimiento es la siguiente.

$$\text{Rendimiento\%} = 98.41 - 0.07 * \text{C.activ.} - 12.91 * \text{Etanol} + 2.8 * \text{Temperatura}$$

Conclusiones

1. La técnica espectrofotometría UV-VIS aplicada a la determinación del principio activo UC-244 es lineal y reproducible en las condiciones que se refieren en este trabajo.
2. Las señales analíticas del UC-244 por cromatografía de capa delgada, con un $R_f = 0.54$ y por HPLC con un tiempo de retención de 7.660, en las condiciones de separación referidas permite un reconocimiento cualitativo del producto del UC-244, así como la ausencia de sustancias interferentes mediante el reconocimiento de otras posibles señales en los cromatogramas respectivos.
3. Las mejores condiciones de síntesis obtenidas en el diseño 2^{6-3} a escala de 0.5 moles superan los resultados obtenidos por otros investigadores en trabajos anteriores.
4. Las mejores condiciones de síntesis obtenidas en el diseño 2^{5-2} a escala de 2 moles se obtiene un rendimiento de **91.2%** y una pureza del crudo de **78%** los cuales superan los resultados obtenidos por otros investigadores en trabajos anteriores.
5. Las mejores condiciones de síntesis obtenidas en el diseño 2^{3-1} permiten alcanzar purezas de 99% en el producto purificado.
6. Los resultados obtenidos en la síntesis y purificación de UC-244 abren nuevas perspectivas para su aplicación a escala de planta piloto.
7. Replicar las mejores condiciones obtenidas tanto en síntesis como en purificación a escala de 2 moles.
8. Realizar el escalado de la síntesis y purificación a 14 moles dadas las posibilidades de aplicación del principio activo estudiado, de forma similar al escalado aplicado en el Taller de G-0.

Recomendaciones:

- Realizar replicas en las mejores condiciones obtenidas tanto en síntesis como en purificación a escala de 2 moles.
- Realizar el escalado de la síntesis y purificación a cantidades superiores a 2 moles, dadas las cantidades que serian necesarias emplear para las aplicaciones propuestas del principio activo estudiado.

Anexo

Anexo #1

Linealidad de la técnica Espectrofotometrica del UC-244.

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

Dependent variable: Absorbancia 1

Independent variable: Concentracion

Parameter	Estimate	Standard Error	T Statistic	P-Value
Intercept	-0.0770142	0.0130529	-5.90018	0.0000
Slope	0.114902	0.00136999	83.8711	0.0000

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	8.9073	1	8.9073	7034.36	0.0000
Residual	0.0316564	25	0.00126626		
Total (Corr.)	8.93895	26			

Correlation Coefficient = 0.998228

R-squared = 99.6459 percent

Standard Error of Est. = 0.0355845

Anexo #2

Análisis de varianza para el rendimiento en el diseño de 2^{6-3} escala de 0.5 moles.

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:Nitroetano 1	94.8065	1	94.8065	4.70	0.2751
B:IBA 1	863.201	1	863.201	42.81	0.0965
C:Etanol 1	327.168	1	327.168	16.23	0.1549
D:T.C 1	335.923	1	335.923	16.66	0.1529
E:Temp 1	185.089	1	185.089	9.18	0.2029
F:T reac 1	120.28	1	120.28	5.97	0.2474

RESIDUAL	20.1612	1	20.1612

TOTAL (CORRECTED)	1946.63	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	29.225			
Nitroetano 1					
1	4	32.6675	2.24506	4.14126	61.1937
2	4	25.7825	2.24506	-2.74374	54.3087
IBA 1					
1	4	18.8375	2.24506	-9.68874	47.3637
2	4	39.6125	2.24506	11.0863	68.1387
Etanol 1					
1	4	35.62	2.24506	7.09376	64.1462
2	4	22.83	2.24506	-5.69624	51.3562
T.C 1					
1	4	22.745	2.24506	-5.78124	51.2712
2	4	35.705	2.24506	7.17876	64.2312
Temp 1					
1	4	24.415	2.24506	-4.11124	52.9412
2	4	34.035	2.24506	5.50876	62.5612
T reac 1					
1	4	25.3475	2.24506	-3.17874	53.8737
2	4	33.1025	2.24506	4.57626	61.6287

**Regresión múltiple evaluando la función respuesta rendimiento en el
diseño de 2^{6-3} a escala de 0.5 moles.**

Dependent variable: Rendimiento 1

Parameter	Standard Estimate	T Error	Statistic	P-Value

CONSTANT	-17.9275	11.7732	-1.52274	0.3699
Nitroetano 1	-6.885	3.175	-2.1685	0.2751
IBA 1	20.775	3.175	6.54331	0.0965
Etanol 1	-12.79	3.175	-4.02835	0.1549
T.C 1	12.96	3.175	4.08189	0.1529
Temp 1	9.62	3.175	3.02992	0.2029

T reac 1	7.755	3.175	2.44252	0.2474
----------	-------	-------	---------	--------

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	1926.47	6	321.078	15.93	0.1869
Residual	20.1612	1	20.1612		

Anexo #3

Análisis de varianza para la pureza en el diseño de 2⁶⁻³ escala de 0.5 moles.

Analysis of Variance for Pureza 1 - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:Etanol 1	406.125	1	406.125	0.33	0.6674
B:IBA 1	136.125	1	136.125	0.11	0.7952
C:Nitroetano 1	780.125	1	780.125	0.64	0.5712
D:T reac 1	2346.13	1	2346.13	1.92	0.3984
E:T.C 1	171.125	1	171.125	0.14	0.7723
F:Temp 1	780.125	1	780.125	0.64	0.5712
RESIDUAL	1225.13	1	1225.13		
<hr/>					
TOTAL (CORRECTED)	5844.88	7			

Table of Least Squares Means for Pureza 1
with 95.0 Percent Confidence Intervals

Level	Count	Std. Mean	Lower Error	Upper Limit	Limit
GRAND MEAN	8	65.125			
Etanol 1					
1	4	72.25	17.5009	-150.12	294.62
2	4	58.0	17.5009	-164.37	280.37
IBA 1					
1	4	61.0	17.5009	-161.37	283.37
2	4	69.25	17.5009	-153.12	291.62
Nitroetano 1					
1	4	75.0	17.5009	-147.37	297.37
2	4	55.25	17.5009	-167.12	277.62

T reac 1					
1	4	82.25	17.5009	-140.12	304.62
2	4	48.0	17.5009	-174.37	270.37
T.C 1					
1	4	60.5	17.5009	-161.87	282.87
2	4	69.75	17.5009	-152.62	292.12
Temp 1					
1	4	55.25	17.5009	-167.12	277.62
2	4	75.0	17.5009	-147.37	297.37

Regresión múltiple evaluando la función respuesta pureza en el diseño de 2^{6-3} a escala de 0.5 moles.

Multiple Regression Analysis

Dependent variable: Pureza 1

Parameter	Standard Estimate	T Error	T Statistic	P-Value
CONSTANT	111.625	91.7755	1.21628	0.4381
Nitroetano 1	-19.75	24.75	-0.79798	0.5712
IBA 1	8.25	24.75	0.333333	0.7952
Etanol 1	-14.25	24.75	-0.575758	0.6674
T.C 1	9.25	24.75	0.373737	0.7723
Temp 1	19.75	24.75	0.79798	0.5712
T reac 1	-34.25	24.75	-1.38384	0.3984

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	4619.75	6	769.958	0.63	0.7460
Residual	1225.13	1	1225.13		

Anexo #4**Análisis de varianza para el rendimiento en el diseño de 2⁵⁻² escala de 2 moles.**

Analysis of Variance for Rend. - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:N.E	254.888	1	254.888	7.05	0.1174
B:IBA	270.705	1	270.705	7.49	0.1116
C:T.Cont	161.968	1	161.968	4.48	0.1685
D:T. Reac.	29.4006	1	29.4006	0.81	0.4623
E:Temp	738.363	1	738.363	20.43	0.0456
RESIDUAL	72.2917	2	36.1459		
TOTAL (CORRECTED)	1527.62	7			

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

Table of Least Squares Means for Rend.
with 95.0 Percent Confidence Intervals

Level	Count	Std. Mean	Lower Error	Upper Limit	Limit
GRAND MEAN	8	59.9545			
N.E					
1	4	65.5991	3.00607	52.665	78.5332
2	4	54.31	3.00607	41.3759	67.2441
IBA					
1	4	54.1375	3.00607	41.2034	67.0716
2	4	65.7716	3.00607	52.8375	78.7057
T.Cont					
1	4	64.4541	3.00607	51.52	77.3882
2	4	55.455	3.00607	42.5209	68.3891
T. Reac.					
1	4	61.8716	3.00607	48.9375	74.8057
2	4	58.0375	3.00607	45.1034	70.9716
Temp					
1	4	50.3475	3.00607	37.4134	63.2816
2	4	69.5616	3.00607	56.6275	82.4957

Regresión múltiple evaluando la función respuesta rendimiento en el diseño de 2^{5-2} a escala de 2 moles.

Multiple Regression Analysis

Dependent variable: Rend.

Parameter	Standard Estimate	Error	T Statistic	P-Value
CONSTANT	49.8657	14.4166	3.45891	0.0744
N.E	-11.2891	4.25123	-2.65549	0.1174
IBA	11.6341	4.25123	2.73664	0.1116
T.Cont	-8.9991	4.25123	-2.11682	0.1685
T. Reac.	-3.8341	4.25123	-0.901881	0.4623
Temp	19.2141	4.25123	4.51966	0.0456

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	1455.32	5	291.065	8.05	0.1141
Residual	72.2917	2	36.1459		
Total (Corr.)	1527.62	7			

R-squared = 95.2677 percent

R-squared (adjusted for d.f.) = 83.4369 percent

Standard Error of Est. = 6.01214

Mean absolute error = 2.88205

Durbin-Watson statistic = 1.70672

Anexo #5

Análisis de varianza para la función respuesta pureza en el diseño de 2^{5-2} escala de 2 moles.

Analysis of Variance for Rend. - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:N.E	254.888	1	254.888	7.05	0.1174
B:IBA	270.705	1	270.705	7.49	0.1116
C:T.Cont	161.968	1	161.968	4.48	0.1685
D:T. Reac.	29.4006	1	29.4006	0.81	0.4623
E:Temp	738.363	1	738.363	20.43	0.0456

RESIDUAL	72.2917	2	36.1459

TOTAL (CORRECTED)	1527.62	7	

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

Table of Least Squares Means for Rend.
with 95.0 Percent Confidence Intervals

Level	Count	Std. Mean	Lower Error	Upper Limit	Limit

GRAND MEAN	8	59.9545			
N.E					
1	4	65.5991	3.00607	52.665	78.5332
2	4	54.31	3.00607	41.3759	67.2441
IBA					
1	4	54.1375	3.00607	41.2034	67.0716
2	4	65.7716	3.00607	52.8375	78.7057
T.Cont					
1	4	64.4541	3.00607	51.52	77.3882
2	4	55.455	3.00607	42.5209	68.3891
T. Reac.					
1	4	61.8716	3.00607	48.9375	74.8057
2	4	58.0375	3.00607	45.1034	70.9716
Temp					
1	4	50.3475	3.00607	37.4134	63.2816
2	4	69.5616	3.00607	56.6275	82.4957

Regresión múltiple evaluando la función respuesta pureza en el diseño de 2^{5-2} a escala de 2 moles.

Multiple Regression Analysis

Dependent variable: Pureza

Parameter	Standard Estimate	Standard Error	T Statistic	P-Value

CONSTANT	111.27	8.96072	12.4175	0.0064
N.E	5.9475	2.64237	2.25082	0.1533
IBA	-10.1975	2.64237	-3.85922	0.0611
T.Cont	-2.3225	2.64237	-0.878945	0.4721
T. Reac.	-8.9475	2.64237	-3.38616	0.0772

Temp -3.9275 2.64237 -1.48635 0.2755

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	480.478	5	96.0955	6.88	0.1317
Residual	27.9285	2	13.9643		
Total (Corr.)	508.406	7			

R-squared = 94.5067 percent
R-squared (adjusted for d.f.) = 80.7733 percent
Standard Error of Est. = 3.73688
Mean absolute error = 1.46375
Durbin-Watson statistic = 1.25367

Anexo #6

Análisis de varianza para la función respuesta pureza en el diseño de purificación 2³⁻¹.

Analysis of Variance for Purez - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:C. Activado	0.0049	1	0.0049	0.08	0.8262
B:Etanol	0.9025	1	0.9025	14.44	0.1638
RESIDUAL	0.0625	1	0.0625		
TOTAL (CORRECTED)	0.9699	3			

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

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

Level	Count	Std. Mean	Lower Error	Upper Limit	Limit
GRAND MEAN	4	98.835			
C. Activado					
1	2	98.87	0.176777	96.6238	101.116
2	2	98.8	0.176777	96.5538	101.046

Etanol					
1	2	98.36	0.176777	96.1138	100.606
2	2	99.31	0.176777	97.0638	101.556

Regresión múltiple evaluando la función respuesta pureza en el diseño de purificación 2³⁻¹.

Multiple Regression Analysis

Dependent variable: Purez

Parameter	Standard Estimate	T Error	Statistic	P-Value
CONSTANT	97.14			
C. Activado	-0.07			
Etanol	0.95			
Temperatura	0.25			

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	0.9699	3	0.3233		
Residual	0.0	0	0.0		
Total (Corr.)	0.9699	3			

R-squared = 100.0 percent

R-squared (adjusted for d.f.) = 0.0 percent

Standard Error of Est. = 0.0

Mean absolute error = 0.0

Durbin-Watson statistic =

Anexo #6

Análisis de varianza para el rendimiento en el diseño de purificación 2³⁻¹.

Analysis of Variance for Rendimiento - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:carbon	2.7225	1	2.7225		
B:Etanol	166.668	1	166.668		
C:Temperatura	7.84	1	7.84		

RESIDUAL 0.0 0

TOTAL (CORRECTED) 177.231 3

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

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

Level	Count	Std. Mean	Lower Error	Upper Limit	Limit
GRAND MEAN	4	80.77			
carbon					
-1	2	81.595			
1	2	79.945			
Etanol					
-1	2	87.225			
1	2	74.315			
Temperatura					
-1	2	79.37			
1	2	82.17			

**Regresión múltiple evaluando la función respuesta rendimiento en el
diseño de purificación 2^{3-1} .**

Multiple Regression Analysis

Dependent variable: Rendim

Parameter	Standard Estimate	T Error	Statistic	P-Value
CONSTANT	98.41			
C. Activado	-1.65			
Etanol	-12.91			
Temperatura	2.8			

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	177.231	3	59.0769		
Residual	0.0	0	0.0		

Total (Corr.) 177.231 3
R-squared = 100.0 percent
R-squared (adjusted for d.f.) = 0.0 percent
Standard Error of Est. = 0.0
Mean absolute error = 0.0
Durbin-Watson statistic =