

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA

**SÍNTESIS, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN
DERIVADO BILIAR A PARTIR DE *P*-CLOROFENILBIGUANIDA
PARA SU EVALUACIÓN COMO DESINFECTANTE**

Tesis de Graduación sometida a consideración de la Escuela de Ingeniería
Química, como requisito final para optar por el grado de Licenciatura en
Ingeniería Química

CHRISTIAN JOSÉ CAMPOS MOLINA

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio Brenes
San José, Costa Rica

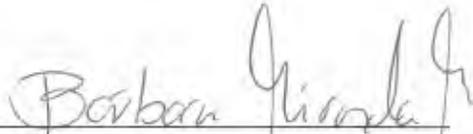
2019

TRIBUNAL EXAMINADOR

Tesis de Graduación sometida a la consideración de la Escuela de Ingeniería Química de la Universidad de Costa Rica como requisito final para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería Química.

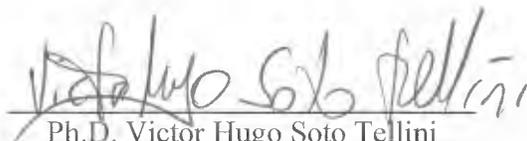
Christian José Campos Molina
Sustentante

Aprobado por:



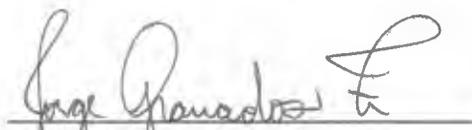
Ph.D. Bárbara Miranda Morales
Presidenta del Tribunal

Profesora de la Escuela de Ingeniería Química de la Universidad de Costa Rica



Ph.D. Victor Hugo Soto Tellini
Director del Proyecto

Profesor de la Escuela de Química de la Universidad de Costa Rica



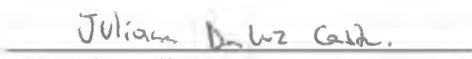
M.Sc. Jorge Granados Zuñiga
Miembro Lector

Profesor de la Escuela de Medicina de la Universidad de Costa Rica



Ph.D. Lautaro Ramirez Varas
Miembro Lector

Profesor de la Escuela de Ingeniería Química de la Universidad de Costa Rica



Lic. Juliana Da Luz Castro
Miembro Lector Invitado

Profesora de la Escuela de Ingeniería Química de la Universidad de Costa Rica

Agradecimientos

A Dios, el padre eterno, que me ha dado vida, salud y energía para luchar por los objetivos, en quien encontré refugio y entrega para salir adelante.

A mi mamá, por su amor; de carácter fuerte, pero muy noble; de ella he aprendido todos los días.

Al Dr. Victor Hugo Soto Tellini, por el ejemplo y la vocación únicas en él. Siempre coherente y enamorado de sus ideales. Una de las personas que tengo como referencia. Gracias profesor.

Al Dr. Benito Stradi Granados, por todo el apoyo al inicio de este proyecto. Le estaré siempre agradecido profesor, que Dios le de bastante salud.

A don José Matías Reyes Espinal, por construir en mí las bases de un profesional; sin duda un ejemplo en la vida; coherente y luchador.

Al M.Sc. Randall Ramírez Loría, por estar pendiente de las adversidades y siempre ofrecer su apoyo.

A los profesores Dr. Lautaro Ramírez Vargas, M.Sc. Jorge Granados Zuñiga y M.Sc. Kenia Barrantes Jimenez, por su apoyo incondicional, tanto en el crecimiento académico como en el excelente trato: directo, amable y personalizado. Gracias profesores, también son un gran ejemplo para mí.

A don Sigifredo Salguero (que en paz descansa), por sus enseñanzas en el proceso de la cristalización y otras operaciones unitarias.

Al director de la Escuela de Química, Dr. Cristian Campos Fernández, quien me apoyó con sus sugerencias y siempre que le solicité colaboración con el análisis cristalográfico. Gracias por su cálido trato humano.

Al director de la Escuela de Ingeniería Química, Dr. Esteban Durán Herrera, a quien le agradezco por los cursos de carrera impartidos y que, junto con COTRAFIN, permitieron la aprobación de la propuesta de este TFG.

A los profesores Dr. Leonardo Alvarez Galán, a la M.Sc. Laura Calderón Rodríguez, al M.Sc. Julio Otárola Jiménez. A mis compañeros de laboratorio, en especial a Marta y Luis Castillo, por sus enseñanzas, sugerencias y consejos.

A Luis César, por la ejecución del ensayo de actividad desinfectante en el INISA; a Godofredo, Ignacio y a Jürgen por la ejecución de los experimentos uni y bidimensionales de RMN en el CIPRONA y en la Escuela de Química.

Cada uno contribuyó, en su manera, a la conclusión de este TFG.

Resumen

El objetivo de este proyecto es sintetizar, purificar y caracterizar un derivado biliar a partir de *p*-clorofenilbiguanida para su evaluación desinfectante.

El proyecto se subdividió en cuatro etapas: En la primera, se sintetizó una triazina a partir del ácido cólico funcionalizada en la posición 24 mediante el método del anhídrido mixto y se purificó mediante la técnica de cromatografía en columna con una mezcla de elución 6:1 CHCl₃:MeOH; en la segunda, este derivado biliar se caracterizó mediante técnicas espectroscópicas como FT-IR, HSQC y HMBC; en la tercera, se utilizó la técnica de solubilización en fase de Higuchi Connors para complejar la triazina biliar con (2-hidroxiopropil)- β -ciclodextrina y β -ciclodextrina y se utilizó el método WTLS en el cálculo de los parámetros de regresión y sus varianzas asociadas al error instrumental; y en la cuarta, se evaluó la actividad desinfectante de cada complejo en su concentración de aplicación mediante el método ASTM E2315-16 con cepas multiresistentes de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

Como principales resultados, se obtuvo un rendimiento del 27% en la síntesis de la triazina biliar, se obtuvo una constante de estabilidad correspondiente al complejo triazina:(2-hidroxiopropil)- β -ciclodextrina con un valor de 1405.32 y dos constantes de estabilidad para los complejos triazina: β -ciclodextrina con los valores 109.85 y 0.01, y no se mostró una reducción logarítmica significativa en términos de las UFC de las cepas bacterianas indicadas.

Se sugiere la introducción de un codisolvente en la formulación que considere las limitaciones prácticas en la evaluación de la actividad desinfectante de cada complejo. Además, se recomienda el aumento en el tamaño de la muestra para la construcción de los modelos.

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
COMITÉ ASESOR	I
EPÍGRAFE	II
DEDICATORIA	III
AGRADECIMIENTO	IV
RESUMEN	V
ÍNDICE GENERAL	VI
ÍNDICE DE CUADROS	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	XII
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 TRANSMISIÓN DE LOS MICROORGANISMOS EN LOS CENTROS DE ATENCIÓN INTEGRAL DE LA SALUD	1
1.1.1 Infecciones nosocomiales	3
1.1.2 Patógenos nosocomiales	3
1.1.3 Prevención y detección de las infecciones nosocomiales en Costa Rica	5
1.2 EVALUACIÓN DE LA ACCIÓN DESINFECTANTE POR EL MÉTODO ASTM E2315-16	6
1.3 IMPORTANCIA DE LA BIOSÍNTESIS DE DERIVADOS BILIARES	6
1.4 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS ÁCIDOS BILIARES Y SUS DERIVADOS	8
1.5 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LAS BIGUANIDAS	11
1.6 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LAS S-TRIAZINAS	12
1.7 DERIVADOS BILIARES BIOLÓGICAMENTE ACTIVOS SINTETIZADOS EN COSTA RICA ...	14
1.8 RUTAS REFERENCIALES DE SÍNTESIS	15
1.8.1 Síntesis del clorhidrato de <i>p</i> -clorofenilbiguanida	15
1.8.2 Síntesis de amidas biliares empleando el método del anhídrido mixto	15
1.9 MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN QUÍMICA	17
1.9.1 Cromatografía de capa fina (TLC)	17
1.9.2 Espectroscopía FT-IR	18
1.9.3 Espectroscopía UV - visible	19
1.9.4 Espectrometría de masas	20
1.9.5 Espectroscopía de RMN: Análisis unidimensional	21
1.9.6 Espectroscopía de RMN: Análisis bidimensional	23
1.10 SOLUBILIZACIÓN EN FASE DE SUSTANCIAS POCO SOLUBLES EN AGUA	26
1.10.1 Ciclodextrinas como agentes complejantes	26
1.10.2 Análisis de solubilidad cuando los componentes interactúan: Prueba de Higuchi-Connors	29
1.10.3 Estequiometría de complejación con ciclodextrinas	29
1.10.3.1 Estequiometría a partir de diagramas de fase tipo A	30
1.10.3.2 Estequiometría a partir de diagramas de fase tipo B	32
1.11 MÍNIMOS CUADRADOS PONDERADOS TOTALES	33
1.13 PRUEBA DE DURBIN-WATSON	35
CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	37
2.1 PRIMERA ETAPA EXPERIMENTAL	37

2.2 SEGUNDA ETAPA EXPERIMENTAL.....	37
2.3 TERCERA ETAPA EXPERIMENTAL	38
2.4 SELECCIÓN DE VARIABLES.....	38
2.5 EQUIPO EXPERIMENTAL	39
CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
3.1 SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL CLORHIDRATO DE <i>P</i> -CLOROFENILBIGUANIDA.....	41
3.2 SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE COLIL S-TRIAZINA.....	46
3.3 COMPLEJACIÓN DE COLIL S-TRIAZINA CON BETACICLODEXTRINAS.....	56
3.4 EVALUACIÓN DESINFECTANTE DE LOS COMPLEJOS DE INCLUSIÓN CON BETACICLODEXTRINAS	68
CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	70
CAPÍTULO 5. BIBLIOGRAFÍA	71
APÉNDICE A. DATOS EXPERIMENTALES	78
APÉNDICE B. DATOS INTERMEDIOS	81
APÉNDICE C. MUESTRA DE CÁLCULO	92
APÉNDICE D. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	100
APÉNDICE E. NOMENCLATURA.....	101
ANEXO A. TABLAS DE SIGNIFICANCIA PARA LA PRUEBA DE DURBIN-WATSON.....	106
ANEXO B. DENSIDADES DE SISTEMAS BINARIOS A DIFERENTES TEMPERATURAS.....	109
ANEXO C. SEÑALES CARACTERÍSTICAS ¹H, ¹³C RMN DE DISOLVENTES.....	110

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
CUADRO 1.1 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA REPORTADA PARA ALGUNOS DERIVADOS AMIDOBILIARES.....	11
CUADRO 1.2 VALORES MIC REPRESENTATIVOS DE ALGUNAS S-TRIAZINAS FRENTE A ORGANISMOS PATÓGENOS DE IMPORTANCIA SANITARIA.....	13
CUADRO 1.3 SEÑALES CARACTERÍSTICAS DE ALGUNOS GRUPOS FUNCIONALES EN UN ESPECTRO IR.....	19
CUADRO 1.4 DESPLAZAMIENTOS QUÍMICOS COMUNES EN LA ESPECTROSCOPIA ¹³ C-RMN	23
CUADRO 1.5 EXPERIMENTOS 2D-RMN BASADOS EN CORRELACIONES POR DESPLAZAMIENTO QUÍMICO	24
CUADRO 1.6 ALGUNAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LAS CICLODEXTRINAS.....	27
CUADRO 1.7 SOLUBILIDAD EN AGUA REPORTADA DE ALGUNOS FÁRMACOS COMPLEJADOS CON HP- BCD	27
CUADRO 2.1 EQUIPO EXPERIMENTAL UTILIZADO EN LA ETAPA PREPARATORIA	38
CUADRO 2.2 EQUIPOS UTILIZADOS EN LAS DOS PRIMERAS ETAPAS EXPERIMENTALES	39
CUADRO 3.1 ASIGNACIÓN DE LAS BANDAS PRINCIPALES DEL IR PARA EL PRECURSOR <u>15</u>	43
CUADRO 3.2 ASIGNACIÓN DE LAS BANDAS PRINCIPALES DEL IR PARA EL PRODUCTO <u>24</u>	50
CUADRO 3.3 PARÁMETROS DE REGRESIÓN LINEAL PARA CADA CURVA DE CALIBRACIÓN AL 10% Y AL 15% DMSO.	58
CUADRO 3.4 RESULTADOS DE LA PRUEBA CHI CUADRADO PARA CADA MUESTRA AL 95% DE CONFIANZA	59
CUADRO 3.5 PARÁMETROS DE REGRESIÓN LINEAL DE CADA COMPLEJO TRIAZINA:CICLODEXTRINA	62
CUADRO 3.6 PARÁMETROS DEL MODELO DE REGRESIÓN DE SEGUNDO ORDEN PARA EL COMPLEJO BCD.	64
CUADRO 3.7 PRUEBA DE DURBIN-WATSON PARA CADA MODELO DE AJUSTE	65
CUADRO 3.8 CONSTANTES DE FORMACIÓN PROPUESTAS PARA CADA COMPLEJO DE INCLUSIÓN.....	67

CUADRO 3.9 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DESINFECTANTE DE LOS COMPLEJOS 24:HP-BCD Y 24:BCD SEGÚN EL MÉTODO ASTM E2315-16.	69
CUADRO A.1 PRUEBAS DE SOLUBILIDAD – CRISTALIZACIÓN PARA LOS DISTINTOS CRUDOS A PARTIR DE <u>24</u>	79
CUADRO A.2 PRUEBAS DE SOLUBILIDAD DE <u>24</u> EN CICLODEXTRINAS	79
CUADRO B.1 DATOS NECESARIOS PARA EL CÁLCULO DE LA CONCENTRACIÓN INICIAL DE 24 UTILIZADA EN LA PREPARACIÓN DE LOS PATRONES DE DILUCIÓN DE CADA CURVA DE CALIBRACIÓN.....	81
CUADRO B.2 PATRONES DE DILUCIÓN EMPLEADOS EN LA CURVA DE CALIBRACIÓN DE 24 A PARTIR DE UN 10% DMSO EN AGUA.....	81
CUADRO B.3 PATRONES DE DILUCIÓN EMPLEADOS EN LA CURVA DE CALIBRACIÓN DE 24 A PARTIR DE UN 15% DE DMSO EN AGUA.....	81
CUADRO B.4 FUENTES INSTRUMENTALES DE ERROR EN LA MEDICIÓN DE MASA DE LA BALANZA ANALÍTICA DE CINCO DECIMALES.....	81
CUADRO B.5 DETERMINACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE DE LA MICROPIPETA DE 5000 μ L.....	82
CUADRO B.6 DETERMINACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE DE LA MASA MOLECULAR DE 24	82
CUADRO B.7 FUENTES INSTRUMENTALES DE ERROR EN LA MEDICIÓN DE ABSORBANCIA DEL ESPECTROFOTÓMETRO UV-VISIBLE SHIMADZU 1700-UV	82
CUADRO B.8 PARÁMETROS REQUERIDOS EN LA DETERMINACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE DEL VOLUMEN DE CALIBRACIÓN A 20 °C	82
CUADRO B.9 VARIANZA DE LA ABSORBANCIA ASOCIADA AL ERROR INSTRUMENTAL DEL ESPECTROFOTÓMETRO UV PARA CADA CURVA DE CALIBRACIÓN DE 24.....	82
CUADRO B.10 PARÁMETROS REQUERIDOS EN LA DETERMINACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE DE LA CONCENTRACIÓN DE CADA PATRÓN EN LAS CURVAS DE CALIBRACIÓN DE 24	83
CUADRO B.11 INCERTIDUMBRE COMBINADA DE LA CONCENTRACIÓN DE CADA PATRÓN DE CALIBRACIÓN DE 24	83
CUADRO B.12 VARIANZA POR MUESTRA DE ABSORBANCIA ASOCIADA AL ERROR INSTRUMENTAL PARA CADA CURVA DE CALIBRACIÓN DE 24	83
CUADRO B.13 MATRICES X Y E GENERADAS A PARTIR DEL MÉTODO WTLS EN LA DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE REGRESIÓN LINEAL PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN DE 24 EN 10% Y 15% DMSO.....	84

CUADRO B.14 MATRIZ Q GENERADA A PARTIR DEL MÉTODO WTLS EN LA DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE REGRESIÓN LINEAL PARA LAS CURVAS DE CALIBRACIÓN DE 24 EN 10% DMSO.	84
CUADRO B.15 MATRIZ Q GENERADA A PARTIR DEL MÉTODO WTLS EN LA DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE REGRESIÓN LINEAL PARA LAS CURVAS DE CALIBRACIÓN DE 24 EN 15% DMSO.	85
CUADRO B.16 RESIDUOS DE CADA MODELO RESPECTO A LOS VALORES OBSERVADOS DE CALIBRACIÓN	85
CUADRO B.17 DATOS GENERADOS EN LA PRUEBA DE NORMALIDAD Z PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN AL 10% DMSO	85
CUADRO B.18 DATOS GENERADOS EN LA PRUEBA DE NORMALIDAD Z PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN AL 15% DMSO	86
CUADRO B.19 DATOS DE PRUEBA PARA EL DIAGRAMA DE FASES DE 24 CON β CD.....	86
CUADRO B.20 DATOS DE PRUEBA PARA EL DIAGRAMA DE FASES DE 24 CON HP- β CD	86
CUADRO B.21 COEFICIENTES REQUERIDOS EN LA DETERMINACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE DE LA CONCENTRACIÓN DE 24 EN EL SISTEMA TRIAZINA:BCD	87
CUADRO B.22 COEFICIENTES REQUERIDOS EN LA DETERMINACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE DE LA CONCENTRACIÓN DE 24 EN EL SISTEMA TRIAZINA:HP-BCD.....	87
CUADRO B.23 PARÁMETROS ADICIONALES REQUERIDOS EN LA DETERMINACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE DE LA CONCENTRACIÓN DE TRIAZINA EN EL SISTEMA TRIAZINA:HP-BCD.....	87
CUADRO B.24 MATRIZ Q GENERADA A PARTIR DEL MÉTODO WTLS EN LA DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE REGRESIÓN LINEAL DEL DIAGRAMA DE FASES DEL COMPLEJO TRIAZINA:BCD	88
CUADRO B.25 MATRIZ Q GENERADA A PARTIR DEL MÉTODO WTLS EN LA DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE REGRESIÓN LINEAL DEL DIAGRAMA DE FASES DEL COMPLEJO TRIAZINA:HP-BCD.	88
CUADRO B.26 MATRICES X Y E GENERADAS A PARTIR DEL MÉTODO WTLS EN LA DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE REGRESIÓN LINEAL DE LOS DIAGRAMAS DE FASES DE CADA COMPLEJO	89
CUADRO B.27 SUMA DE CUADRADOS DE RESIDUOS DEL MODELO DE AJUSTE LINEAL RESPECTO A LOS VALORES OBSERVADOS DE CTRI EN EL SISTEMA TRIAZINA:HP-BCD.....	89

CUADRO B.28 SUMA DE CUADRADOS DE RESIDUOS DEL MODELO DE AJUSTE LINEAL RESPECTO A LOS VALORES OBSERVADOS DE CTRI EN EL SISTEMA TRIAZINA:BCD	90
CUADRO B.29 SUMA DE CUADRADOS DE RESIDUOS DEL MODELO DE AJUSTE DE SEGUNDO ORDEN RESPECTO A LOS VALORES OBSERVADOS DE CTRI EN EL SISTEMA TRIAZINA:BCD	90
CUADRO B.30 DATOS GENERADOS EN LA VERIFICACIÓN DEL SUPUESTO DE NORMALIDAD DEL MODELO DE REGRESIÓN LINEAL DEL COMPLEJO TRIAZINA:BCD.	90
CUADRO B.31 DATOS GENERADOS EN LA VERIFICACIÓN DEL SUPUESTO DE NORMALIDAD DEL MODELO DE REGRESIÓN LINEAL DEL COMPLEJO TRIAZINA:HP-BCD.....	91
CUADRO B.32 DATOS GENERADOS EN LA VERIFICACIÓN DEL SUPUESTO DE NORMALIDAD DEL MODELO DE REGRESIÓN DE SEGUNDO ORDEN DEL COMPLEJO TRIAZINA:BCD.....	91
CUADRO D.1 PATRÓN DE DILUCIONES PARA LA PRUEBA DE HIGUCHI CONNORS DE 24 CON CADA CICLODEXTRINA.....	102

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1.1. CADENA DE TRANSMISIÓN DE LOS MICROORGANISMOS EN CENTROS DE ATENCIÓN A LA SALUD	2
FIGURA 1.2. ESTRUCTURA DE LOS ÁCIDOS BILIARES.....	7
FIGURA 1.3. ALGUNOS DERIVADOS METABÓLICOS A PARTIR DEL COLESTEROL.....	8
FIGURA 1.4. CARÁCTER ANFIPÁTICO DEL ÁCIDO CÓLICO.	9
FIGURA 1.5 ESTRUCTURA DE UN COLANO CON SUSTITUYENTES R1, R2, R3 Y R.....	10
FIGURA 1.6 SÍNTESIS DE ALGUNOS DERIVADOS AMIDOBILIARES FUNCIONALIZADOS EN LA POSICIÓN 24 DE 1 Y 2 CON IMPORTANTE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.....	10
FIGURA 1.7. ALGUNAS BIGUANIDAS CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA.....	12
FIGURA 1.8. ALGUNAS S-TRIAZINAS CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA	13
FIGURA 1.9 ESTRATEGIA GENERAL DE SÍNTESIS DE ALGUNOS DE LOS DERIVADOS BILIARES EVALUADOS EN SU ACTIVIDAD ANTITUMORAL EN COSTA RICA.....	14
FIGURA 1.10 SÍNTESIS DE CLORHIDRATO DE P-CLOROFENILBIGUANIDA A PARTIR DE P-CLOROANILINA Y 1-CIANOGLUANIDINA MEDIANTE EL CALENTAMIENTO POR MICROONDAS.....	15
FIGURA 1.11 ALGUNOS ACTIVADORES Y CATALIZADORES UTILIZADOS EN LA SÍNTESIS DE DERIVADOS DE ÁCIDOS BILIARES	16
FIGURA 1.12 RUTA SINTÉTICA BASADA EN EL MÉTODO DEL ANHÍDRIDO MIXTO: PRIMER PASO DE CONVERSIÓN HACIA EL INTERMEDIARIO.....	16
FIGURA 1.13. RUTA SINTÉTICA BASADA EN EL MÉTODO DEL ANHÍDRIDO MIXTO: PASO RÁPIDO DE CONVERSIÓN HACIA EL SUSTRATO DE INTERÉS	16
FIGURA 1.14 REACCIÓN DE FORMACIÓN DEL COMPLEJO MORADO DE RUHEMANN.	17
FIGURA 1.15 ESPECTRO ¹ H-RMN DEL ACETATO DE BENCILO QUE CONTIENE LA ESCALA DE FRECUENCIA ABSOLUTA Y LA ESCALA DE FRECUENCIA RELATIVA.....	22
FIGURA 1.16 TIPOS DE GRÁFICOS OBTENIDOS AL APLICAR LA TRANSFORMADA DE FOURIER EN 2D.....	24
FIGURA 1.17 TOTAL DE SEÑALES INDIVIDUALES POR FRECUENCIA EN EL EJEMPLO DADO	25

FIGURA 1.18 CORRELACIONES DE LAS SEÑALES EN EL ESPECTRO COSY DEL EJEMPLO DADO	26
FIGURA 1.18. DIAGRAMAS DE SOLUBILIDAD TIPO A	30
FIGURA 1.19 DIAGRAMAS DE FASES TIPO B _s Y B _l	32
FIGURA 1.20 DIAGRAMA DE FASES CON INMEDIATO DESCENSO EN LA CONCENTRACIÓN APARENTE DE S.....	33
FIGURA 2.1 DIAGRAMA EXPERIMENTAL PARA LA EJECUCIÓN DE LA PRUEBA DE HIGUCHI-CONNORS.....	39
FIGURA 3.1. SÍNTESIS MEDIANTE CATÁLISIS ÁCIDA DE <i>P</i> -CLOROFENILBIGUANIDA A PARTIR DE <i>P</i> -CLOROANILINA Y 1-CIANOANIDINA.....	41
FIGURA 3.2 ESPECTRO IR DE <i>P</i> -CLOROFENILBIGUANIDA.....	42
FIGURA 3.3 ESPECTRO ¹ H-RMN DE <i>P</i> -CLOROFENILBIGUANIDA	44
FIGURA 3.4 ESPECTRO ¹³ C-RMN DE <i>P</i> -CLOROFENILBIGUANIDA	44
FIGURA 3.5 ESPECTRO COSY DE <i>P</i> -CLOROFENILBIGUANIDA.....	45
FIGURA 3.6 ESPECTRO HSQC DE <i>P</i> -CLOROFENILBIGUANIDA	45
FIGURA 3.7 ESPECTRO HMBC DE <i>P</i> -CLOROFENILBIGUANIDA	46
FIGURA 3.8 RUTA SINTÉTICA PROPUESTA BASADA EN EL MÉTODO DEL ANHÍDRIDO MIXTO.....	47
FIGURA 3.9 MECANISMO DE FORMACIÓN DEL PRODUCTO CICLADO 24.....	49
FIGURA 3.10 ESPECTRO IR DEL PRODUCTO 24	50
FIGURA 3.11 POSICIONES EN LA ESTRUCTURA DEL COMPUESTO 24.....	51
FIGURA 3.12 CORRESPONDENCIA POR CORRELACIÓN BIDIMENSIONAL DE LAS SEÑALES ¹ H-RMN (COLOR AZUL) Y DEL ¹³ C-RMN (COLOR ROJO) EN EL PRODUCTO 24.....	51
FIGURA 3.13 ESPECTRO ¹ H-RMN DEL PRODUCTO 24.....	52
FIGURA 3.14 ESPECTRO ¹³ C-RMN DEL PRODUCTO 24	53
FIGURA 3.15. ESPECTRO ¹⁵ N HMBC PARA EL PRODUCTO 24.....	54
FIGURA 3.16 ESPECTRO COSY DEL PRODUCTO 24.....	54
FIGURA 3.17 ESPECTRO HSQC DEL PRODUCTO 24.....	55
FIGURA 3.18 ESPECTRO DE MASAS DEL PRODUCTO 24	55
FIGURA 3.19 INCERTIDUMBRE COMBINADA DE LA CONCENTRACIÓN DEL ANALITO EN LA MEDICIÓN DE ABSORBANCIA.....	58

FIGURA 3.20 GRÁFICA DE RESIDUOS CONTRA PREDICHOS DEL MODELO DE AJUSTE EN LA CURVA DE CALIBRACIÓN CON DMSO 10%.	60
FIGURA 3.21 GRÁFICA DE RESIDUOS CONTRA PREDICHOS DEL MODELO DE AJUSTE EN LA CURVA DE CALIBRACIÓN CON DMSO 15%	60
FIGURA 3.22 GRÁFICA DE RESIDUOS ORDENADOS CONTRA VALOR NORMAL Z DEL MODELO DE AJUSTE EN LA CURVA DE CALIBRACIÓN CON DMSO 15%.	61
FIGURA 3.23 RESIDUOS CONTRA PREDICHOS EN EL MODELO DE LA CURVA DEL DIAGRAMA DE FASES 24:HP-BCD.....	63
FIGURA 3.24 RESIDUOS CONTRA PREDICHOS EN EL MODELO DE REGRESIÓN LINEAL DEL COMPLEJO 24:BCD.	63
FIGURA 3.25 RESIDUOS CONTRA PREDICHOS EN EL MODELO DE REGRESIÓN DE SEGUNDO ORDEN DEL COMPLEJO 24:BCD	64
FIGURA 3.26 GRÁFICA DE RESIDUOS ORDENADOS CONTRA VALOR NORMAL Z DEL MODELO DE AJUSTE PARA EL COMPLEJO CON HP-BCD.....	66
FIGURA 3.27 GRÁFICA DE RESIDUOS ORDENADOS CONTRA VALOR NORMAL Z DEL MODELO DE AJUSTE PARA EL COMPLEJO CON BCD	66
FIGURA A.1 ESPECTRO IR DEL ÁCIDO CÓLICO.	78
FIGURA A.2 BARRIDO UV DEL PRODUCTO 24.....	78

Capítulo 1. Introducción

Las autoridades sanitarias recomiendan reducir la utilización de antibióticos: su empleo inadecuado y prolongado ha permitido el desarrollo de cepas multiresistentes que causan la muerte de un niño en el sureste asiático cada 5 minutos a causa de una infección intrahospitalaria (Roca, Akova, Baquero, Carlet, Cavaleri & Coenen, 2015; Khan, Baig & Mehboob, 2017). La síntesis orgánica de nuevos fármacos a partir de derivados biliares y la posterior evaluación de la actividad antimicrobiana de estos candidatos es posible gracias al esfuerzo interdisciplinario.

Es importante destacar las contribuciones de la química supramolecular a la síntesis de nuevos bloques de construcción con importancia farmacológica e industrial.

1.1 Transmisión de los microorganismos en los centros de atención de la salud

Por definición, un microorganismo es un agente biológico capaz de generar una colonización o infección en un hospedero. Una infección es la presencia de un microorganismo que vive, crece y se reproduce en el tejido del huésped e induce una respuesta inmune, es decir genera signos y síntomas. Una colonización se diferencia de una infección, en que no necesariamente induce una respuesta inmune (OPS, 2017).

Una infección por parte de este agente depende de las siguientes condiciones:

- Dosis infectante.
- Virulencia: capacidad del agente de causar una enfermedad grave o la muerte.
- Carácter invasivo: capacidad del agente de penetrar tejidos del hospedero y multiplicarse.
- Patogenicidad: capacidad del agente de causar enfermedad por distintos mecanismos (OPS, 2017).

Para desarrollar una infección, se debe seguir un orden lógico de elementos que permite la transmisión de un microorganismo infeccioso a un huésped susceptible tal como se muestra en la siguiente figura.

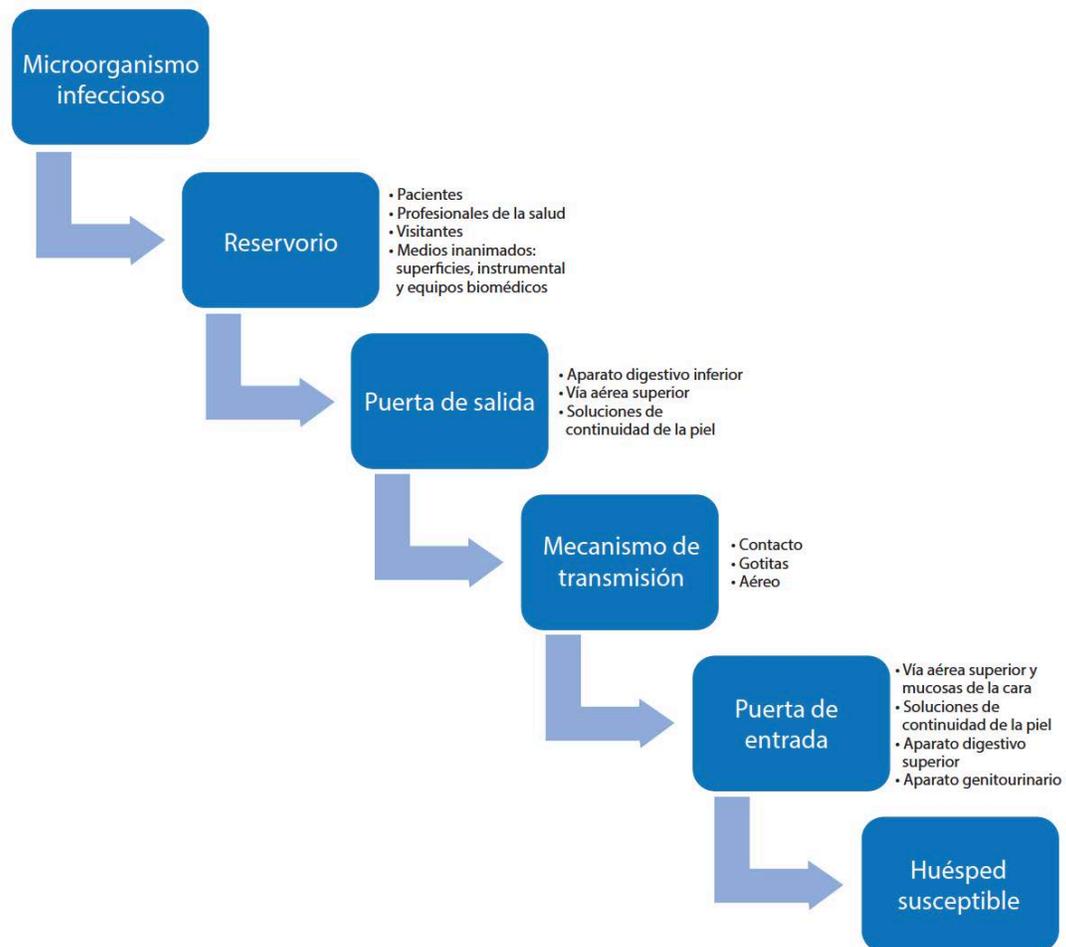


Figura 1.1. Cadena de transmisión de los microorganismos en centros de atención a la salud (OPS, 2017).

Cada uno de los componentes de la Figura 1.1 debe estar presente, en caso contrario se interrumpirá la cadena y no habrá transmisión (OMS, 2003).

1.1.1 Infecciones nosocomiales

Las infecciones nosocomiales se adquieren durante una estadía en un hospital y posterior a las 48 h de permanencia en las unidades de cuidados intensivos (ICU por sus siglas en inglés). Representan la segunda causa de mortalidad en el mundo y su desarrollo ocurre de manera localizada: Se reportan más de 50 sitios de proliferación de las infecciones nosocomiales (Olaechea, Insausti, Blanco & Luque, 2010; Khan, Ahmad & Mehboob, 2015). Las más frecuentes se enuncian como sigue:

- **Infecciones del torrente sanguíneo asociadas a la línea central (CLABSI):** ocurren en el torrente sanguíneo debido a una utilización prolongada de los catéteres que se colocan en la vía venosa. La tasa mundial de mortalidad de las CLABSI se encuentra entre el 12% y el 25% (Khan et al., 2017).
- **Infecciones del tracto urinario asociadas a la utilización de catéteres (CAUTI):** Los catéteres colocados en el tracto urinario retienen una porción de la orina en el riñón. Estas condiciones favorecen la proliferación bacteriana de la microflora nativa. Las CAUTIs pueden desarrollar complicaciones como prostatitis, cistitis y meningitis (Lobdell, Sotiris & Sánchez, 2012; Khan et al., 2015).
- **Infecciones quirúrgicas en el sitio (SSI):** El principal patógeno que causa la SSI es *Staphylococcus aureus*, este microorganismo se desarrolla en la microflora endógena del paciente (Khan et al., 2015).
- **Neumonía asociada a la ventilación (VAP):** ocurre 48 h después de la incubación traqueal y el 86% de la neumonía nosocomial se relaciona con la ventilación en sala (Lobdell et al., 2012)

1.1.2 Patógenos nosocomiales

Los patógenos responsables de las infecciones nosocomiales son bacterias, virus y hongos. Su presencia varía según el paciente, las facilidades médicas y las condiciones ambientales del tratamiento médico. Enseguida, se detallan los patógenos más comunes en las instalaciones hospitalarias:

- **Bacterias:** son los agentes patógenos que provocan la mayor incidencia de infecciones nosocomiales. Existen las denominadas *bacterias comensales* que se encuentran en la flora natural del paciente y su presencia previene la colonización de agentes patógenos, sin

embargo, son propensas a causar infecciones ante una vulnerabilidad en el sistema inmunológico. Por otra parte, existen las *bacterias patógenas* que presentan mayor virulencia y causan infecciones independientemente del estado inmunológico del huésped. Las bacterias más comunes en las ICUs son:

- *Clostridium difficile*: este patógeno provoca la inflamación del colón. Los síntomas asociados corresponden a diarrea y colitis. Su transmisión ocurre a través de un inapropiado procedimiento de lavado de manos (Khan et al., 2015).
 - *Enterobacteriaceae* resistente al carbapenem: es una amplia familia de bacterias gram negativo con capacidad de desarrollar infecciones en otros sitios al desplazarse desde el intestino grueso. Pertenecen a este grupo *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, su alta resistencia al carbapenem dificulta el desarrollo de mecanismos de defensa ante estos patógenos (Khan et al., 2015).
 - *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA): los primeros casos de resistencia a los antibióticos β -lactámicos se reportaron en 1940 debido a la generación de la enzima penicilinas. Con la aparición de las cefalosporinas, la resistencia se generó nuevamente por el cambio en la conformación de las proteínas que se unen a la penicilina. La vía de transmisión de este coccus gram positivo es por contacto directo, heridas abiertas y un inapropiado lavado de manos (Khan et al., 2015).
 - *Bacteroides fragilis*: es una bacteria comensal que se desarrolla en el tracto intestinal y en el colon. Es capaz de formar infecciones según su interacción con otras bacterias (Khan et al., 2015).
 - *Pseudomonas aeruginosa*: bacteria de tipo gram negativo capaz de sobrevivir en condiciones adversas y afín a los ambientes húmedos. Es un patógeno oportunista que secreta toxinas capaces de dañar los tejidos donde reside y causa infecciones en el tracto urinario, en el sistema respiratorio, dermatitis, e infecciones en hueso y articulaciones. Representa el 17.4% de las neumonías nosocomiales en los Estados Unidos de América (Moolenaar, Crutcher, San Joaquín, Sewell & Hutwagner, 2000; Khan et al., 2015).
- **Virus:** representan cerca del 5% de las infecciones nosocomiales registradas. Su transmisión es a través de las vías respiratoria, fecal, oral por medio del contacto mano –

boca y a través de malas prácticas en la manipulación de jeringas (Khan et al., 2017). Los virus más comunes, en generar infecciones nosocomiales, son:

- Influenza
 - Rotavirus
 - VIH
 - Herpes-simplex
 - Hepatitis B y C
- **Hongos parásitos:** actúan como patógenos oportunistas en sujetos con un sistema inmunológico débil (Khan et al., 2017). Algunos de estos parásitos responsables de infecciones nosocomiales son:
- *Aspergillus* spp
 - *Candida albicans*
 - *Cryptococcus neoformans*

1.1.3 Prevención y detección de las infecciones nosocomiales en Costa Rica

Desde el 2002, la Caja Costarricense del Seguro Social (CCSS) impulsa el Programa de Control y Prevención de Infecciones Nosocomiales con el fin de mitigar la alta mortalidad de los pacientes, reducir los costos de estancia y el prolongamiento de la atención hospitalaria (CCSS, 2003).

Los indicadores recopilados por la CCSS proporcionan una mejora en la calidad de la atención hospitalaria: se registra el cambio de la epidemiología intrahospitalaria, el desarrollo de resistencia de los microorganismos patógenos respecto a los antibióticos, la estrategia de prevención de estas infecciones mediante el correcto y oportuno lavado de manos y el monitoreo constante de nuevas infecciones nosocomiales

En el período 2011-2013, se observó un incremento del 1% anual en los casos locales reportados de pacientes con infecciones nosocomiales. En respuesta, la CCSS evaluó las mejoras operativas de limpieza y desinfección y, en el período 2015-2018, solo el 2% de los pacientes hospitalizados por más de 48 h en ICUs de 27 hospitales de la CCSS adquirieron alguna de las infecciones asociadas a los servicios de atención en salud (IAAS). El valor de este indicador a nivel nacional

se encuentra muy por debajo del promedio mundial reportado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) que corresponde a un 15% (OPS, 2017).

1.2 Evaluación de la acción desinfectante por el método ASTM E2315-16

La definición de desinfección, según Codex Alimentarius, es permisiva en cuanto a la sobrevivencia de células patógenas después de la aplicación de un desinfectante sobre una superficie de contacto, ya que de lo contrario se trataría de un proceso de esterilización (Cerf, Carpentier & Sanders, 2010).

El ámbito de reducción de una cepa microbiana varía de acuerdo a su propia cinética de muerte celular y a su adhesión particular en cada superficie. Esto último es relevante, ya que las células sobrevivientes a la aplicación desinfectante se encuentran adheridas con mayor intensidad y esto dificulta su detección (Cerf et al., 2010).

A diferencia de los antibióticos que se aplican a una temperatura cercana a la temperatura corporal, la temperatura de aplicación de un desinfectante permite un ámbito amplio que inicia por debajo de los 0 °C, en sistemas de refrigeración, hasta más de 100 °C, en intercambiadores de calor de flujo continuo, por lo que su actividad puede variar de acuerdo a la temperatura de aplicación (Cerf et al., 2010)

En el método ASTM E2315-16, una población bacteriana mínima de 10^6 ufc/mL se encuentra suspendida en un medio de cultivo. La sustancia de prueba se inocula a la temperatura y concentración de aplicación del producto y debe generar una reducción de al menos 5 log en la población microbiana de prueba para afirmar que mostró actividad como desinfectante (E35 Committee, 2016).

1.3 Importancia de la biosíntesis de los derivados biliares

En la síntesis orgánica de derivados biliares, se parte de alguno de los cinco ácidos biliares biosintetizados por células hepáticas: ácido cólico, ácido desoxicólico, ácido quenodesoxicólico, ácido litocólico y ácido taurocólico. En la Figura 1.2 se muestran las estructuras químicas de estos ácidos biliares.

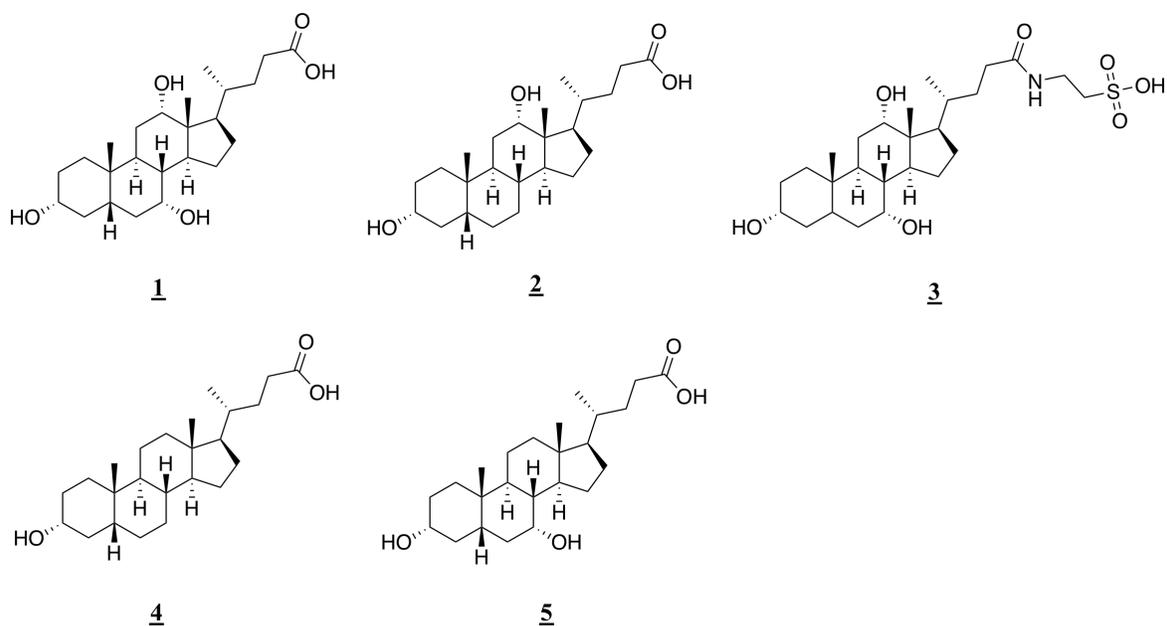


Figura 1.2. Estructura de los ácidos biliares: (1) ácido cólico, (2) ácido desoxicólico, (3) ácido taucólico, (4) ácido litocólico y (5) ácido quenodesoxicólico.

Tanto el colesterol sintetizado en el hígado como el que se encuentra biodisponible a través de la dieta, generan cuatro derivados con las siguientes funciones:

- **Hidroxiesteroides:** participan en la regulación de la biosíntesis del colesterol.
- **Ésteres del colesterol:** transportados en forma de lipoproteínas a otros tejidos que requieran colesterol.
- **Hormonas esteroidales:** son agentes de señalización que son transportados vía sanguínea mediante acarreadores de proteínas. Se unen a receptores nucleares presentes en las células de tejidos específicos y se genera un cambio en la expresión genética y en la respuesta deseada. Por ejemplo, el cortisol y la aldosterona participan en la regulación del metabolismo de la glucosa, en tanto que el estradiol y testosterona son hormonas sexuales.
- **Ácidos biliares y sus sales:** se sintetizan en el hígado y se almacenan en forma de bilis en la vesícula biliar. Su acción emulsificante determina el transporte de las micelas con grasas hacia el intestino delgado; las lipasas y lipoproteínas presentes facilitan su absorción intestinal (Nelson & Cox, 2012).

En la siguiente figura, se muestran algunas estructuras esteroidales con funciones de señalización biológica.

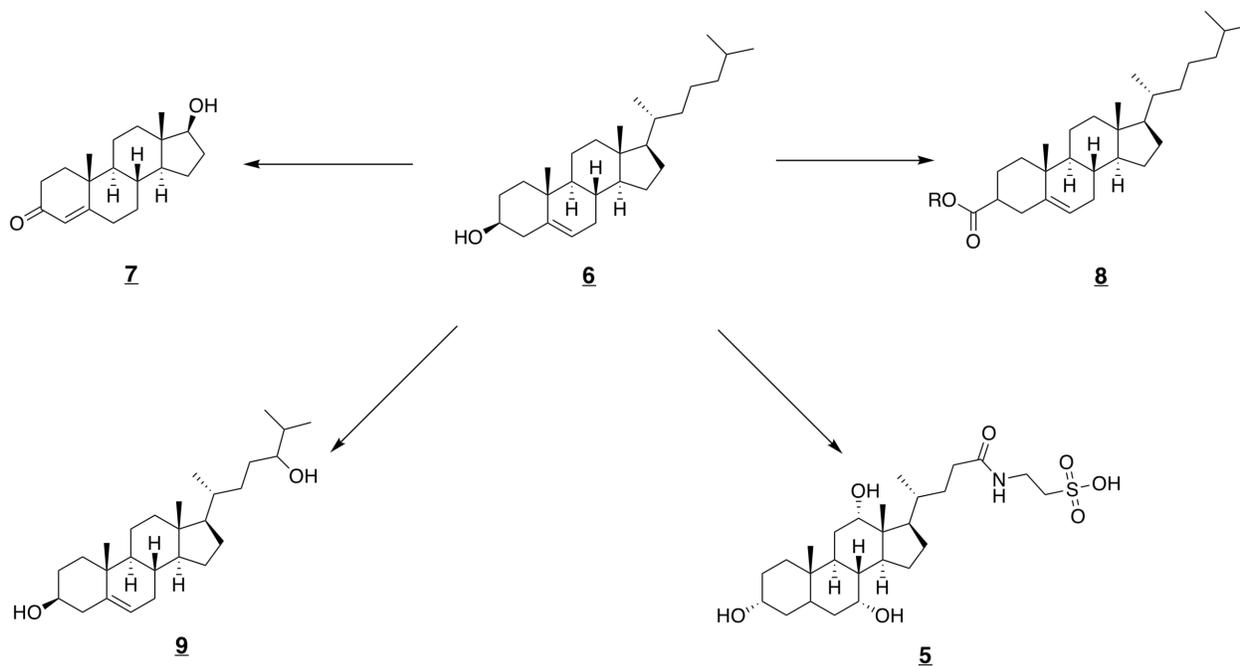


Figura 1.3. Algunos derivados metabólicos a partir del colesterol: (5) ácido taurocólico, (7) testosterona, (8) un éster de colesterol y (9) 24-hidroxicolesterol.

1.4 Actividad biológica de los ácidos biliares y sus derivados

La actividad biológica de los derivados biliares, se ha investigado con mayor profundidad desde finales del siglo XX con reportes recientes de actividad citotóxica y posible actividad desinfectante (Gupta, Kumar & Negi, 2013; Salazar, 2017).

En la Figura 1.4, se aprecia el sistema esteroidal de anillos lo suficientemente estable y caracterizado por contener sustituyentes hidroxilo en posición axial de la cara α hidrófila, en tanto que, los grupos metilo, se encuentran direccionados hacia la cara hidrófoba β . Es por este carácter anfipático que los derivados biliares pueden interactuar entre ellos mismos y con los diferentes componentes celulares de los patógenos, por lo que un cambio en la naturaleza química de los sustituyentes presentes afecta la actividad biológica de los derivados biliares (Zhong, Yan & Zhao, 2005)

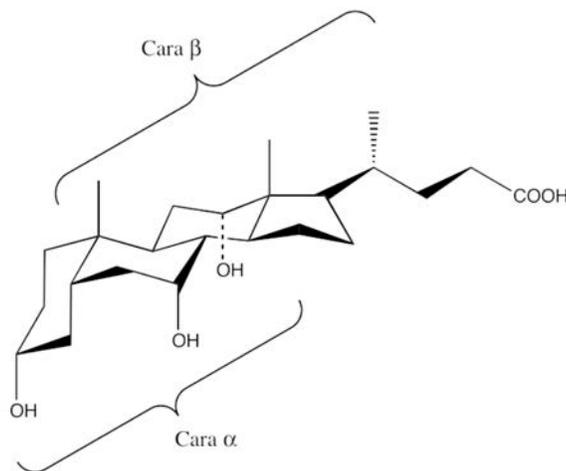


Figura 1.4. Carácter anfipático del ácido cólico.

Las bacterias tipo gram negativo contienen, en la sección superior de su membrana externa, una capa de lipopolisacáridos rica en lípido A, un dímero fosforilado de glucosamina unido a seis o siete ácidos grasos. Esta capa provee una barrera de permeabilidad a moléculas hidrófobas, proteasas y lisosomas. (Epanand et al., 2007). Además, es responsable de proteger a las bacterias gram negativo de agentes generadores de estrés, incluyendo antibióticos (Metzger, Lee, Finer-Moore, Raetz & Stroud, 2012).

A concentraciones altas de sustrato, se ha obtenido un efecto bactericida a causa de la acción quelante de muchos de estos derivados biliares en la formación de complejos de hierro que inducen la ruptura del lípido A en la membrana celular de las bacterias gram negativas. Como mecanismo de respuesta, en el citoplasma, se secretan portadores de hierro que facilitan la restitución de la pared celular. Una vez que el derivado biliar ha penetrado la membrana, este compete con el portador de hierro en la formación del complejo de hierro, desestabilizando al portador y transformando su identidad. De esta forma, la lisis es producida y el mecanismo de respuesta por parte de la bacteria es inhibido (Bellini, Mencini, Quaglio, Guarneri & Fini, 1990; Raetz, Reynolds, Trent & Bishop, 2007).

Una serie análoga de ácidos biliares con el sustituyente R, indicado en la figura 1.5, presenta mayor actividad antimicrobiana cuando X es un carbono alifático, en vez de un carbonilo. Se justifica, como posible causa, el incremento de la basicidad y del carácter hidrófobo de la

molécula (Bellini et al., 1990).

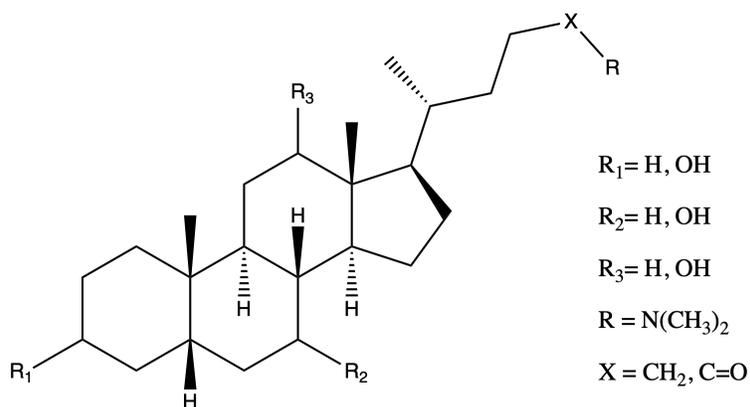


Figura 1.5 Estructura de un colano con sustituyentes R_1 , R_2 , R_3 y R .

Además, los colatos de tipo catiónico han reportado un comportamiento antibiótico similar al de los péptidos antimicrobianos, con la ventaja de no ser susceptibles al desarrollo de la resistencia bacteriana (Zhong et al., 2005). Este comportamiento también se ha reportado en la síntesis de derivados biliares funcionalizados en la posición 24 de los ácidos cólico y desoxicólico a partir de aminoalcoholes quirales aromáticos (Hazra, Pore, Dey, Datta, Darokar, Saikia, Khanuja & Thakur, 2004).

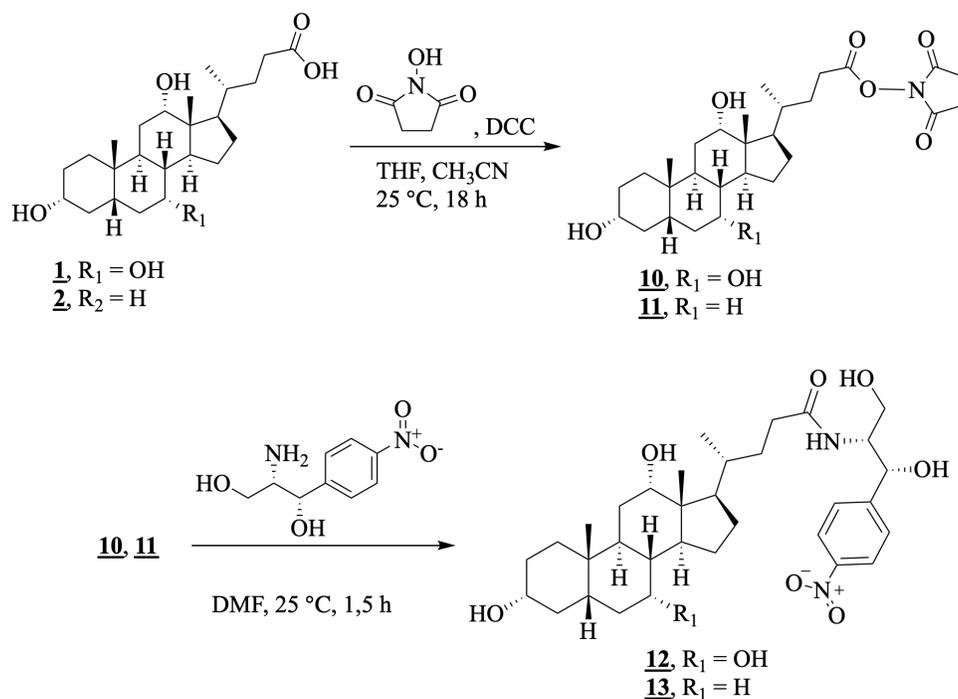


Figura 1.6 Síntesis de algunos derivados amidobiliares funcionalizados en la posición 24 de 1 y 2 con importante actividad antimicrobiana (Hazra et al., 2004).

Enseguida, se muestra un cuadro comparativo de actividad antibacterial entre los derivados amidobiliares de la Figura 1.6 y dos antibióticos. Estos derivados mostraron actividad antimicrobiana significativa ante bacterias gram positivo; por el contrario, no se consideró significativa en un grupo de cinco bacterias gram negativo, incluyendo a *Escherichia coli*. Todos los ensayos realizados por Hazra et al (2004), se efectuaron mediante un ensayo de microdilución.

Cuadro 1.1 Actividad antimicrobiana reportada para los derivados amidobiliares de la Figura 1.6 (Hazra et al., 2004)

Compuesto	IC ₅₀ (µg/mL)			
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermis</i>	<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<u>12</u>	75	100	6	60
<u>13</u>	7,5	7,5	4	15
Vancomicina	0,12	0,3	0,12	0,06
Estreptomina	0,3	0,12	0,12	1,25

El valor de IC₅₀ indica la concentración de sustancia de prueba requerida para causar la letalidad del 50% de la población de patógeno disponible en el ensayo. De acuerdo a los resultados del cuadro anterior, se puede inferir que los compuestos **12** y **13** mostraron una mayor actividad antimicrobiana en *Streptococcus mutans* que en las demás bacterias gram negativo. Además, **13** resultó más efectivo que **12**, pero no al grado de los antibióticos de prueba.

1.5 Actividad biológica de las biguanidas

El gluconato de clorhexidina es referente por su acción bacterioestática y bactericida; cubre un amplio espectro de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Se ha determinado que a valores de pH y temperaturas moderadamente altas, se incrementa su actividad esporicida y se prolonga la inhibición del crecimiento de las esporas remanentes (Nerandzic & Donskey, 2015).

El proguanil, a través de su metabolito cicloguanil, se desempeña como antimalárico al inhibir la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR). La p-clorofenilbiguanida, también muestra actividad

antimalaria (Pudney et al., 1999). Por otra parte, la metformina se prescribe para tratar, de manera muy efectiva, la diabetes tipo 2 en complemento con agentes hipoglicémicos y cambios en el estilo de vida de los pacientes (Viollet & Foretz, 2013). En la figura 1.7, se muestran las biguanidas con mayor actividad biológica reportada.

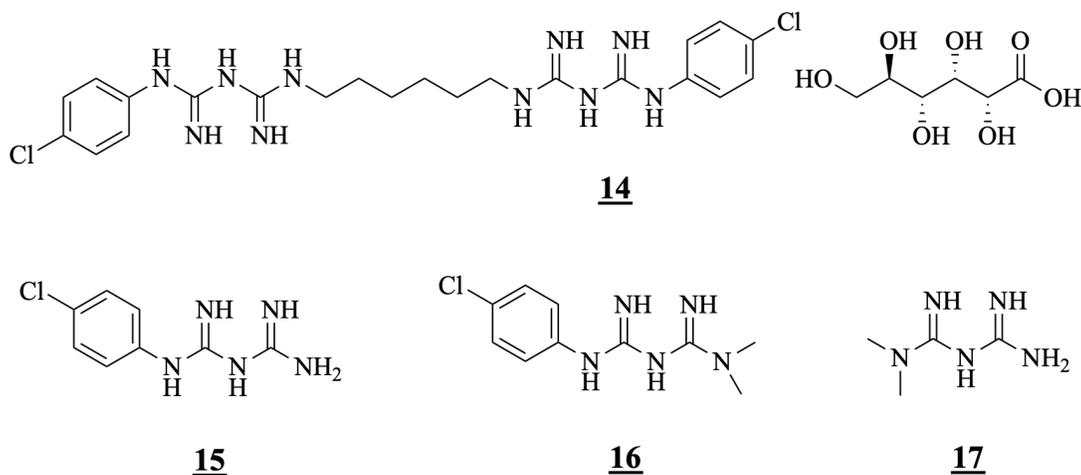


Figura 1.7. Algunas biguanidas con actividad biológica: (14) Gluconato de clorhexidina, (15) p-clorofenilbiguanida, (16) proguanil, (17) metformina.

1.6 Actividad biológica de las s-triazinas

Las s-triazinas son heterociclos utilizados en la preparación de fármacos bioactivos de menor toxicidad. Se han reportado s-triazinas en aplicaciones como agentes antimicrobianos, antituberculosis, anticancerígenos, antivirales y antimaláricos (como **18**). La atrazina es conocida por su actividad insecticida y herbicida, aunque su uso se ha reducido por potenciales riesgos en la salud (Shah et al., 2014).

En 2007, se reportó la síntesis de derivados biliares funcionalizados con bases nitrogenadas en la posición 24 a partir de metformina y los ácidos: cólico, glicocólico y ursodeoxicólico. Se determinó su actividad citotóxica utilizando líneas celulares hepáticas y del colon, que son los órganos con proteínas, en la membrana plasmática, selectivas al ingreso de las sales biliares. El compuesto **22** de la Figura 1.8, fue el que mostró mayor actividad antitumoral entre los ácidos biliares funcionalizados por Vallejo et al. (2007).

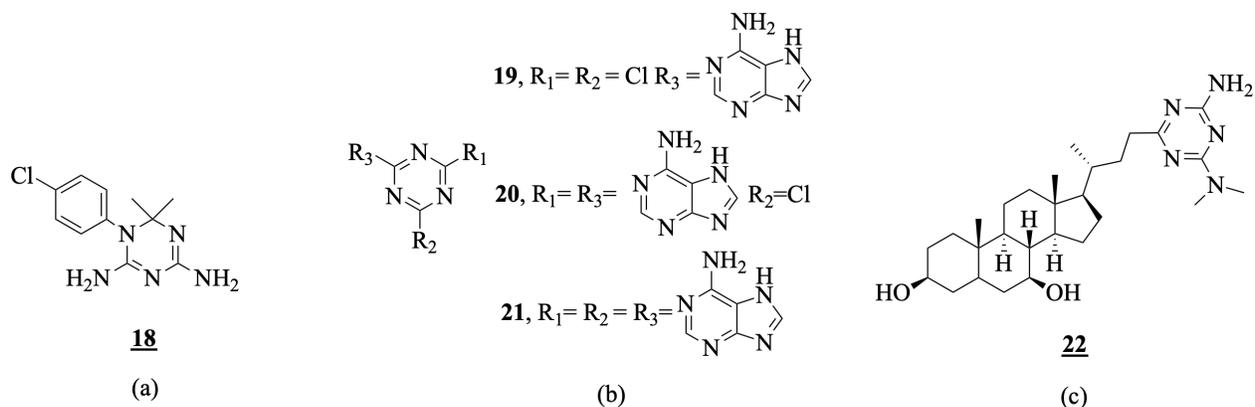


Figura 1.8. Algunas s-triazinas con actividad biológica: (a) antimalárico (18) cicloguanil, (b) antimicrobianos (19) - (21) y (c) antitumoral (22)

En el Cuadro 1.3, se tabularon los resultados de actividad antimicrobiana correspondientes a los compuestos 19 a 21 frente a *Staphylococcus aureus* (ATCC-25930), *Escherichia coli* (ATCC-26032), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC-27853).

Cuadro 1.2 Valores MIC representativos de algunas s-triazinas frente a organismos patógenos de importancia sanitaria (Shanmugam et al., 2013).

Compuesto	MIC ($\mu\text{g/mL}$)		
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Escherichia coli</i>
19	25	12,5	25
20	25	12,5	25
21	50	25	25
Estreptomicina	50	25	12,5

La concentración mínima inhibitoria (MIC) se define como la concentración más baja de un antimicrobiano que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo. (Andrews, 2001)

Se ha reportado la síntesis de cristales de derivados de ácido litocólico a partir de metformina limitándose exclusivamente al estudio cristalográfico, sin embargo, hasta la fecha no se han

reportado estudios correspondientes a la actividad biológica de este derivado biliar (Ikonen, Takala, Nonappa & Kolehmainen, 2009).

1.7 Derivados biliares biológicamente activos sintetizados en Costa Rica

Somarribas (2014) ensayó el potencial antitumoral y citotóxico de los ácidos cólico y desoxicólico así como de sus derivados sintetizados entre el 2006 y el 2013 por los investigadores Soto Tellini V. H., Alfaro Vargas A. y Procúpez Schtirbu R. de la Escuela de Química de la Universidad de Costa Rica. En la Figura 1.7, se detalla el esquema general de síntesis de los derivados evaluados de los ácidos cólico y desoxicólico a partir de precursores aromáticos y de adamantilo que presentaron actividad citotóxica sobre cinco líneas celulares en el hígado, pulmón, pecho y colón a concentraciones MIC iguales o inferiores a 100 μM (Somarribas, 2014).

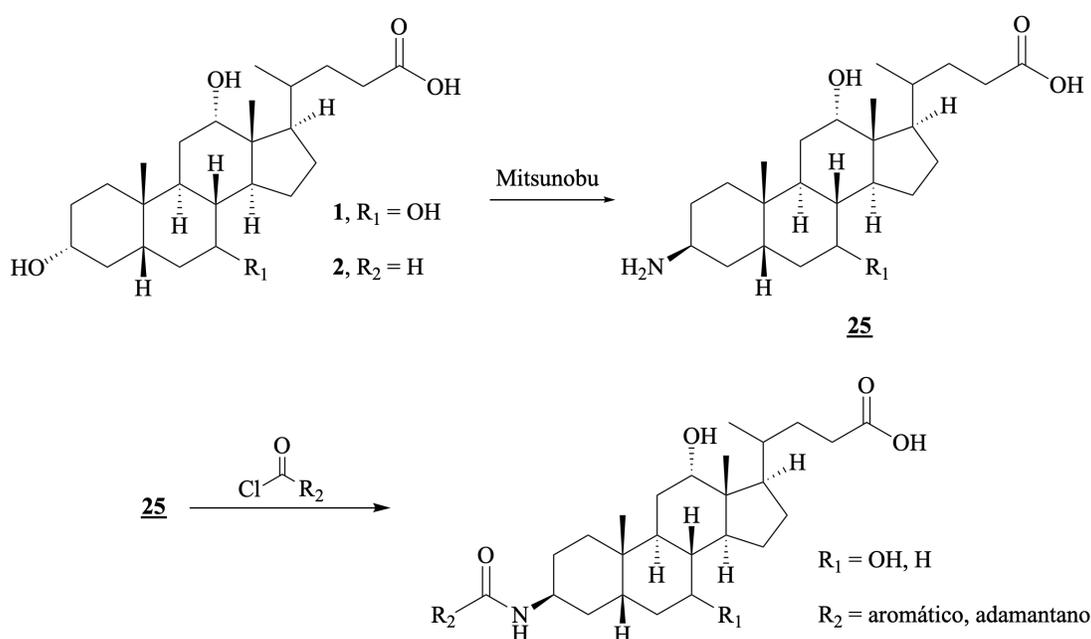


Figura 1.9 Estrategia general de síntesis de algunos de los derivados biliares evaluados en su actividad antitumoral en Costa Rica (Anelli, Lattuada & Uggeri, 1998; Somarribas, 2014; Soto, 2006)

En 2016, se sintetizaron nuevos derivados biliares a partir del cloruro de adamantilo y del ácido litocólico. Estos derivados biliares mostraron actividad citotóxica, pero aún con el inconveniente de que no mostraron selectividad respecto a las células sanas (Salazar, 2017).

1.8 Rutas referenciales de síntesis

En esta sección, se exponen algunas rutas sintéticas aplicables a la funcionalización del ácido cólico con el sustrato de partida *p*-clorofenilbiguanida.

1.8.1 Síntesis del clorhidrato de *p*-clorofenilbiguanida

La síntesis orgánica del clorhidrato de *p*-clorofenilbiguanida se ha investigado desde principios del siglo XX con un rendimiento tradicionalmente bajo del 40% en medio acuoso. Sin embargo, se ha reportado un rendimiento del 78% para la síntesis de *p*-clorofenilbiguanida al emplear microondas y medio ácido como catalizadores a presión atmosférica tal como se muestra en la Figura 1.10 (Mayer, Daigle, Brown, Khatri & Organ, 2004).

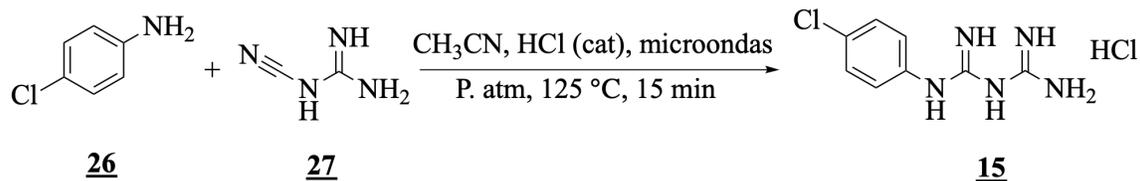


Figura 1.10 Síntesis de (15) clorhidrato de *p*-clorofenilbiguanida a partir de (26) *p*-cloroanilina y (27) 1-cianoguanidina mediante el calentamiento por microondas.

1.8.2 Síntesis de amidas biliares empleando el método del anhídrido mixto

Para lograr una mayor reactividad del carbonilo de los ácidos biliares, se utilizan activadores que faciliten la sustitución nucleofílica en el carbonilo para la síntesis de sus correspondientes amidas biliares. En algunos casos, se ha efectuado la protección selectiva de los grupos hidroxilo del sistema esteroideal, al utilizar condiciones de reacción más agresivas (Nováková, Tomanová, Štěrbová & Drašar, 2011).

También, es frecuente el uso de la dicitohexilcarbodiimida (DCC) o de *N*-halosuccinimidas acopladas con trifenilfosfina (Ph₃P) como catalizadores en la formación de intermediarios con menor energía de activación. Algunos de estos activadores se muestran en la Figura 1.11 (Krause, Baader, Erb & Gooßen, 2016; Nováková et al., 2011).

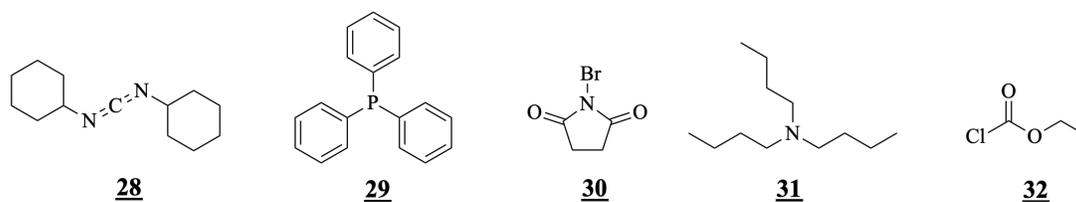


Figura 1.11 Algunos activadores y catalizadores utilizados en la síntesis de derivados de ácidos biliares: (28) Diciclohexilcarbodiimida (DCC), (29) trifenilfosfina, (30) N-bromosuccinida, (31) tri-n-butilamina, (32) cloroformiato de etilo.

En las Figuras 1.12 y 1.13, se muestra una ruta basada en el método de formación del anhídrido mixto para la síntesis de la amida biliar correspondiente en la posición 24 a partir de la cisteamina. Se emplean las siguientes condiciones de reacción: la presión atmosférica como presión del sistema, 1,4-Dioxano y diclorometano como disolventes; cloroformiato de etilo como activador y etilamina como catalítico (Noponen et al., 2012).

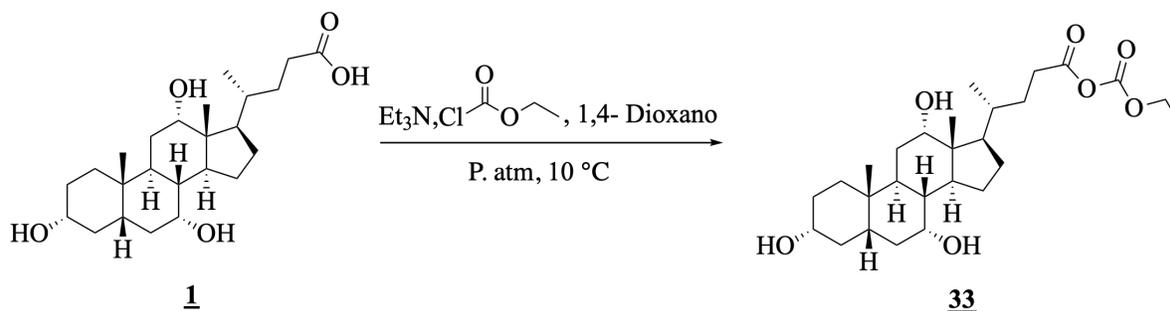


Figura 1.12 Ruta sintética basada en el método del anhídrido mixto: primer paso de conversión hacia el intermediario (Noponen et al., 2012).

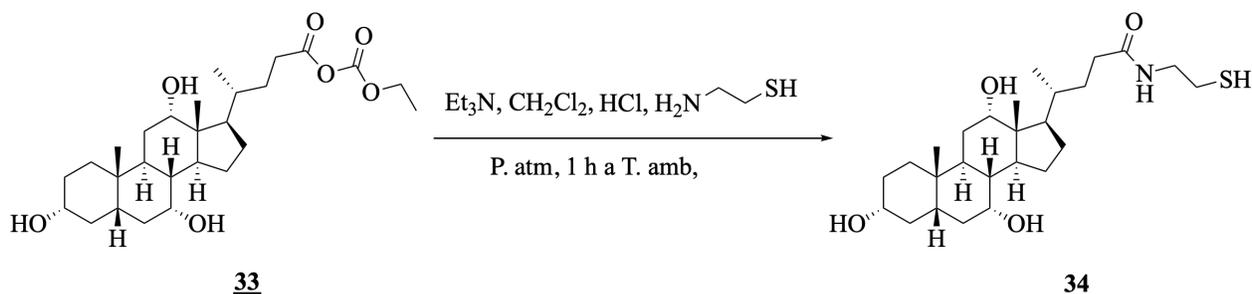


Figura 1.13. Ruta sintética basada en el método del anhídrido mixto: paso rápido de conversión hacia el sustrato de interés (Noponen et al., 2012).

1.9 Métodos de caracterización química empleados en la identificación de derivados biliares

La identificación precisa de un nuevo compuesto es indispensable porque se determina su estructura final, sus grupos funcionales y su posible comportamiento en medio acuoso. Enseguida, se detallan las técnicas analíticas más comunes en la caracterización e identificación química de derivados biliares.

1.9.1. Cromatografía de capa fina (TLC)

La cromatografía de capa fina es una técnica preparativa que permite evaluar la separación de los componentes de una mezcla de acuerdo a sus diferencias en polaridad. La fase estacionaria (placa de sílica gel o alúmina) contiene la mezcla a separar, esta se coloca en el seno de la fase móvil (mezcla de elución) que se desplaza de forma ascendente por efecto capilar sobre la superficie de la fase estacionaria. Enseguida, se revela la placa mediante técnicas no destructivas como la visualización por UV de longitud de onda corta o larga, así mismo existen técnicas destructivas que requieren de altas temperaturas (Silverstein, Kiemie & Webster, 2005).

Entre sus ventajas sobresalen la sencillez de la técnica y la favorable relación costo beneficio, ya que, al ser tan sensible la técnica, permite la separación precisa de cualquier compuesto siempre que se defina una mezcla de elución adecuada. Según la especificidad del grupo funcional que se desee detectar, así se puede encontrar mezclas reveladoras que cumplan el objetivo. Por ejemplo, para la detección de aminas primarias y α -aminoácidos es frecuente la preparación de disoluciones reveladoras de 0.2% de ninhidrina **35** en etanol; una vez corrida la placa se calienta cerca de los 110 °C para hidrolizar el intermediario aldimina **37** al complejo **38** según se indica en la Figura 1.14. (Friedman, 2004; Silverstein et al., 2005).

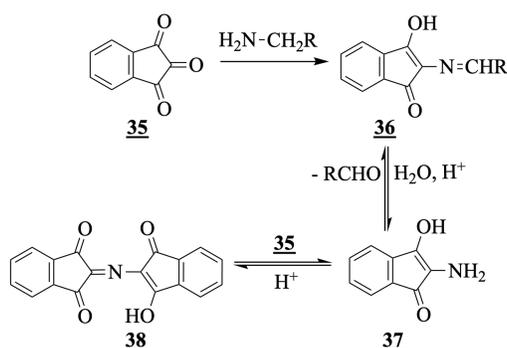


Figura 1.14 Reacción de formación del complejo morado de Ruhemann **38** (Friedman, 2004).

Los ácidos biliares y derivados que contengan el anillo esterol se pueden detectar a través de la preparación de alguna de las siguientes disoluciones reveladoras (Heftman, 1976). Esta es aplicada sobre la superficie de una placa de sílica gel para cromatografía de capa fina (TLC) y que contenga la muestra a detectar:

- H_2SO_4 concentrado, seguido de calentamiento a 60 – 80 °C durante 20 minutos.
- 20% de ácido fosfomolibdico en etanol, seguido de calentamiento a 110 °C.
- 0.5 mL de anisaldehído en 50 mL ácido acético glacial y 1 mL de H_2SO_4 concentrado, en seguida se calienta hasta 100 – 105 °C por 4 minutos.
- 20% de ácido perclórico en disolución acuosa, se calienta hasta los 150 °C.

1.9.2 Espectroscopía infrarroja FT-IR

Todo compuesto con enlaces covalentes es capaz de absorber radiación infrarroja en el ámbito vibracional que se encuentra entre las frecuencias 650 cm^{-1} y 4000 cm^{-1} . El espectrómetro de infrarrojo se encarga de generar el barrido de absorción infrarroja con base en los movimientos de tensión (estiramiento) o de flexión (balanceo) que generan las excitaciones energéticas sobre cada enlace. Estos cambios vibracionales dependen del momento dipolar y el tipo de enlace; y definen la huella dactilar de cada compuesto. Los enlaces más fuertes son más rígidos y requieren de mayor energía para estirarse o comprimirse (Sommer, 1989).

El espectrofotómetro FT-IR más común es el de tipo dispersivo: En este, un haz de radiación infrarroja actúa como referencia y otro atraviesa la muestra; ambos son dispersados por un monocromador que difracta cada rayo incidente en un espectro continuo de frecuencias, luego el detector recibe y procesa cada relación de intensidades entre la muestra y la referencia para cada frecuencia; por último, se grafica la relación porcentual de intensidades, conocida como porcentaje de transmitancia (%T), respecto al dominio de frecuencias filtrado (Silverstein et al., 2005).

Al comparar entre la frecuencia de oscilación de un tipo de enlace respecto a otro, se considera que es menor:

- En los movimientos de flexión que en los de tensión.
- En las tensiones simétricas que en las tensiones asimétricas (Silverstein et al., 2005).

Con la espectroscopía infrarroja se puede obtener información cualitativa respecto a los tipos de enlaces presentes en los compuestos a identificar. Este estudio se complementa con la utilización de otras técnicas instrumentales basadas en la espectrometría de masas y espectroscopía de resonancia magnética nuclear de una y dos dimensiones.

Algunas señales de absorción FT-IR características de los derivados biliares se detallan en el siguiente cuadro.

Cuadro 1.3 Señales características de algunos grupos funcionales en un espectro IR (Silverstein et al., 2005).

Grupo funcional	Número de onda (cm ⁻¹)	Descripción
C=C (aromático)	1615 - 1580	Estiramiento, señal angosta de intensidad media.
C-H (aromático 1,4-disustituido)	860-800	Tensión
O-H (alcohol primario)	3645 – 3630	Estiramiento, señal angosta y fuerte.
=N-H (grupo imino)	3350-3320	Estiramiento.
C-O (alcohol primario)	1050	Estiramiento.
C=O (ácido carboxílico)	1725-1700	Estiramiento
C=O (amida)	1680-1630	Estiramiento.

1.9.3 Espectroscopía UV - visible

Desde el punto de vista molecular, los electrones de la capa de valencia que absorben radiación en el ámbito de longitudes de onda del espectro visible y ultravioleta generalmente son desplazados desde el orbital de enlace ocupado con mayor energía en un nivel de baja energía (HOMO) hasta el orbital de antienlace desocupado con menos energía dentro de un nivel de mayor energía (LUMO) (Pavia et al., 2013).

Las transiciones $\sigma \rightarrow \sigma^*$ son las más energéticas y presentan bandas intensas en el espectro de absorción UV, en tanto que las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ son representativas para compuestos insaturados

con alta conjugación, medianamente energéticas y con bandas de absorción anchas y características en el UV cercano y visible (Sommer, 1989).

El instrumento utilizado para generar el espectro de absorción de un compuesto es el espectrofotómetro de UV- visible, que se constituye de una fuente de luz, un monocromador que selecciona el ámbito de operación de longitudes de onda, y un detector que cuantifica la relación porcentual de intensidades entre el rayo incidente y el rayo que sale de la muestra conocida como porcentaje de transmitancia (Pavia et al., 2013).

La absorbancia (A) está definida a partir de la siguiente ecuación:

$$A = \log(I_0/I) = \epsilon Cl \quad (1.1)$$

Donde I_0 es la intensidad de la luz incidente en la celda que contiene la muestra, I es la intensidad de la luz que sale de esa celda, ϵ es el coeficiente de extinción molar en $M^{-1}cm^{-1}$, c es la concentración de analito presente en la muestra en M y l es el ancho de la celda de la muestra en cm (Pavia et al., 2013).

1.9.4 Espectrometría de masas

Un espectrómetro de masas cuenta con dos compartimentos. El primero, es un espacio de vacío leve (de unos pocos milímetros de mercurio) donde se ioniza el analito puro con una fuente de iones hasta que es volatilizado y desplazado de forma acelerada a través de un conducto por un campo magnético. El segundo, de alto vacío (de pocos micrómetros de mercurio) que contiene el analizador de masas y que separa los iones de la muestra de acuerdo a su relación masa/carga (m/z); luego el detector cuenta los iones y la señal es procesada en una computadora que despliega el espectro: un gráfico que muestra el número de iones detectados respecto a su relación m/z . Por lo general, el pico M^+ es la masa molecular del compuesto de interés cuando se cuenta con un analito puro de partida (Pavia et al., 2013).

La ionización por electronebulización (ESI) es apropiada para analizar biomoléculas de alto peso molecular o compuestos no volátiles. La muestra disuelta se nebuliza en un fino capilar dentro de

una cámara de calentamiento a presión atmosférica. Este capilar es sometido a una diferencia de potencial que carga las gotas de analito que mediante un flujo constante de gas seco (N_2) se evapora el disolvente y se facilita el arrastre de los iones en fase gaseosa (Pavia et al., 2013).

En el caso de la ionización por fotones de alta intensidad, se utiliza la ionización por desorción de una matriz asistida por laser (MALDI). El analito es mezclado con una matriz capaz de absorber la radiación de un laser que lo sublima en su forma iónica (Pavia et al., 2013).

La selección de un analizador dependerá del costo y del tipo de analito. Algunos de los analizadores empleados son el de tiempo de vuelo (TOF), cuadrupolo, trampa de iones o de sector magnético. (Silverstein et al., 2005)

1.9.5 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN): análisis unidimensional

Los núcleos con número impar de protones o neutrones (^{13}C , 1H , ^{15}N , entre otros) presentes en una muestra se consideran magnéticamente activos ya que poseen un valor de espín que les permite absorber radiación electromagnética en el ámbito de las radiofrecuencias. En su estado natural, los espines se orientan al azar, sin embargo, al aplicar un campo magnético externo, los espines se orientan a favor (si son positivos) o en contra (si son negativos) de la dirección del campo magnético externo y se dice que se encuentran en resonancia con las radiofrecuencias (Pavia et al., 2013).

La densidad electrónica de cada núcleo induce a la generación de una corriente eléctrica que se opone al campo magnético aplicado. Como disminuye el campo externo neto que recibe el núcleo, se dice que este se protege o apantalla (Pavia et al., 2013).

Un espectro de RMN contiene las intensidades de los picos de absorción para cada núcleo respecto a las frecuencias correspondientes a cada uno de esos picos. Los desplazamientos químicos son las variaciones en las frecuencias de absorción debido al distinto apantallamiento de los núcleos: se cuantifican respecto al tetrametilsilano (TMS, $(CH_3)_4Si$) que es un compuesto de referencia con una frecuencia absoluta de 100 MHz a un campo magnético externo de 2,35 T y con desplazamiento 0 ppm en la escala de frecuencia relativa δ . El silicio es menos electronegativo que el carbono y

por lo tanto los grupos metilo del TMS son más abundantes en electrones, es decir, sus protones están fuertemente apantallados y en el campo más alto puesto que sus protones absorben a una intensidad de campo mayor que el resto de protones enlazados al carbono tal como se observa en la siguiente figura. La escala más común de desplazamiento químico es la escala δ y el ámbito de señales de los protones ^1H varían entre 0 y 12 δ , en tanto que las señales de los carbonos ^{13}C varían de 0 a 250 δ (Pavia et al., 2013).

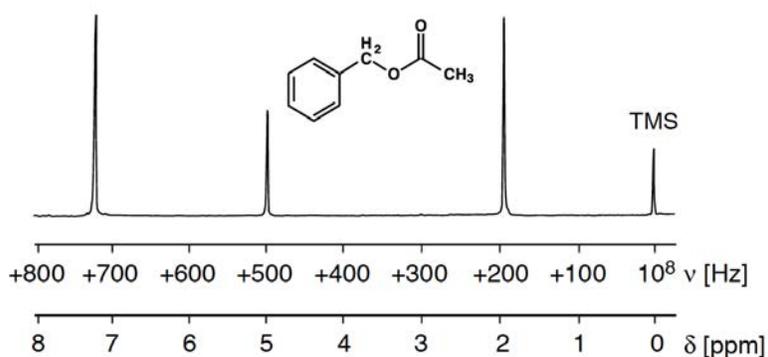


Figura 1.15 Espectro ^1H -RMN del acetato de bencilo que contiene la escala de frecuencia absoluta ν y la escala de frecuencia relativa δ (Bienz, 2002).

Un espectrómetro de RMN se constituye de cuatro partes: 1. Un imán acoplado a un controlador que genera el campo magnético deseado de acuerdo a la frecuencia de operación. 2. Un transmisor de radiofrecuencias. 3. Un detector que determina la cantidad de energía de radiofrecuencias absorbida por la muestra. 4. Un ordenador y software especializado para realizar las gráficas que constituyen el espectro de RMN (Silverstein et al., 2005).

Una ventaja de comparar señales de ^{13}C -RMN con señales del ^1H -RMN es que es poco probable que se traslapen. En el anexo C, se muestran valores aproximados de desplazamientos químicos para diferentes residuos de disolvente y sus señales características según el disolvente deuterado en que esté disuelto el analito.

En el Cuadro 1.4 se muestran el ámbito característico de frecuencias para distintos tipos de enlace ^{13}C .

Cuadro 1.4 Desplazamientos químicos comunes en la espectroscopía ^{13}C -RMN (Bienz, 2002).

Tipo de carbono	Desplazamiento químico (ppm)
Primario	8 – 35
Secundario	15 – 50
Terciario	20 – 60
Cuaternario	30 – 40
Alqueno	100 - 150
Aromático	110 - 170
N-C	40 – 60
O-C	50 – 80
Amida	165-175

Los espectros ^1H -RMN y ^{13}C -RMN permiten identificar las distintas señales de protones y carbonos presentes en una molécula. Sin embargo, el número de carbonos que produce una señal en un espectro ^{13}C – RMN no se puede determinar por integración y es necesario la generación de espectros bidimensionales que brinden información de correlaciones entre estos y otros núcleos (Pavia et al., 2013).

1.9.6 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN): análisis bidimensional

La información generada, en el trazado de un espectro 2D RMN, contempla la información proporcionada en la constante de acoplamiento J entre dos o más núcleos y la incorpora través de la modulación de amplitudes y fases que realiza el espectrómetro mediante transformadas de Fourier en el desarrollo del experimento. Se sigue la siguiente secuencia de pasos necesaria para la adquisición de los datos en un ciclo τ (Aue, Bartholdi & Ernst, 1976):

1. Período de preparación ($t < 0$): consiste en el tiempo necesario para la excitación de los núcleos. Se describe matemáticamente mediante un operador de densidad.
2. Período de evolución ($0 < t < \tau_0$): el sistema evoluciona bajo la influencia del Hamiltoniano, una función válida en este período y asume que al final del tiempo se alcanzó un estado particular de magnetización en los espines de los núcleos de interés.
3. Período de detección ($\tau_0 < t$): el sistema se desarrolla bajo la influencia del Hamiltoniano que detecta la magnetización transversa $s(\tau_0, \tau_f)$ en función de τ_f .

Para cada ciclo τ se requiere un tiempo de relajación y se repite el patrón n veces durante un tiempo t : excitación, evolución (τ_0), mezclado y adquisición (τ_f). La intensidad de las señales en un espectro bidimensional aumenta con el número de corridas realizadas en cada experimento, así mismo dependerá de la cantidad del isótopo de interés disponible en cada muestra (Andersen, 2005).

Al aplicar la transformada de Fourier en cada eje, que representa cada núcleo de interés, se obtienen las frecuencias ν_1 y ν_2 y una amplitud. En la Figura 1.16 sección (a) se observa la dependencia con la amplitud en un espectro tridimensional, mientras que en la sección (b) se muestra un gráfico de contorno que considera solamente las frecuencias asociadas a los núcleos de correlación (Bienz, 2002). Los experimentos 2D RMN más comunes se encuentran tabulados en el Cuadro 1.6.

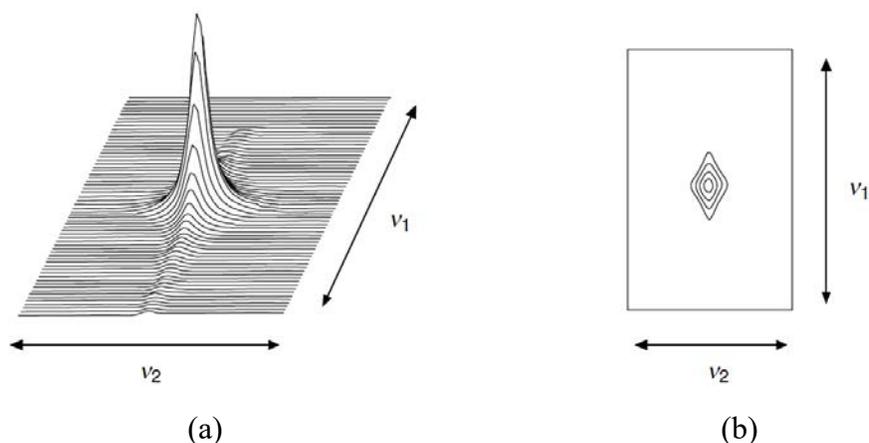


Figura 1.16 Tipos de gráficos obtenidos al aplicar la transformada de Fourier en 2D (Bienz, 2002).

Cuadro 1.5 Experimentos 2D-RMN basados en correlaciones por desplazamiento químico (Bienz, 2002)

Tipo de correlación	Experimento	Descripción
$^1\text{H}, ^1\text{H}$	COSY (Correlation Spectroscopy)	Correlaciona los núcleos ^1H con los acoplamientos confundidos.

Cuadro 1.5 (continuación) Experimentos 2D-RMN basados en correlaciones por desplazamiento químico (Bienz, 2002)

Tipo de correlación	Experimento	Descripción
$^1\text{H}, ^1\text{H}$	TOCSY	Correlaciona todos los ^1H en un sistema de espines.
	NOESY/ROESY	Correlación espacial entre los núcleos ^1H vecinos.
$^{13}\text{C}, ^1\text{H}$	HETCOR/HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation)	Correlación $^1J_{C,H}$ de los núcleos acoplados a un enlace.
	COLOC/HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation)	Correlación $^{2,3}J_{C,H}$ de los núcleos acoplados a dos y tres enlaces.
$^{13}\text{C}, ^{13}\text{C}$	INADEQUATE	Correlaciones de ^{13}C adyacentes.

En el caso del análisis de un espectro COSY, supóngase la existencia de cuatro señales individuales A_1 , A_2 , X_1 y X_2 por frecuencia ν tal como se define en la siguiente figura.

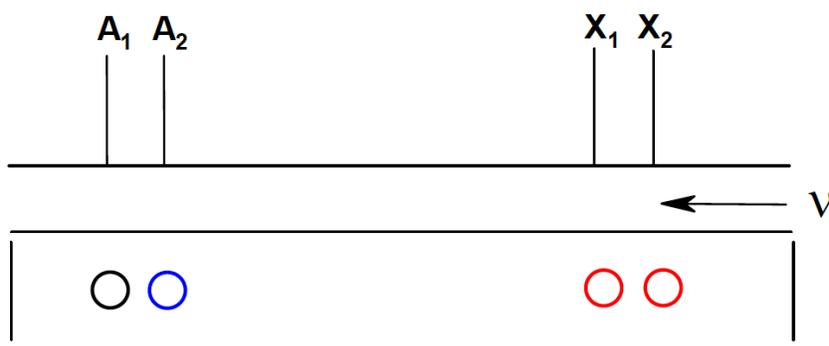


Figura 1.17 Total de señales individuales totales por frecuencia en el ejemplo dado.

En la Figura 1.18, se observan las correlaciones de los protones del espectro COSY del ejemplo de la Figura 1.17: A_1 correlaciona con X_1 y X_2 en los círculos en rojo y con A_2 en los círculos en azul. Estas correlaciones son útiles ya que permiten confirmar la presencia de señales de protón ^1H de acuerdo a su ubicación de campo.

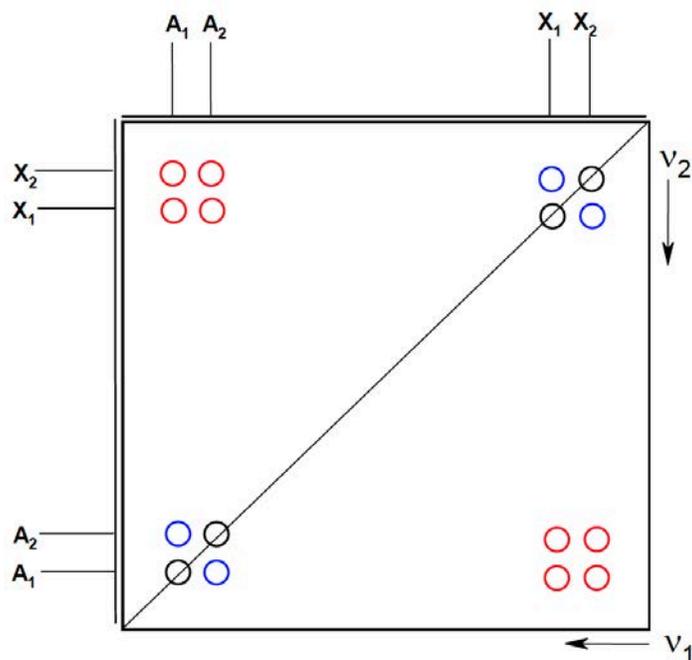


Figura 1.18 Correlaciones de las señales en el espectro COSY del ejemplo dado (Bienz, 2002).

1.10 Solubilización en fase de sustancias poco solubles en agua

Las ciclodextrinas se proponen como agentes complejantes debido a su capacidad comprobada en incrementar la solubilidad acuosa de numerosos ingredientes activos tanto en fungicidas y herbicidas, así como en muchos fármacos derivados del colesterol. (Lezcano, 2002).

1.10.1 Ciclodextrinas como agentes complejantes

Una ciclodextrina es un oligómero cíclico compuesto de unidades de D-glucosa. En la naturaleza se obtiene como subproducto de la degradación del almidón por parte de la ciclodextrina glicosiltransferasa (CGTasa, EC 2.4.1.19).

Las ciclodextrinas presentan una cavidad hidrófoba capaz de formar complejos de inclusión con el sustrato huésped. En el Cuadro 1.6 se observa la baja solubilidad de la β -CD, por lo que también es frecuente la utilización de su derivado más soluble HP- β -CD, ya que se elimina la contribución de los puentes hidrógeno intramoleculares y solo permanecen los puentes de hidrógeno intermoleculares con el agua (Lezcano, 2002).

Cuadro 1.6 Algunas propiedades fisicoquímicas de las ciclodextrinas (Lezcano, 2002)

Tipo	Unidades de D-glucosa	Masa molar (g/mol)	Solubilidad en agua a 25 °C (ppm)
α -CD	6	972.85	145
β -CD	7	1134.99	18,5
HP- β -CD	7	1375.37	>1200
γ -CD	8	1297.14	232

Además, numerosas investigaciones con HP- β -CD destacan la amplia mejoría en la solubilización de fármacos insolubles en agua, tal como se indica en el cuadro siguiente.

Cuadro 1.7 Solubilidad en agua reportada de algunos fármacos complejados con HP- β -CD (Pitha, Milecki, Fales, Pannell & Uekama, 1986).

Fármaco	Solubilidad puro (mg/mL)	Solubilidad en la disolución del solubilizador	
		Concentración del solubilizador (%m/m)	Solubilidad complejoado (mg/mL)
Acetaminofén	11	50	67,0
Dexametasona	0,1	50	24,0
Hidroxitolueno butilado (BHT)	< 0,01	40	3,0
Estradiol	0,004	40	28,0
Progesterona	0,015	40	34,0
Retinol	< 0,01	40	5,5
Testosterona	0,026	40	38,0

Desde el punto de vista de la química supramolecular, los complejos de inclusión con ciclodextrinas se consideran supermoléculas ya que tanto el huésped como el hospedero se mantienen unidos por fuerzas intermoleculares de tipo no covalente. La intensidad de estos

enlaces es menor en relación a un enlace covalente, por lo tanto, las supermoléculas son más lábiles y flexibles (Lezcano, 2002).

La constitución de una supermolécula a partir de un sustrato (huésped) y un receptor (hospedero) es posible si se cumple el principio de doble complementariedad que requiere complementariedad estérica, así como de complementariedad electrostática que permita una orientación termodinámicamente estable y su consecuente deshidratación parcial o total en el interior de la ciclodextrina. (Lezcano, 2002)

El huésped se incluye en la cavidad de la ciclodextrina y ocurre la complejación: se producen leves cambios conformacionales y se modifican sus propiedades fisicoquímicas como solubilidad, fotoestabilidad, enmascaramiento de aromas y sabores, pérdida de volatilidad, entre otros. Si la sección hidrófoba del huésped, de limitada solubilidad en agua, se compleja en el interior de la ciclodextrina, se aumenta la solubilidad del huésped en agua (Lezcano, 2002).

Por otra parte, los derivados menos solubles en agua de β -CD son útiles en la precipitación de un determinado huésped soluble en agua mediante la formación de un complejo de inclusión. Las ciclodextrinas también se utilizan en procesos de transferencia de fase para facilitar la transferencia de masa de la sustancia de interés desde la fase acuosa hacia un disolvente orgánico, ya que una molécula huésped que se incluye en el interior de la cavidad de una ciclodextrina, se puede considerar en una fase distinta a la del seno de la disolución. De esta manera, el resto de sustancias que permanezcan en el seno de la disolución tendrán un difícil acceso a la molécula que ha sido complejada y no pueden reaccionar con ella; con esto se incrementa su vida útil (Lezcano, 2002).

Como interesa evaluar la actividad biológica de una sustancia, es necesario que esta se encuentre disuelta en agua y que pueda generar su efecto por contacto con la membrana celular o por su ingreso a la célula mediante un proceso de transporte. La etapa que determina la velocidad de absorción del candidato depende de su concentración en disolución acuosa. Agregados, microcristales o micelas sólo pueden entrar en las células por pinocitosis. (Lezcano, 2002).

1.10.2 Análisis de solubilidad cuando los componentes interactúan: Prueba de Higuchi-Connors

En el análisis de solubilidad de la prueba de Higuchi-Connors, se añaden incrementos consecutivos del agente complejante (L) a cada muestra, y una misma cantidad de la sustancia poco soluble (S), pero con un ligero exceso respecto a su límite de solubilidad. Luego, se agita hasta alcanzar el equilibrio de solubilidad a temperatura constante, se analizan las fases de la disolución, se filtra y se determina la concentración de sustrato S. El diagrama de fases se construye con la concentración molar de S en la fase líquida como variable dependiente y con la concentración molar de L añadido como variable independiente (Connors, 1997; Lezcano, 2002).

1.10.3 Estequiometría de complejación

En los complejos de estequiometría 1:1, una molécula del huésped (S) se introduce de manera parcial o total en la cavidad de una molécula del hospedero (L) que en este caso corresponde a la ciclodextrina. En la siguiente ecuación de equilibrio se establece la formación del complejo de orden m:n.



En la Ecuación 1.3, se define la constante de equilibrio correspondiente a la Ecuación 1.2.

$$K_{mn} = \frac{[S_mL_n]}{[S]^m[L]^n} \quad (1.3)$$

Se ha documentado la formación de complejos de estequiometría superior en dos situaciones: En la primera, una o más moléculas huésped se introducen en dos o más ciclodextrinas. En la segunda, dos o más moléculas huésped se incluyen en al menos dos ciclodextrinas. Las estequiometrías 1:2 y 2:1 (S:L) son las más frecuentes: inician con la formación del complejo 1:1 y continúan hacia la formación del complejo 1:2 o 2:1 según corresponda. En este caso se definen dos constantes de equilibrio (Lezcano, 2002).

En un diagrama de fases, la variable independiente es S_t y la variable dependiente es L_t . Para

determinar la estequiometría de la complejación se debe cuantificar la relación molar inicial entre la sustancia de prueba y la ciclodextrina que varía según el tipo de diagrama de fase.

Para determinar cada constante de acomplejación se utiliza la técnica de solubilización en fase de Higuchi-Connors. Esta prueba se compone de tres partes: primero, la construcción de la curva de calibración de la sustancia de prueba; segundo, la determinación de la curva del diagrama de fases para cada complejo a partir de la espectrofotometría UV-visible y; tercero, el cálculo de la constante de equilibrio a partir de la estequiometría de formación del complejo huésped-ciclodextrina.

1.10.3.1 Estequiometría a partir de diagramas de fase tipo A

En la Figura 1.18, se muestran los diagramas de fase característicos tipo A. Se incrementa la solubilidad del soluto de acuerdo al incremento en la concentración del ligando disuelto y se atribuye el aumento de la solubilidad por la formación de complejos S/L solubles. En los diagramas tipo A_L , el incremento es lineal y la estequiometría es característica de un primer orden respecto a L. En los diagramas tipo A_P se presentan desviaciones positivas a la linealidad y corresponden a una estequiometría de orden superior respecto a L, pero de orden uno respecto a S. Los diagramas de tipo A_N presentan desviaciones negativas a la linealidad y se asocian a una concentración en exceso de L (Lezcano, 2002).

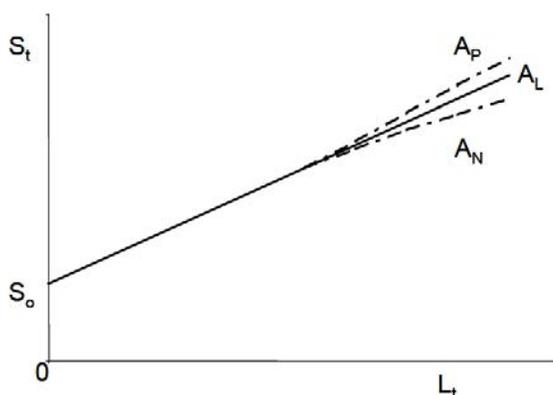


Figura 1.18. Diagramas de solubilidad tipo A (Lezcano, 2002).

Para determinar el orden de complejación en un diagrama A_L , si la pendiente de la recta es mayor

que la unidad, existe al menos un complejo con $m > 1$ y la complejación es de orden superior respecto a S pero de orden uno respecto a L, mientras que si la pendiente es menor que uno, se considera que la estequiometría es 1:1 (Lezcano, 2002).

Se puede determinar la constante de equilibrio de formación de los complejos de inclusión a partir de su definición y empleando las siguientes sustituciones en la Ecuación 1.3

$$[S] = S_0 \quad (1.4)$$

$$[S_m L_n] = \frac{S_t - S_0}{m} \quad (1.5)$$

$$[L] = L_t - [S_m L_n] \quad (1.6)$$

Reordenando cuando la estequiometría es 1:1 es posible definir la constante de equilibrio de formación del complejo como se indica en la ecuación siguiente:

$$K_{11} = \frac{b}{(1-b)S_0} \quad (1.7)$$

En el caso de los diagramas de fase A_p , si estos se originan de la formación de los complejos SL y SL_2 con sus respectivas constantes K_{11} y K_{12} , se puede expresar las concentraciones de soluto libre y de ligando libre en términos de sus balances de masa.

$$S_t = [S] + [SL] + [SL_2] \quad (1.8)$$

$$L_t = [L] + [SL] + 2[SL_2] \quad (1.9)$$

Al sustituir las Ecuaciones 1.8 y 1.9 en la Ecuación 1.3 para cada constante de equilibrio y reordenando para S_t ; se obtiene la siguiente ecuación simplificada cuando la cantidad de ligando complejoado es pequeña y ésta se aproxima como $[L] = [L_t]$:

$$S_t = S_0 + K_{11}S_0L_t + K_{11}K_{12}S_0L_t^2 \quad (1.10)$$

La ecuación anterior se puede linealizar mediante la transformación $S'_t = \frac{S_t - S_0}{L_t}$:

$$S'_t = K_{11}S_0 + K_{11}K_{12}S_0L_t \quad (1.11)$$

1.10.3.2 Estequiometría a partir de diagramas de fase tipo B

En los diagramas de fase tipo B se forma un complejo insoluble y existen dos tipos según se muestra en la Figura 1.19.

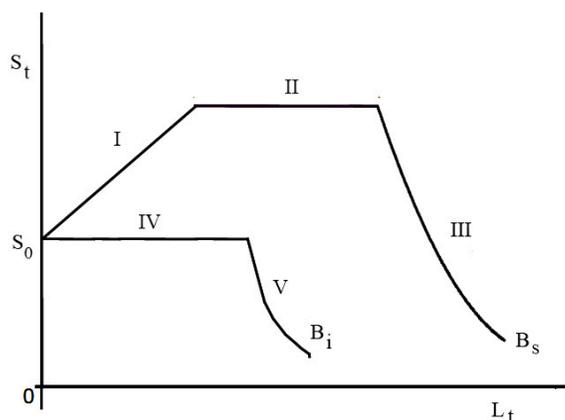


Figura 1.19 Diagramas de fases tipo B_s y B_i (Lezcano, 2002).

La curva B_s se compone de tres segmentos: el primero muestra un incremento lineal en la solubilidad aparente de S debido a la formación de un complejo soluble SL. En el segundo, el complejo alcanzó su límite de solubilidad y la concentración de S no complejo se mantiene constante porque el remanente de S sólido cambia de fase hasta que se disuelve por completo. En el tercero, la adición de una mayor cantidad de ligando L provoca una disminución de la cantidad de S en disolución debido a la formación de uno o más complejos y la correspondiente precipitación de uno solo de ellos; según la regla de las fases $F = C + 2 - GL$, el sistema contiene 3 componentes (disolvente, sustrato, ligando) y 3 grados de libertad (temperatura, presión y concentración de S), por lo tanto tiene 2 fases (líquida y sólida). (Connors, 1997; Lezcano, 2002).

La curva B_i comparte el mismo comportamiento de los dos últimos segmentos de la curva B_s.

En algunos casos, se observa un tipo de diagrama que no se puede clasificar como tipo A ni como tipo B y su curva presenta una forma similar a la Figura 1.20, donde la solubilidad aparente desciende conforme se incrementa la concentración de ligando en el sistema.

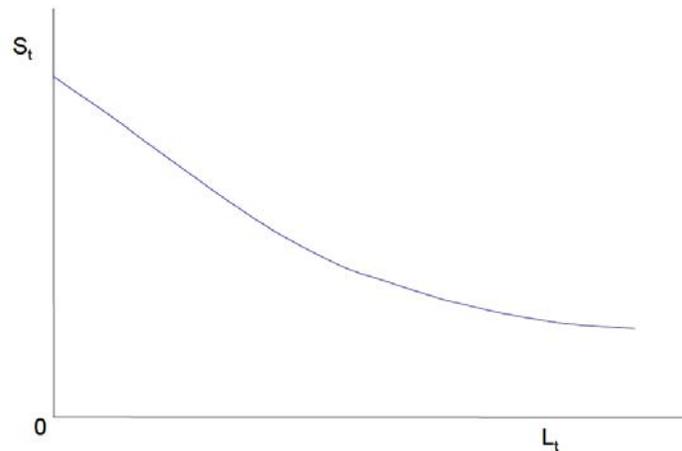


Figura 1.20 Diagrama de fases con inmediato descenso en la concentración aparente de S.
(Lezcano, 2002).

1.11 Mínimos cuadrados ponderados totales

Este método, también llamado WTLS (del inglés “Weighted Total Least Squares”), se originó en 1980 ante la necesidad de cuantificar el error en cada variable (EIV) (Amiri-Simkooei & Jazaeri, 2012). Desde entonces, se han planteado mejoras a este método y, en particular, a la incorporación de la incertidumbre en la determinación del error por precisión, también llamado error aleatorio. A diferencia del método de mínimos cuadrados ordinarios (OLS), este método presenta las siguientes ventajas:

- Incorpora el error instrumental presente en todas las variables de interés: esto permite conocer no solo la contribución al error aleatorio por parte de la distribución de los datos respecto al modelo de ajuste.
- Determina los coeficientes de regresión, así como las varianzas y covarianzas correspondientes: esto permite definir la incertidumbre expandida a cada parámetro de regresión con su respectivo porcentaje de confianza.
- Cuantifica el “ruido” aleatorio tanto en el vector de observaciones \hat{e} así como en la matriz de diseño X: en tanto que OLS solo determina el correspondiente a las observaciones de la variable dependiente.

- Cada ponderación es inversamente proporcional a la varianza del error: por lo tanto, una observación con un bajo valor en la varianza del error aporta bastante en la ponderación final, ya que aporta más información que una observación con una elevada varianza del error (Amiri-Simkooei & Jazaeri, 2012).

El método WTLS se basa en la aproximación polinomial que minimiza la función χ^2 , por lo que los coeficientes de regresión se obtienen al minimizar la suma ponderada de los residuales al cuadrado, según se muestra en la Ecuación 1.12 (Becerra, Peña & Ramirez, 2012).

$$\chi^2 = \sum_{j=1}^n H_j v_j^2 = \sum_{j=1}^n H_j (f(I_j) - Y_{oj})^2 \quad (1.12)$$

El modelo de ajuste polinomial de los datos es de la forma

$$Y_{oa}(R) = a_0 + a_1 R + \dots + a_n R^n \quad (1.13)$$

Cuando existe sospecha de autocorrelación en un ajuste de datos mediante el método de OLS, se utiliza un método de mínimos cuadrados generalizado (GLS), como WTLS, más robusto al ponderar los errores para cada valor de j (Chatterjee & Hadi, 2012).

El vector solución para n parámetros de regresión se define como

$$\hat{a}: = \begin{bmatrix} a_0 \\ a_1 \\ \vdots \\ a_n \end{bmatrix} \quad (1.14)$$

La solución matricial de este vector columna \hat{a} incluye la definición de otras matrices que requieren de las observaciones realizadas en el experimento, así como de la incertidumbre combinada en la variable dependiente. Se expresa de la siguiente forma:

$$\hat{a} = (X^t Q X)^{-1} X^t Q e \quad (1.15)$$

donde X se puede representar, para el caso de un modelo de primer orden, como:

$$X := \begin{bmatrix} 1 & X_{o1} \\ \vdots & \vdots \\ 1 & X_{on} \end{bmatrix} \quad (1.16)$$

En general, $X := [1 \ I_n \ I_n^2 \ \dots \ I_n^k]$ para modelos de orden k . Además, se definen las matrices siguientes como:

$$Q := \begin{bmatrix} u(Y_{o1})^{-2} & 0 & \dots & 0 \\ 0 & u(Y_{o2})^{-2} & \ddots & \vdots \\ \vdots & \ddots & \ddots & 0 \\ 0 & \dots & 0 & u(Y_{on})^{-2} \end{bmatrix} \quad (1.17)$$

$$e := \begin{bmatrix} Y_{o1} \\ Y_{o2} \\ \vdots \\ Y_{on} \end{bmatrix} \quad (1.18)$$

El método WTLS provee la covarianza y la varianza asociada a los parámetros de regresión tal como se muestra en la Ecuación 1.19.

$$\text{cov}(a) = (X^t Q X)^{-1} = \begin{bmatrix} \sigma^2(x) & \text{cov}(x, y) \\ \text{cov}(x, y) & \sigma^2(y) \end{bmatrix} \quad (1.19)$$

Para que este modelo sea válido, es necesario cumplir con las siguientes condiciones:

- Los errores aleatorios ϵ_{ij} se encuentran normal e independientemente distribuidos alrededor de una media aritmética igual a cero y varianza σ^2 , esto es NID $(0, \sigma^2)$.
- Los residuos del modelo no se encuentran correlacionados, es decir no se ajustan a una tendencia al graficarlos contra los predichos del modelo (Su & Berenson, 2017)

1.12 Prueba de Durbin-Watson

Se dice que existe autocorrelación, cuando la variable observada se ajusta a un modelo y presenta residuales correlacionados, ya que son afectados por condiciones externas similares y no contempladas como variables en el modelo de ajuste (Chatterjee et al., 2012).

Esta prueba permite definir si existe autocorrelación mediante la utilización del estadístico d y sus intervalos de confianza establecidos en las tablas de Durbin-Watson (Anexo A). El valor de d se calcula a partir de la siguiente ecuación:

$$d = \frac{\sum_{t=2}^n (\epsilon_t - \epsilon_{t-1})^2}{\sum_{t=1}^n \epsilon_t^2} \quad (1.20)$$

La hipótesis nula define que cuando $\rho = 0$ los errores no están correlacionados. En la práctica, ρ es calculado indirectamente a partir de d por medio de los siguientes criterios (Chatterjee et al., 2012):

- $d < d_L$: se rechaza la hipótesis nula.
- $d > d_U$: no se rechaza la hipótesis nula.
- $d_L < d < d_U$: la prueba es inconclusa.

Capítulo 2. Metodología experimental

El proceso experimental transcurrió por diferentes etapas: la etapa preparatoria (apéndice D) comprendió la ejecución de posibles rutas sintéticas y la posterior purificación del producto de interés en el crudo de reacción. Luego, la primera etapa se caracterizó por la obtención de la curva de calibración a distintas concentraciones de codisolvente. Por último, en la segunda etapa, se realizó la prueba de Higuchi Connors de 24 con cada ciclodextrina.

2.1 Primera etapa experimental

En esta etapa se requirió de una curva de calibración de absorbancia respecto a concentración de 24 que fuera representativa respecto a la ley de Beer-Lambert, por lo que se ejecutó una prueba Chi cuadrado para cada curva al 10% y al 15% DMSO con una hipótesis nula que declara que la distribución de los datos tiende a un modelo de regresión lineal con un 95% de confianza. Se determinaron los intervalos de confianza correspondientes a los parámetros de regresión mediante el cálculo de la matriz de covarianza del método WTLS y su ajuste a un modelo, conforme a los supuestos de homoscedasticidad, normalidad e independencia de los errores aleatorios. Esta etapa representó la base para la cuantificación de la triazina presente en disolución acuosa.

2.2 Segunda etapa experimental

La elección de la curva de calibración de 24 permitió determinar la concentración de triazina para cada muestra en la prueba de Higuchi-Connors. Se determinaron los intervalos de confianza correspondientes a los parámetros de regresión mediante el cálculo de la matriz de covarianza del método WTLS y su ajuste a un modelo que correlacionó la concentración de triazina con la concentración de ciclodextrina, conforme a los supuestos de homoscedasticidad, normalidad e independencia de los errores aleatorios. Se aplicó una prueba de Durbin-Watson que determinó la no correlación de los errores con un 99% de confianza. El modelo de ajuste obtenido para cada ciclodextrina permitió determinar la estequiometría de complejación y compararla con los resultados de la evaluación de la actividad biológica mediante el método ASTM E2315-16.

2.3 Tercera etapa experimental

Los complejos caracterizados se evaluaron en su actividad antimicrobiana tipo desinfectante conforme al protocolo ASTM E2315-16. Se utilizaron cepas certificadas de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 14502, así como cepas resistentes a antibióticos de origen hospitalario como *Escherichia coli* (471), *Pseudomonas aeruginosa* (449); todas caracterizadas y almacenadas en la bacterioteca del INISA. Se tomó un cultivo de 24 h de la bacteria a analizar y se realizó una suspensión bacteriana de aproximadamente 10^8 bacterias/mL, esto se determinó mediante espectrofotometría UV-visible en el rango de absorbancia de 0.10 a 0.13 a 600 nm. Posteriormente, a esta suspensión se le realizó un recuento inicial por el método de recuento en placa empleando placas de Petri con agar estándar y cloruro de trifenil tetrasolium (TTC).

Luego, se añadió parte de una dilución del tensioactivo a probar, se dejó en contacto esta mezcla por un minuto y 10 min incubándolos a temperatura ambiente, luego de cada tiempo se tomó una alícuota de la suspensión y se realizaron diluciones de 10^{-1} a 10^{-6} y se efectuó un recuento por el método de recuento en placa. Se comparó entre el recuento inicial y el recuento a cada tiempo. La sobrevida microbiana se determinó en términos de la disminución logarítmica y cada prueba se realizó por triplicado en el INISA.

Se utilizó un control de viabilidad bacteriana (1 mL de la suspensión bacteriana 10^8 bacterias/mL + agar estándar con TTC) y un control de esterilidad del medio de cultivo (placa de agar estándar con TTC).

2.4 Selección de variables

En la primera etapa experimental, se definieron las siguientes variables:

- Variable de respuesta: absorbancia.
- Variables controladas: temperatura del sistema, concentración de triazina **24**.
- Variable no controlada: presión del sistema.
- Variable de diseño: concentración de codisolvente DMSO.

En la segunda etapa experimental, se consideraron las siguientes variables:

- Variable de respuesta: absorbancia.
- Variables controladas: temperatura del sistema, diámetro del poro del filtro.
- Variable no controlada: presión del sistema.
- Variable de diseño: concentración de ciclodextrina.

En la tercera etapa experimental, se establecieron las siguientes variables:

- Variable de respuesta: absorbancia.
- Variables controladas: temperatura del sistema, concentración inicial de cepa.
- Variable no controlada: presión del sistema.
- Variable de diseño: reducción logarítmica de cada cepa bacteriana.

2.5 Equipo experimental

Para la etapa preparatoria se utilizaron los equipos siguientes:

Cuadro 2.1 Equipo experimental utilizado en la etapa preparatoria

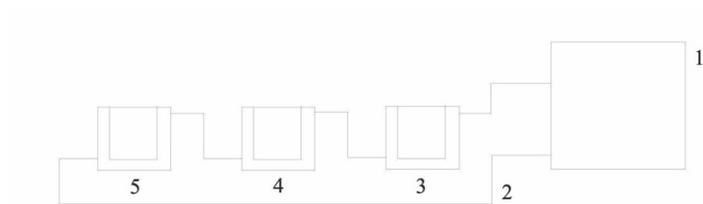
Equipo	Ubicación	Placa
Bloque de Fisher-Johns	Sección química orgánica. Escuela de química, UCR	13457
Perkin-Elmer Spectrum 1000 FT/IR	Análisis instrumental. Escuela de química, UCR.	123211
Varian 640-IR	Análisis instrumental. Escuela de química, UCR.	112498
¹ H, ¹³ C, 2D RMN: Bruker Avance III 400 MHz	Sección de química industrial. Escuela de química, UCR.	-
¹⁵ N RMN: Bruker Ascend 600 MHz acoplado a un controlador AVANCE III	CIPRONA, UCR.	-
MS/GC: Espectrómetro MS QTOF Waters Synapt G1	CIPRONA, UCR.	-

Tanto en la primera etapa experimental, como en la segunda, se utilizaron los siguientes equipos:

Cuadro 2.2 Equipos utilizados en las dos primeras etapas experimentales

Equipo	Ubicación	Placa
Balanza ADAM PW254	Análisis instrumental. Escuela de química, UCR.	142337
Espectrofotómetro Shimadzu UV-1700 PharmaSpec UV-Vis	Análisis instrumental. Escuela de química, UCR.	18221

En la segunda etapa experimental, se diseñó el siguiente equipo de recirculación para la ejecución de cada prueba de Higuchi- Connors:



Componente del sistema

1. Control automático de temperatura
2. Tubería
3. Reactor encaquetado 1
4. Reactor encaquetado 2
5. Reactor encaquetado 3

Figura 2.1. Diagrama experimental para la ejecución de la prueba de Higuchi-Connors.

Capítulo 3. Resultados y discusión

En este capítulo se explica el proceso de síntesis de un nuevo derivado del ácido cólico. Se mencionan las diferentes rutas y técnicas utilizadas en la obtención del producto final aislado y puro.

Se discute acerca de las señales más representativas en los espectros IR, ^1H -RMN y ^{13}C -RMN del producto intermediario y el producto final. Además, se profundiza en la caracterización espectroscópica del producto final **24**. Se incrementó la solubilidad en fase de este producto insoluble en agua mediante la formación de complejos de inclusión con HP- β -CD y β -CD mediante una prueba de Higuchi-Connors. Se utilizó el método WTLS en la caracterización de los modelos de ajuste propuestos para los datos observados de cada complejo con ciclodextrina, contemplando el error introducido por la incertidumbre instrumental. Se validan los supuestos de cada modelo de ajuste y se obtienen las constantes de complejación correspondientes a cada ciclodextrina. Se discute acerca de los resultados obtenidos de la evaluación de la actividad desinfectante de cada uno de estos complejos de inclusión sobre cinco cepas multiresistentes.

3.1 Síntesis y caracterización química de la *p*-clorofenilbiguanida

Se realizó la adición de la amina **26** a la cianoguanidina **27** mediante catálisis ácida y se obtuvo la biguanida **15**. En la figura 7.1 se muestran las condiciones de síntesis que se utilizaron.

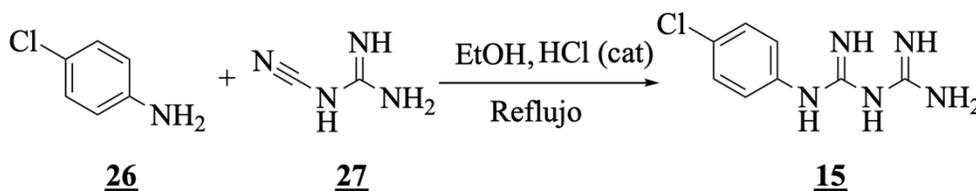


Figura 3.1. Síntesis mediante catálisis ácida de (15) *p*-clorofenilbiguanida a partir de (26) *p*-cloroanilina y (27) 1-cianoguanidina.

Como el nitrógeno del nitrilo de 1-cianoguanidina es ionizable y posee un buen carácter nucleofílico, el par de electrones de este nitrógeno se une al protón del ácido clorhídrico

mediante un enlace covalente, esto provoca, la formación de una carga parcial positiva en el carbono del nitrilo y permite la adición nucleofílica de la amina aromática. Se requiere de calor para vencer la energía de activación de la reacción.

El rendimiento de la reacción de la Figura 3.1 es de un 76%. La purificación del crudo se realizó a través de la cristalización del crudo de reacción al disminuir gradualmente la temperatura desde la temperatura de reflujo del sistema, cercana al punto de ebullición del etanol al 95%, hasta temperatura ambiente y enfriando luego en un baño con hielo. La formación de los cristales de **15** fue espontánea en el descenso de la temperatura y estos presentaron una alta pureza en la primera y segunda cosecha, según se observa en los espectros RMN de las figuras 3.3 y 3.4 la ausencia de otras señales, excepto la del disolvente. El punto de fusión de **15** está en el rango de entre los 246.5 °C y 250.5 °C medido en el bloque de Fisher-Johns.

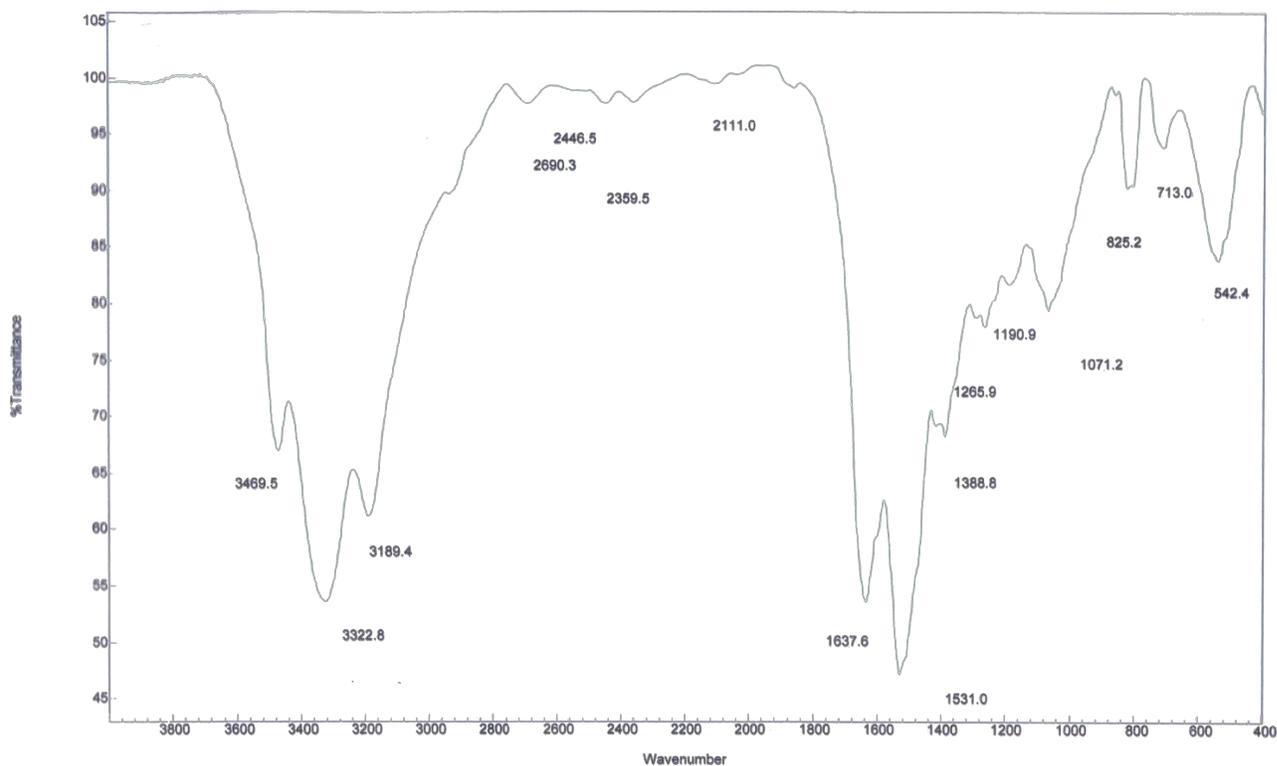


Figura 3.2 Espectro IR de la *p*-clorofenilbiguanida.

Se realizó un espectro infrarrojo del producto **15** que se muestra en la Figura 3.2. La banda en 3469.5 cm^{-1} corresponde a la vibración de estiramiento de los enlaces N-H del grupo

amidina en la biguanida, esta banda se traslapa con la banda de vibración de estiramiento del grupo OH en la posición 12. La banda de $1729,9\text{ cm}^{-1}$ corresponde a la vibración de estiramiento del grupo carbonilo C=O del éster en 24, mientras que la de $1635,8\text{ cm}^{-1}$ corresponde a la vibración de estiramiento del grupo carbonilo C=O del grupo amida en la posición 3. Las bandas en $1241,2\text{ cm}^{-1}$ corresponden a la vibración de estiramiento del enlace sencillo C-N y C-O de los grupos amino en la posición 3, alcohol en la posición 12 y éster de la posición 24.

Cuadro 3.1 Asignación de las bandas principales del IR para el precursor **15**.

Banda IR (cm^{-1})	Asignación	Grupo Funcional
3322.8	Tensión N-H	Amida
1637.8	Tensión C=N	Amidina
1531.0	Flexión N-H	Amidina
1388.8	Flexión C-H	Aromático
1265.9	Tensión C-N	Amida
713.0	Tensión C-Cl	Amida

En las Figuras 3.3 y 3.4, se muestran los espectros ^1H RMN y ^{13}C RMN. La asignación de las señales corresponde como sigue: Cada uno de los protones del anillo aromático del espectro ^1H RMN aparecen en las posiciones 2 y 3 a $7,33$ y $7,40\text{ }\delta/\text{ppm}$: respectivamente; las otras dos señales a δ/ppm : $7,11$ y $7,35$ corresponden a cada nitrógeno ionizable. El singulete a δ/ppm : $3,36$ corresponde a la amina directamente enlazada al anillo aromático. El multiplete a δ/ppm : $10,00$ corresponde al nitrógeno que forma parte del enlace doble de la amidina. El valor a $2,49\text{ ppm}$ corresponde a la señal de disolvente residual DMSO- d_6 .

El carbono de la amidina terminal que se observa en el espectro ^{13}C RMN, presenta una señal de δ/ppm : 161 ppm . A la otra amidina, le corresponde un valor de 155 ppm .

En la posición 2 y 3 a δ/ppm : 129 y 122 respectivamente. Además, en las posiciones 1 y 4 δ/ppm : 127 y 138 . La señal característica del disolvente es $40\text{ }\delta/\text{ppm}$.

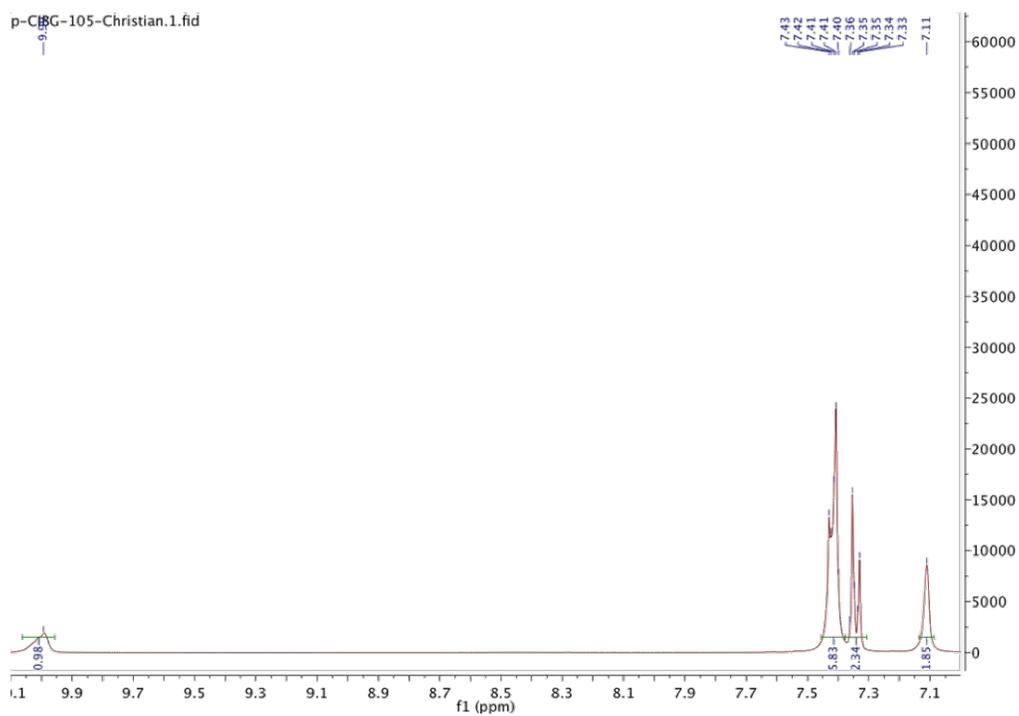


Figura 3.3 Espectro ^1H -RMN de *p*-clorofenilbiguanida.

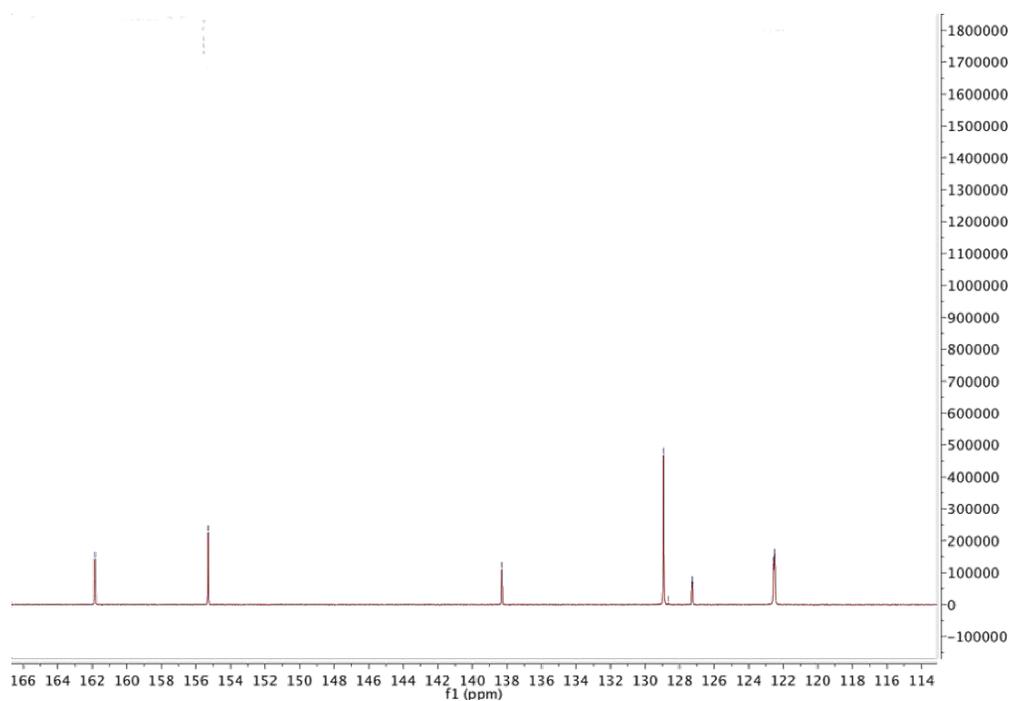


Figura 3.4 Espectro ^{13}C -RMN de *p*-clorofenilbiguanida.

De las figuras 3.5 a 3,7, se analizan los espectros bidimensionales. En el espectro COSY se confirma la correspondencia protón a protón. Del espectro HSQC se obtienen las relaciones siguientes: la señal del espectro ^{13}C RMN que se encuentra a 122,49 δ/ppm y que se correlaciona con la señal 7,40 δ/ppm del espectro ^1H RMN. La señal del espectro ^{13}C RMN 128,93 δ/ppm se correlaciona con la señal del espectro ^1H RMN, 7,33 δ/ppm .

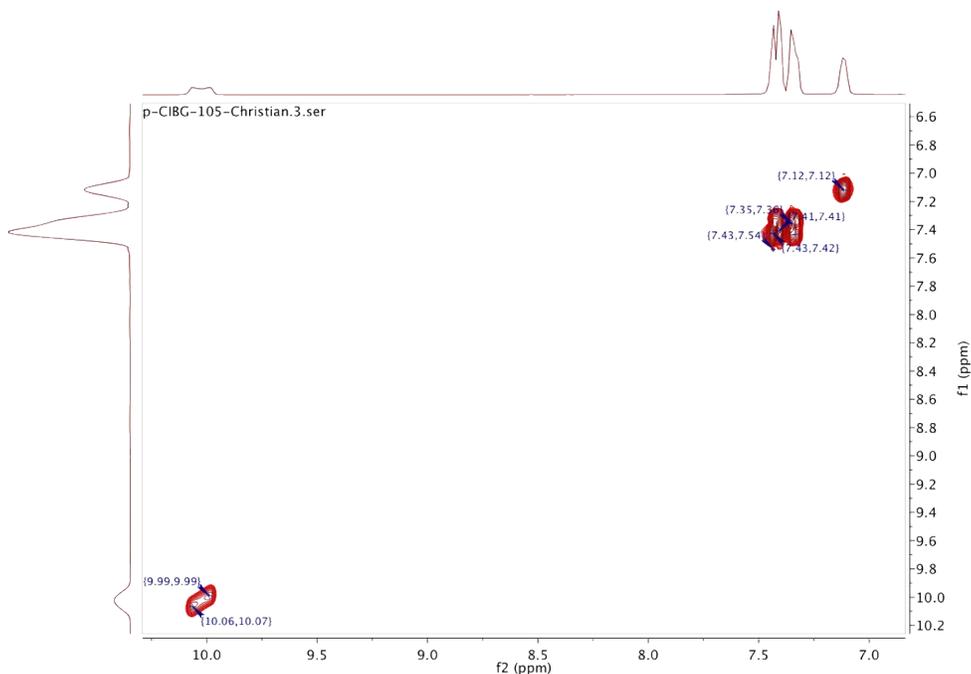


Figura 3.5 Espectro COSY de *p*-clorofenilbiguanida.

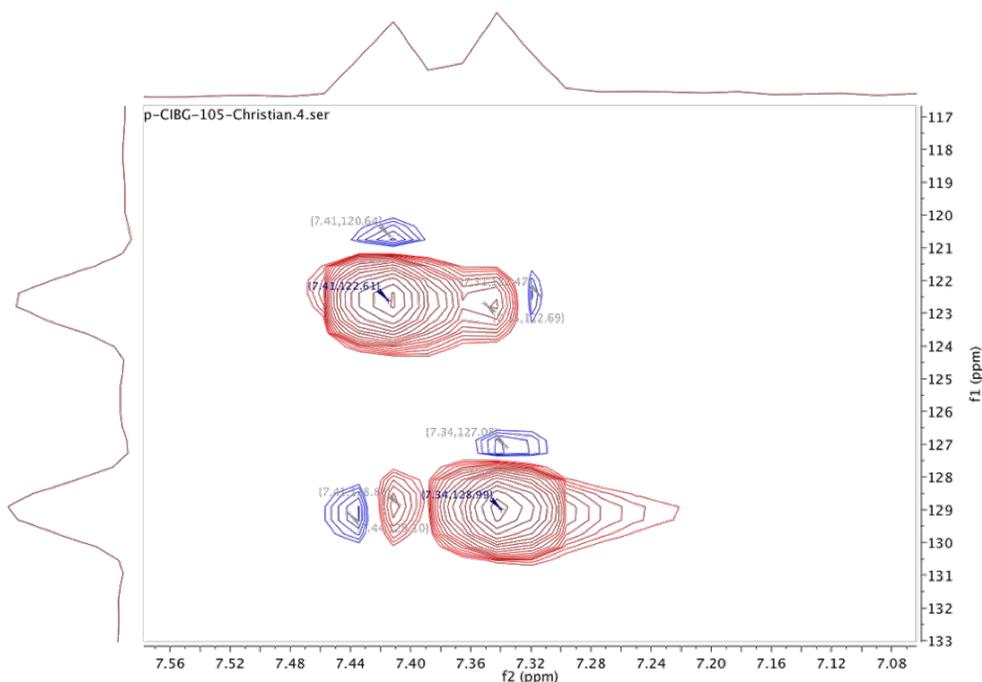


Figura 3.6 Espectro HSQC de *p*-clorofenilbiguanida.

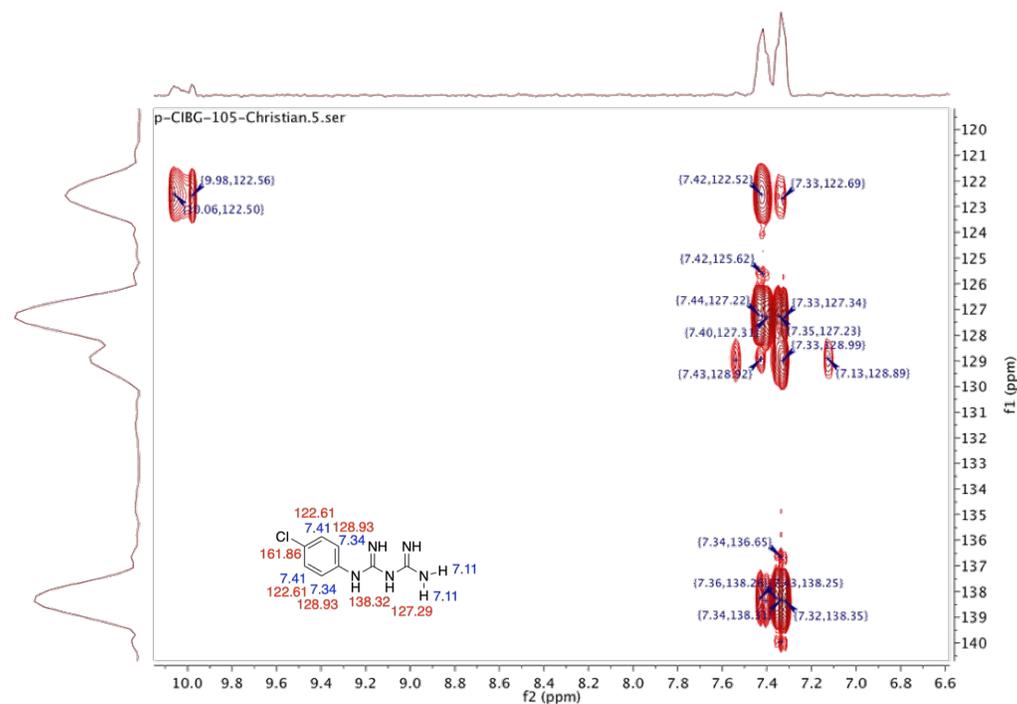


Figura 3.7. Espectro HMBC y asignación de señales de *p*-clorofenilbiguanida.

De la figura anterior, se identificaron los protones 7.32, 7.34 y 7.36 del ^1H RMN que correlacionan con el carbono a 2 y 3 enlaces con corrimiento químico a 138.32 ppm en el espectro ^{13}C RMN. Así mismo, los protones 7.33, 7.35 y 7.42 correlacionaron con el carbono a 2 y 3 enlaces 127.29 ppm. Con esta información, es posible definir la estructura molecular del intermediario **15**.

Se obtuvo además, el espectro de masas por GC/MS del precursor **15** y su pico M^+ es equivalente a 211 y corresponde con la *p*-clorofenilbiguanida.

3.2 Síntesis y caracterización química de colil *s*-triazina

En la figura 3.8, se muestra una ruta basada en el método de formación del anhídrido mixto para la síntesis de la amida biliar correspondiente en la posición 24 a partir de *p*-clorofenilbiguanida (Nojonen et al., 2012). Se emplean las siguientes condiciones de reacción basado: la presión atmosférica como presión del sistema, *N,N*-dimetilformamida (DMF) como disolvente; clorofornato de etilo como activador y tri-*n*-butilamina como catalítico.

Los ácidos carboxílicos son poco reactivos frente a reacciones de sustitución nucleofílica ya que el ión hidroxilo es una base fuerte y, consecuentemente, un mal grupo saliente. Es por eso que se utilizan condiciones básicas que desprotonen al ácido carboxílico y le permitan mover su carga electrónica hacia el carbono del carbonilo del cloroformiato de etilo, con momento dipolar positivo. La formación del enlace covalente permite la salida del ión cloruro de la molécula que es un buen grupo saliente. El anhídrido mixto queda listo para reaccionar con la amina del producto intermediario **15** hacia la formación de una amida en la posición 24 del compuesto **23**

La purificación del crudo de reacción necesariamente se realizó a través de la técnica de cromatografía en columna empacada con sílica gel N° 60 mediante una mezcla de elución 6:1 CHCl₃:MeOH, aunque también se obtuvieron cristales en DMSO, pero no fue posible aislarlos para su análisis por difracción de rayos X. En el cuadro A.1 se muestra los resultados de las pruebas de solubilidad realizadas para la obtención de cristales a partir de otras mezclas de disolventes.

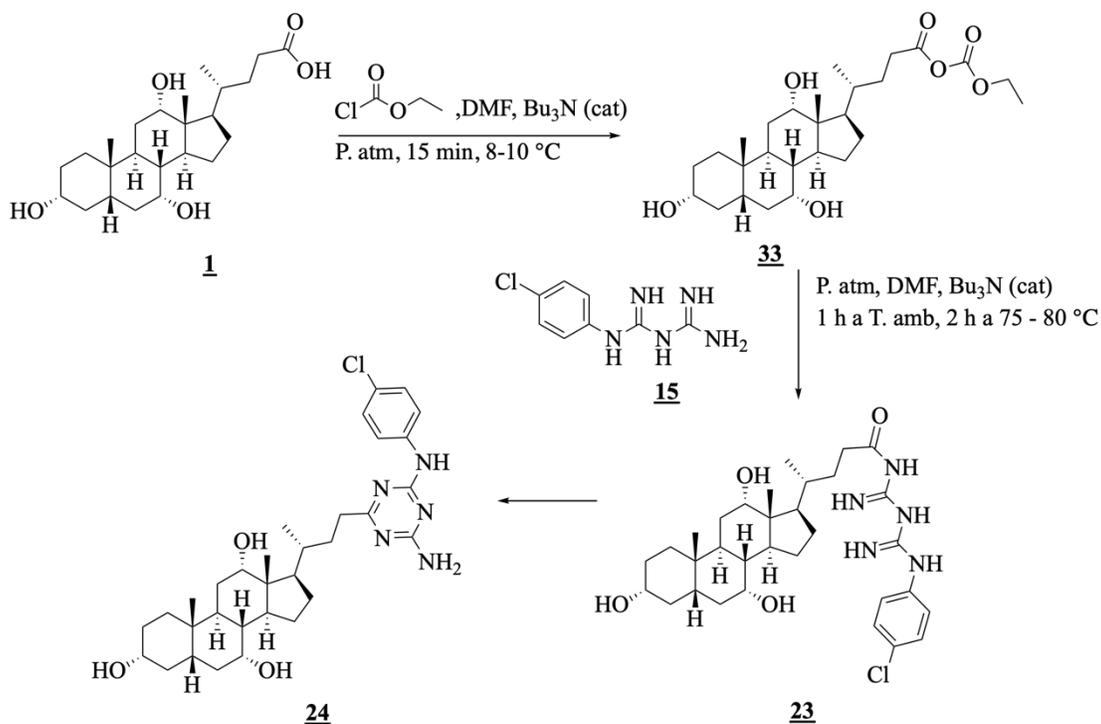


Figura 3.8 Ruta sintética propuesta basada en el método del anhídrido mixto empleando ácido cólico como sustrato de partida (Noponen et al., 2012).

La ruta sintética original pretendía obtener el producto **23** de la Figura 3.8, sin embargo, esto no fue posible, ya que la estabilidad del producto **23** durante el calentamiento es menor que la del producto **24** y según se detalla en la Figura 3.9, se produce una formación espontánea de un derivado biliar heterocíclico que no se había reportado para las condiciones de reacción actuales ni empleando el método de síntesis del anhídrido mixto.

Se realizaron diferentes repeticiones a diferentes temperaturas de calentamiento en el paso limitante de la reacción hacia el intermediario **23** para variar la selectividad de la reacción, sin embargo, esto no fue posible: un mayor tiempo de reacción o una mayor temperatura provocaban la formación de subproductos, mientras que un menor tiempo o una menor temperatura disminuían el rendimiento de la reacción.

Cualquier mejoría se monitorea visualmente en la identificación e intensidad de los spots en las placas de cromatografía de capa fina (TLC); estos spots se observan mediante la lámpara UV a una longitud de onda corta, ya que el compuesto **24** posee varios anillos aromáticos que intensifican su absorción UV debido a una mayor conjugación. Se aplicaron también dos métodos destructivos de revelado mediante calentamiento a 110 °C de las placas previamente sumergidas en una disolución de ácido fosfomolibdico, para el caso de la detección de anillos esteroidales, y a través de la formación del complejo morado de Ruhemann mediante inmersión de las placas TLC en una disolución etanólica con ninhidrina (Friedman, 2004).

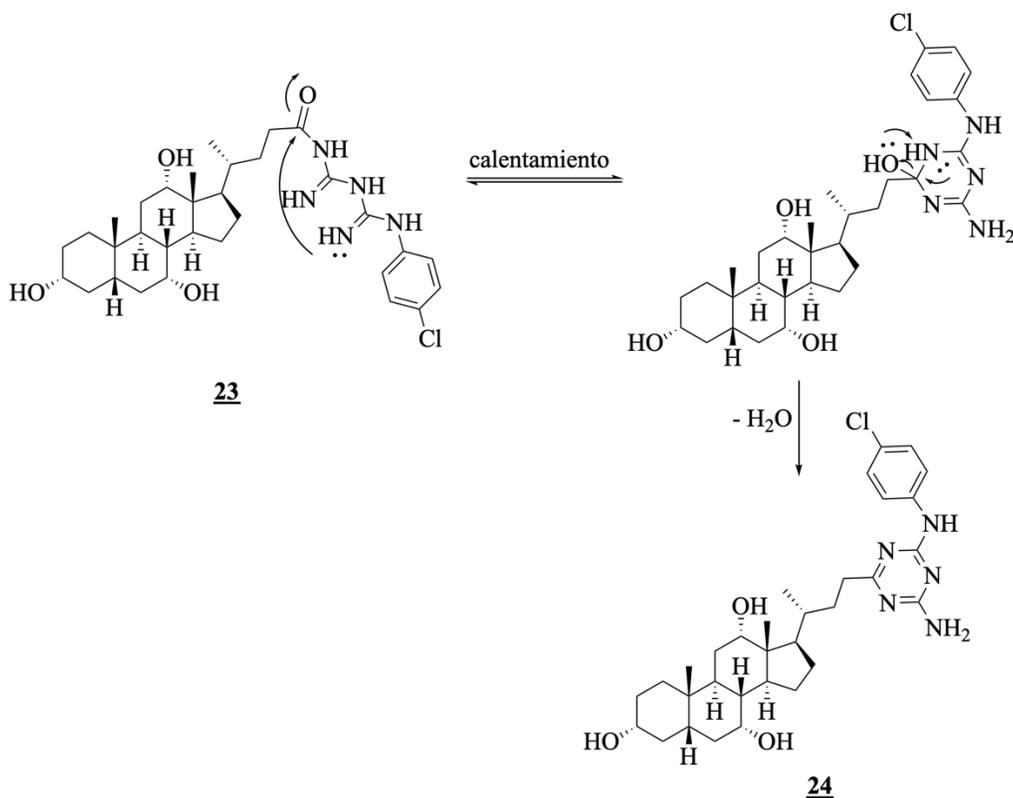


Figura 3.9 Mecanismo de formación del producto ciclado **24** a partir de **23** (Kolehmainen, 2009).

El rendimiento de la reacción fue de un 27% y el punto de fusión (descomposición) de 172.5-175 °C. Se intentó incrementar la velocidad de reacción y el rendimiento en la formación del intermediario **21** al mantener la temperatura del sistema a 12 °C y el disolvente de reacción se substituyó por dioxano, no obstante, el rendimiento global de la síntesis disminuyó en estos los casos.

Enseguida, se detalla el proceso de identificación química del compuesto **24** mediante técnicas espectroscópicas.

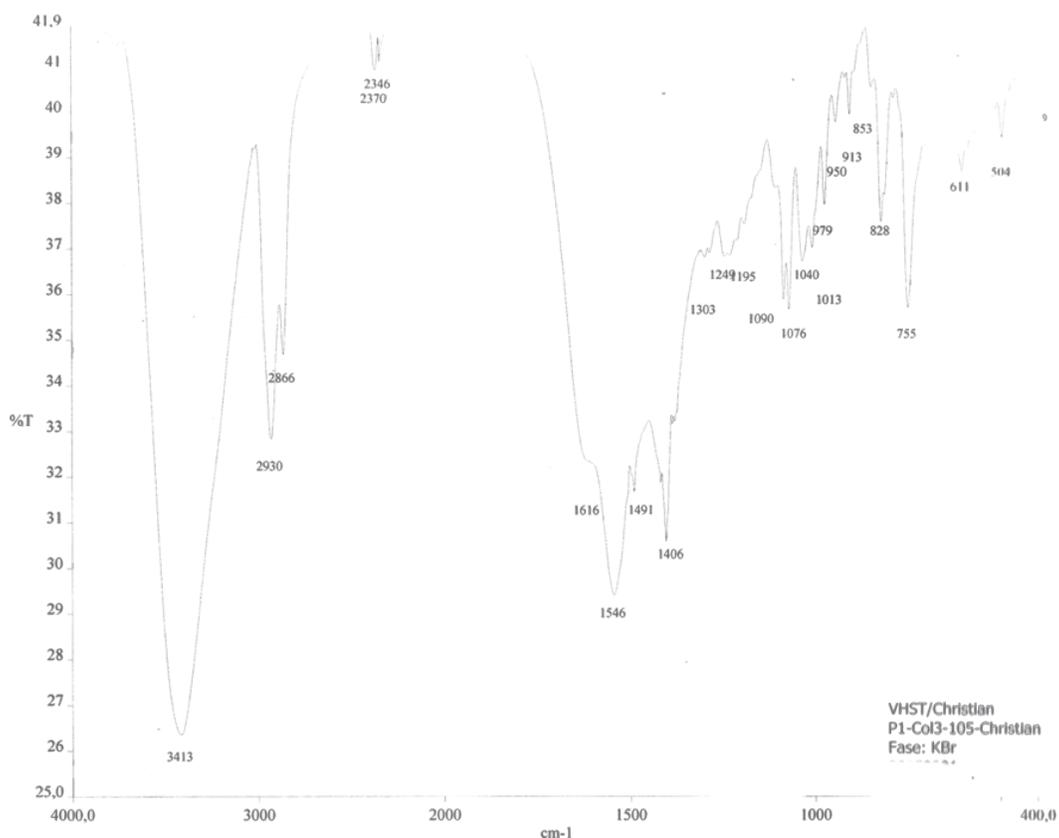


Figura 3.10 Espectro IR del producto **24**.

En el siguiente cuadro se presentan las señales IR características del compuesto **24** según la figura 3.10. La banda en 3413 cm^{-1} corresponde a la vibración de estiramiento de los enlaces N-H del grupo amino que une ambos anillos aromáticos, esta se traslapa con la banda de estiramiento de uno de los grupos OH de las posiciones 3, 7 y 12. Se aprecian las bandas de tensión C-H de la triazina y el núcleo esteroidal.

Cuadro 3.2 Asignación de las bandas principales del IR para el producto **24**.

Banda IR (cm^{-1})	Asignación	Grupo Funcional
3413	Tensiones N-H, O-H	Amina, alcohol biliar
2930 y 2866	Tensión $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$	Núcleo esteroidal
2346	Tensión $\text{C}_{\text{sp}^2}\text{-H}$	Triazina
1546	Tensión intensa ancha C=N	Triazina

En la figura 3.11, se muestra la asignación de posiciones en la estructura del compuesto **24** y que servirá para la explicación de algunas de las señales más importantes que se pueden deducir a través de la información brindada por los espectros ^1H RMN y ^{13}C RMN y los espectros bidimensionales COSY, HSQC y ^{15}N HMBC.

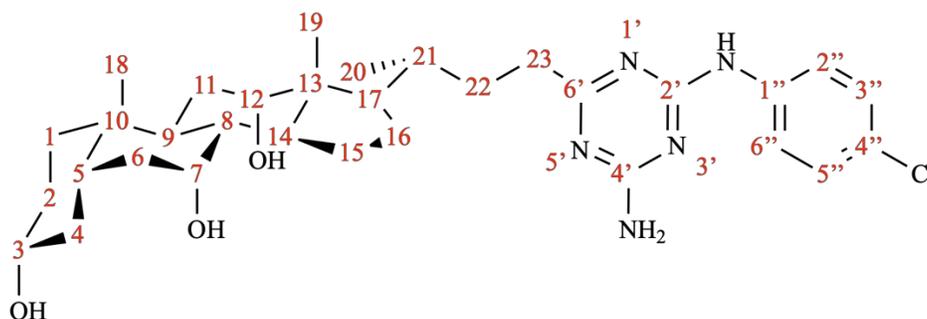


Figura 3.11 Posiciones en la estructura del compuesto **24**.

En la figura siguiente se muestra la resolución de las señales del ^1H -RMN (color azul) y del ^{13}C -RMN en el producto **24**. Para esto se emplearon las figuras 3.13 a 3.17.

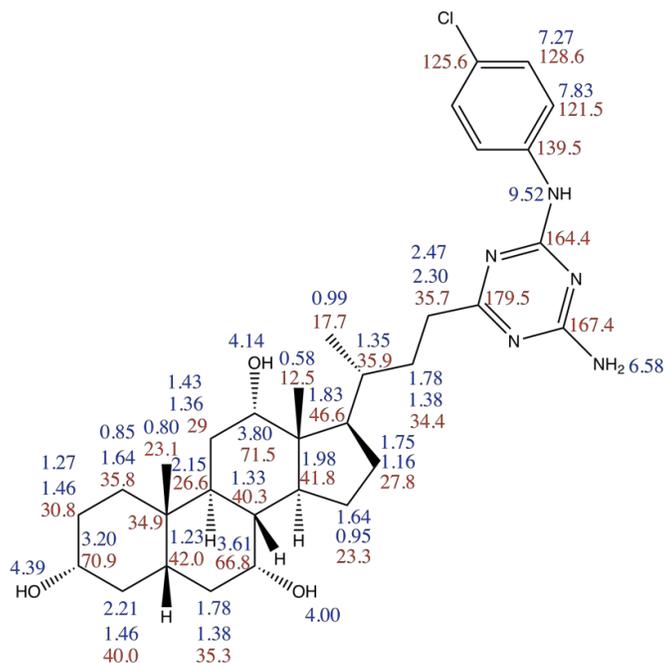


Figura 3.12 Correspondencia por correlación bidimensional de las señales ^1H -RMN (color azul) y del ^{13}C -RMN (color rojo) en el producto **24**.

En la figura 3.13, se encuentran las señales del espectro ^1H -RMN del producto **24**. En esta figura se pueden diferenciar varios grupos de señales:

- El rango de señales entre 0 y 3 ppm: es característico de protones que pertenecen a carbonos alifáticos sp^3 del núcleo esteroidal y la cadena alquílica que une el sistema de anillos aromáticos.
- El rango de señales de 3 a 4 ppm: es un rango de frecuencias características para los protones unidos a los OH que se encuentran en la cara α del sistema de anillos esteroidales.
- El rango de señales de 7 a 8 ppm: identifica a los protones aromáticos que están unidos a carbonos aromáticos. En este caso, uno de los anillos aromático solo contiene carbonos y sus protones cumplen con el rango de señales asignado.
- Protones de una amina primaria entre 6 y 7 ppm desplazados a campo más alto que el protón de una amina secundaria entre 8 y 10 ppm.

La identificación particular de estos protones se establece mediante el análisis de las correlaciones en los espectros bidimensionales.

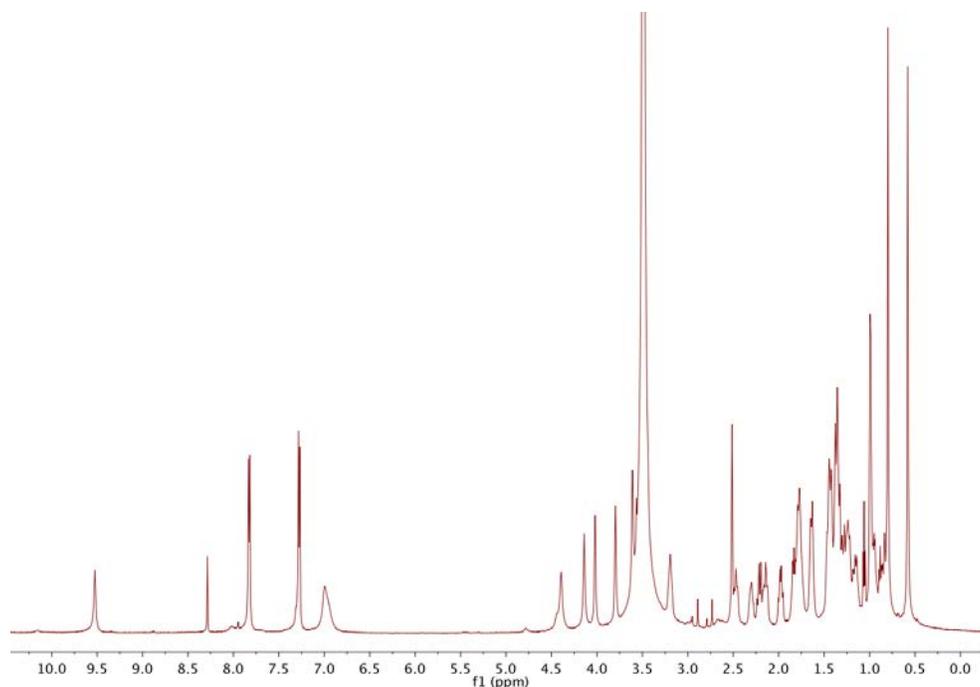


Figura 3.13 Espectro ^1H -RMN del producto **24**.

En la figura 3.14, también se observan tres grupos de señales bien definidos:

- Carbonos alifáticos de campo alto: entre los 10 y 80 ppm
- Carbonos aromáticos simples de campo medio: entre los 120 y 140 ppm
- Carbonos aromáticos del anillo triazínico de campo bajo: entre los 160 y 180 ppm

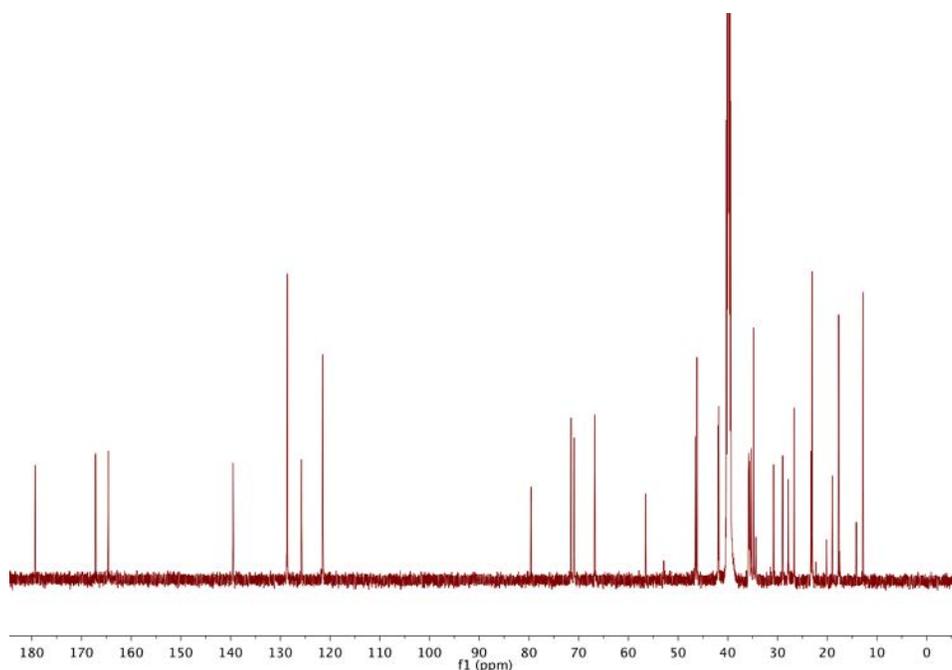


Figura 3.14 Espectro ^{13}C -RMN del producto **24**.

Una de las complicaciones en la realización de los espectros bidimensionales es que a pesar de tener una buena resolución de 600 MHz, la poca abundancia de algún isótopo limita la apreciación del espectro. En mi caso particular, se tuvo que repetir el experimento ^{15}N RMN ya que la cantidad de isótopo no era suficiente para definir con claridad las correlaciones y esto implica invertir más tiempo en corridas, en repetir el experimento con diferentes periodos de evolución τ_0 e incluso sintetizar más muestra para completar el análisis.

En la figura 3.15, se muestra el espectro ^{5}N HMBC, que correlaciona el espectro ^{15}N RMN con el ^1H RMN. Se observa una correlación entre la señal de un nitrógeno a 112 ppm con la de un protón a 9,52 ppm: esta señal de protón corresponde a la amina secundaria de la figura 3.10

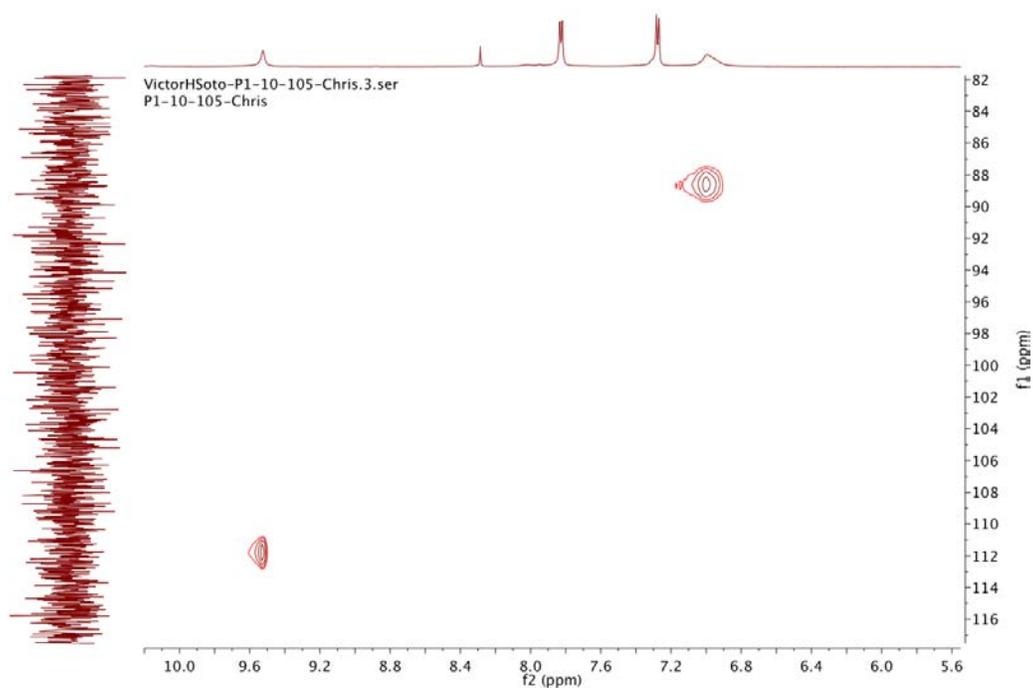


Figura 3.15. Espectro ^{15}N HMBC para el producto 24.

En el espectro COSY, se observa la correspondencia entre las señales mediante la diagonal. También aparecen otras correlaciones, que en caso de ser necesario, permiten resolver las señales confusas de protón al comparar entre protones diferentes.

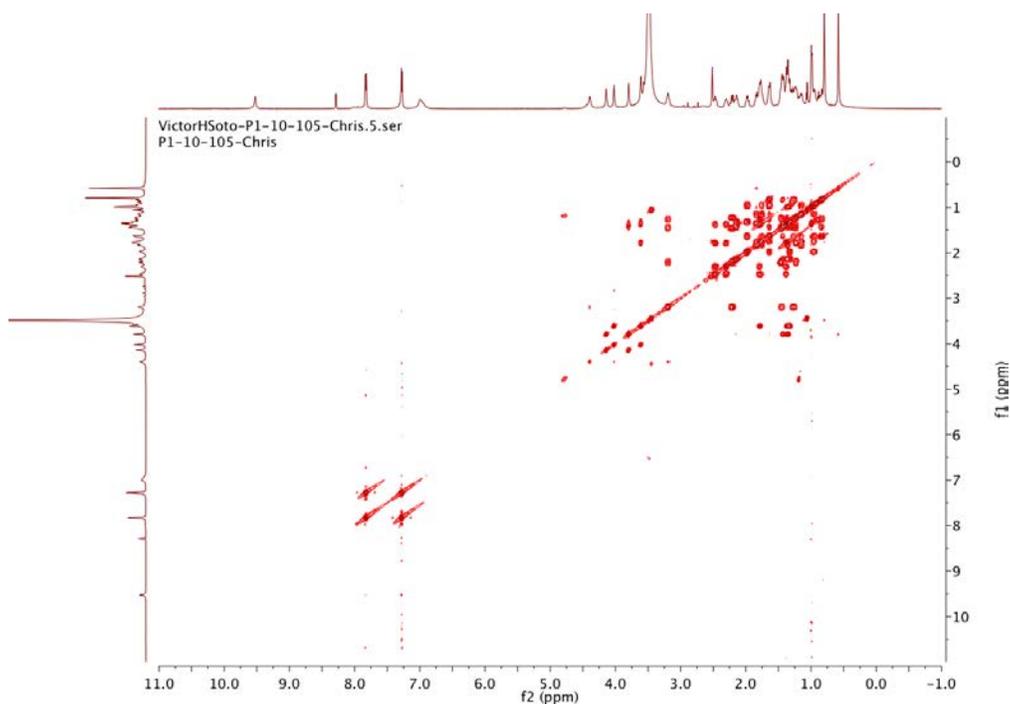


Figura 3.16 Espectro COSY del producto 24.

Del espectro HSQC, se obtienen correlaciones directas entre las señales de ^1H RMN y ^{13}C RMN. Algunas de estas correlaciones se presentan enseguida a partir de la figura 3.17:

En el espectro ^1H RMN se aprecia un singulete a δ/ppm : 7,83 corresponde al protón del carbono del anillo aromático simple en la posición 6'', lo cual se corrobora con el espectro HSQC ya que esta señal acopla con la señal de ese carbono a δ/ppm : 121,5. El singulete a δ/ppm : 7,27 corresponde al protón del carbono del anillo aromático simple en la posición 5'', esto se confirma con el espectro HSQC debido a que esta señal acopla con la señal de ese carbono a δ/ppm : 128,6. El singulete a δ/ppm : 1,83 corresponde al protón del carbono del anillo aromático simple en la posición 17, que se corrobora con el espectro HSQC al acoplar esta señal con la de ese carbono a δ/ppm : 46,6. El multiplete a δ/ppm : 3,20 y 3,80 corresponde a protones de las posiciones 3 y 12 del anillo esteroidal; esto se puede corroborar con el espectro HSQC ya que acoplan con las señales a δ/ppm : 70,9 y 71,5 respectivamente.

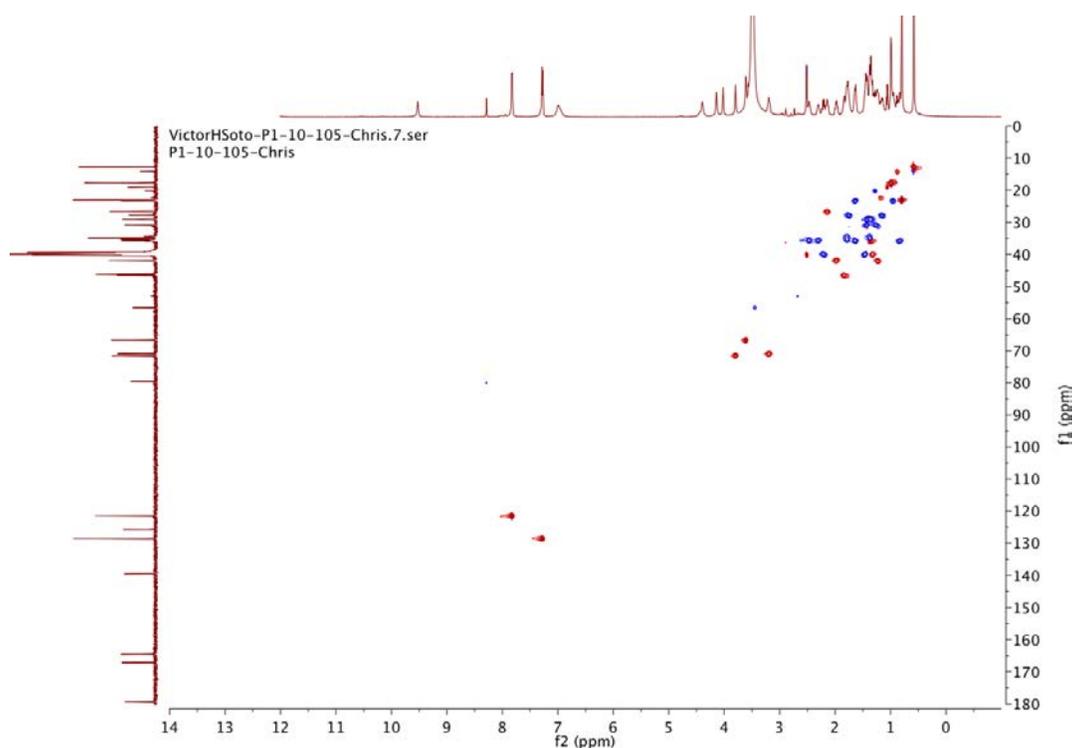


Figura 3.17 Espectro HSQC del producto **24**.

Para determinar la masa molecular, inicialmente, se utilizó el método de tiempo de vuelo, pero por el calentamiento en el método, se descompuso la muestra y el pico M^+ no correspondía con la totalidad del compuesto. Por esta razón se utilizó el método de inyección directa y se obtuvo el espectro de masas GC/MS de la figura 3.18 a una resolución de 600 MHz.

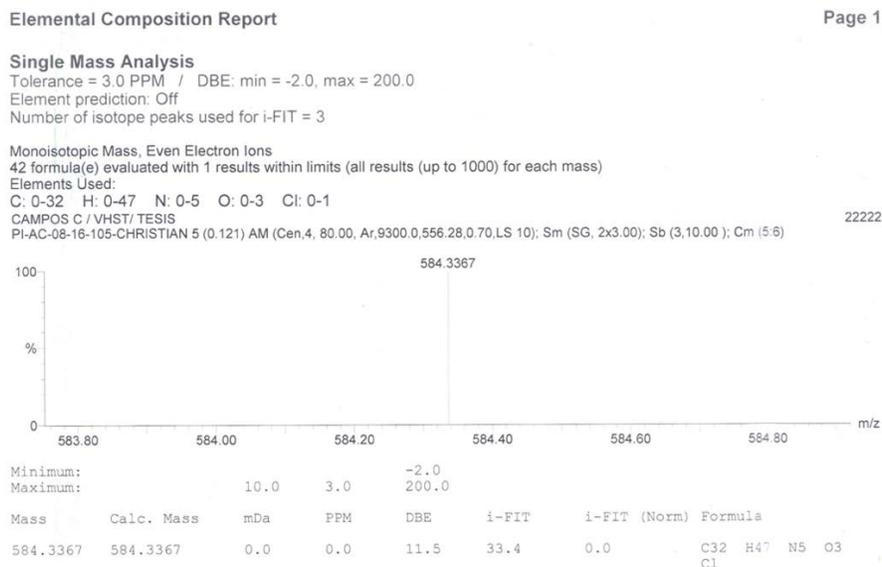


Figura 3.18 Espectro GC-MS del producto **24**

3.3 Complejación del compuesto colil s-triazina con betaciclodextrinas

Debido a la baja solubilidad del producto **24** se evalúa alguna alternativa para incrementarla, ya que se ha reportado actividad citotóxica en otra triazina similar. (Vallejo et al, 2007).

Aunque es posible introducir disolventes orgánicos o incrementar la temperatura del sistema, ambas opciones presentan limitantes prácticas si se pretende evaluar la actividad desinfectante: en la primera, los disolventes orgánicos son costosos y pueden generar una acción biocida aún en bajas concentraciones; y en la segunda, no es viable porque la aplicación del producto es a temperatura ambiente.

Se realizaron distintas pruebas de solubilidad de **24** con ciclodextrinas tal como se muestra en el apéndice A.2 y se encontró una disminución notable en la turbidez al utilizar las disoluciones con β CD y HP- β CD respecto a los patrones de ciclodextrinas α y γ .

Se procedió con la realización de la prueba de Higuchi Connors que permite solubilizar a **24** en el equilibrio con cada una de las ciclodextrinas. La determinación de la curva de calibración de **24** se realizó empleando dos disoluciones con DMSO, por su afinidad con **24**, una al 10% y otra al 15%. Se realizó un barrido de absorción en el rango UV-visible al disolver la muestra en DMSO y se encontró solo un pico de absorción a 278 nm.

Disoluciones muy diluidas pueden introducir desviaciones a la ley de Beer-Lambert. La utilización de concentraciones de la triazina en el orden de 10^{-4} M y el desconocimiento de la interacción de esta con el codisolvente, sugirió la consideración del error instrumental en el método de análisis de los datos observados y la escogencia de un método robusto y más sensible al error en cada variable de ajuste como lo es el método de mínimos cuadrados ponderados totales (WTLS).

Para aplicar este método en la determinación del ajuste de calibración, es necesario conocer las fuentes de incertidumbre asociadas a la variable independiente y su efecto sobre la variable dependiente, además se consideran las componentes de incertidumbre que contribuyen al cálculo de la incertidumbre estándar del espectrofotómetro; datos accesibles en el manual de operación del fabricante (Hayashi, 2001; JCGM, 2008).

En la figura 3.19, se muestra el diagrama de causa-efecto empleado para la determinación de la incertidumbre combinada de la absorbancia en cada curva de calibración.

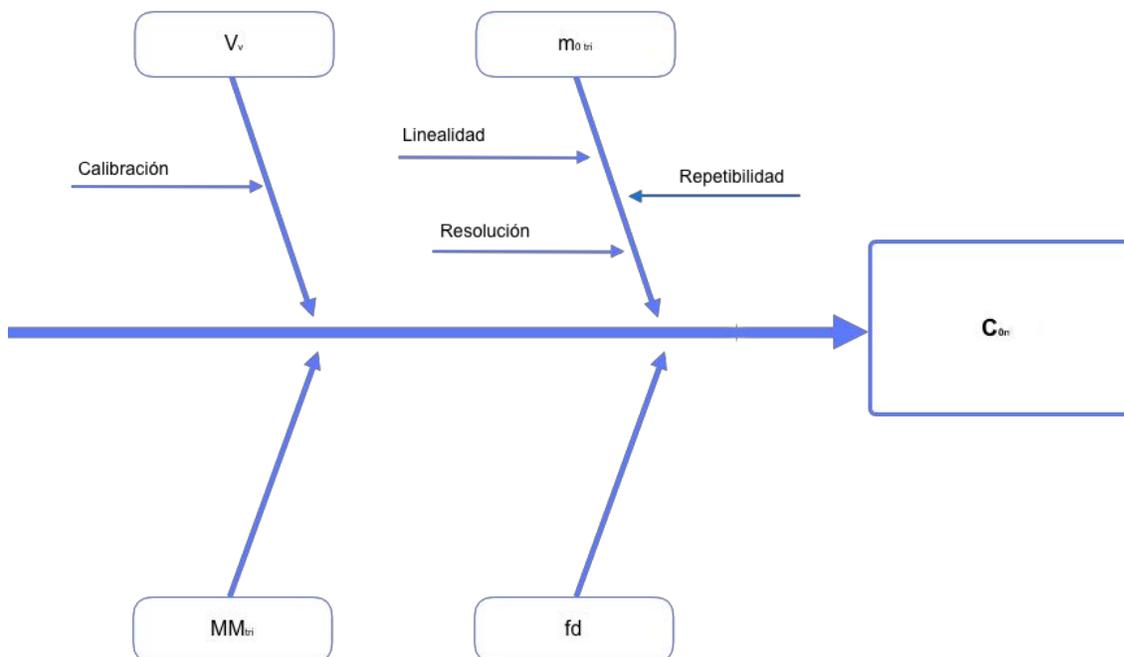


Figura 3.19 Incertidumbre combinada de la concentración del analito en la medición de absorbancia.

De acuerdo con el cálculo de las ecuaciones 1.14 a 1.19, el modelo de ajuste que se obtiene de la solución del vector \hat{a} en el método WTLS, permite definir su similitud estadística con la ley de Beer-Lambert, ecuación 1.1. Además al resolver la matriz $cov(\hat{a})$ para cada caso se obtienen los siguientes resultados.

Cuadro 3.3 Parámetros de regresión lineal para cada curva de calibración al 10% y al 15% DMSO.

Parámetro	% DMSO	
	10	15
$cov(\hat{a})$	$\begin{vmatrix} 2,65 \cdot 10^1 & -1,27 \cdot 10^6 \\ -1,27 \cdot 10^6 & 7,45 \cdot 10^{10} \end{vmatrix}$	$\begin{vmatrix} 8,19 \cdot 10^1 & -7,41 \cdot 10^6 \\ -7,41 \cdot 10^6 & 7,87 \cdot 10^{11} \end{vmatrix}$
\hat{a}	$\begin{vmatrix} -0,013498 \\ 6018,51191 \end{vmatrix}$	$\begin{vmatrix} -0,023740 \\ 18923,27583 \end{vmatrix}$

De acuerdo al cuadro 3.3, la incertidumbre asociada a cada intercepto es apreciablemente alta. Para asegurar la correspondencia del valor se evalúa cada muestra mediante el cálculo del estadístico Chi cuadrado según la ecuación 1.12 y su comparación con el valor de referencia a v grados de libertad.

Cuando la hipótesis nula es H_0 : el ajuste de los datos es lineal; si χ^2_{calc} es mayor que el valor de χ^2_{teo} para 8 grados de libertad, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa H_1 : el ajuste de los datos no es lineal. Los resultados obtenidos para cada muestra se tabulan en el Cuadro 3.4: Se observa que, en ambos casos, se acepta la hipótesis nula a un 95% de confianza, dado que $\chi^2_{\text{calc}} < \chi^2_{\text{teo}}$.

Cuadro 3.4 Resultados de la prueba χ^2 para cada muestra al 95% de confianza

Parámetro	DMSO	
	10%	15%
χ^2_{calc}	$3.46 \cdot 10^{-11}$	$-2.60 \cdot 10^{-17}$
χ^2_{teo}	15.507	15.507

Ahora, se define la validez de los supuestos de cada modelo. En las figuras 3.20 y 3.21, se observan las gráficas de residuos contra predichos y se observa, que para el caso de la curva de calibración al 10% DMSO, los residuos no se encuentran distribuidos alrededor de cero, en tanto que la otra curva al 15% DMSO sí presenta esta distribución, por lo tanto, el ajuste obtenido para la curva al 10% DMSO no es estadísticamente fiable y se rechaza.

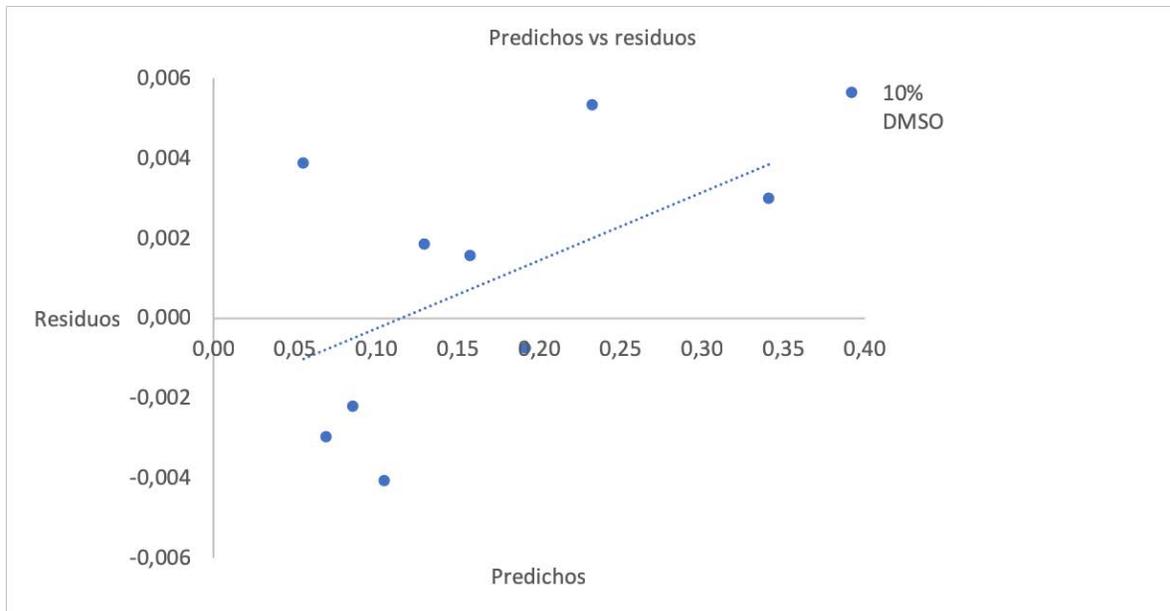


Figura 3.20 Gráfica de residuos contra predichos del modelo de ajuste en la curva de calibración con DMSO 10%

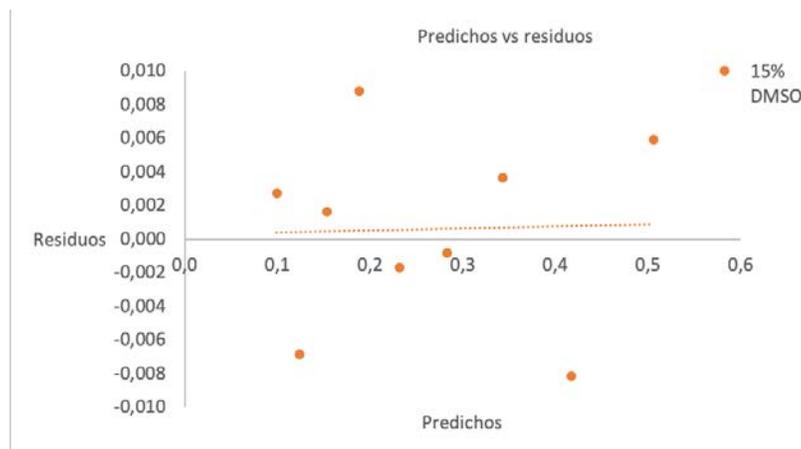


Figura 3.21 Gráfica de residuos contra predichos del modelo de ajuste en la curva de calibración con DMSO 15%

Para analizar la normalidad de los residuos del modelo, se grafican los residuos ordenados contra su correspondiente valor normal Z. Esta gráfica se muestra en la figura 3.22 y aunque algunos puntos cerca de (0,0) se desvían ligeramente de la línea de tendencia, se considera que los residuos se distribuyen de manera normal. Además, los errores de este modelo se distribuyen alrededor de cero y cumplen con el supuesto de independencia. (Chatterjee et al.,

2012). El modelo de ajuste es válido y se considera fiable dentro de los intervalos de confianza establecidos en el Cuadro 3.3.

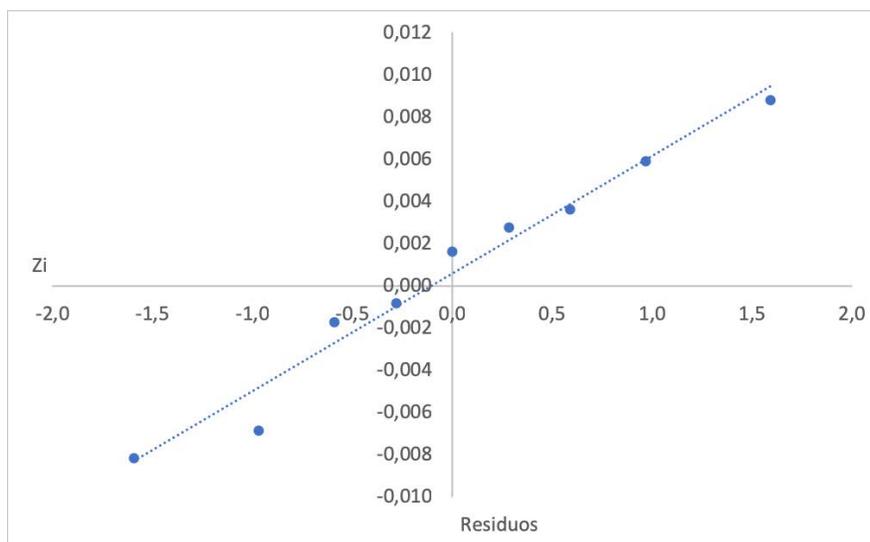


Figura 3.22 Gráfica de residuos ordenados contra valor normal Z del modelo de ajuste en la curva de calibración con DMSO 15%.

La formación de los complejos de **24** con β CD y HP- β CD requiere de agitación constante por 3 días a la temperatura controlada de 25 °C, mitigando así el efecto en la solubilidad de equilibrio debido a cambios bruscos en la temperatura (Connors, 1997; Lezcano, 2002). Estas condiciones permiten alcanzar la solubilidad de la triazina en el equilibrio, en presencia de una disolución de β CD, el agente solubilizante. Al pasar este tiempo, se considera que el proceso de complejación alcanzó el estado estable y se filtra cada una de las disoluciones a través de jeringas con filtros de 0,45 μ m, ya que por debajo de este valor límite las partículas presentes se encuentran en disolución, con esto se pretende evitar procesos no deseados como la formación de agregados, que puede ocurrir, aún así, por la estequiometría de la complejación (Saokham et al., 2018).

Se determinaron las absorbancias de las muestras filtradas, estas se evaluaron en el modelo de regresión lineal de la curva de calibración al 15% DMSO y se obtuvieron las concentraciones correspondientes de triazina respecto a cada concentración de ciclodextrina.

Se obtienen los parámetros de regresión lineal mediante el método WTLS para cada conjunto de datos, las incertidumbres se calcularon de acuerdo al apéndice C.19 y se obtuvieron los siguientes resultados:

Cuadro 3.5 Parámetros de regresión lineal de cada complejo triazina:ciclodextrina

Parámetro	Ciclodextrina			
	βCD		HP-βCD	
cov(\hat{a})	$2,87 \cdot 10^2$	$-5,13 \cdot 10^4$	$8,74 \cdot 10^2$	$-1,32 \cdot 10^5$
	$-5,13 \cdot 10^4$	$1,16 \cdot 10^7$	$-1,32 \cdot 10^5$	$2,63 \cdot 10^7$
\hat{a}	$1,60262 \cdot 10^{-5}$		$-4,28362 \cdot 10^{-6}$	
	0,0086203		0,0059838	

La varianza correspondiente a los parámetros de regresión del Cuadro 3.5 es elevada, ya que, como se aprecia en las ecuaciones C.21 y C.22, se acumula el error aleatorio de las varianzas previamente calculadas para la pendiente y el intercepto de la curva de calibración y se requiere de la validación de estos modelos de ajuste.

Se graficaron los residuos contra los predichos de cada modelo y se obtuvieron las figuras 3.23 y 3.24.

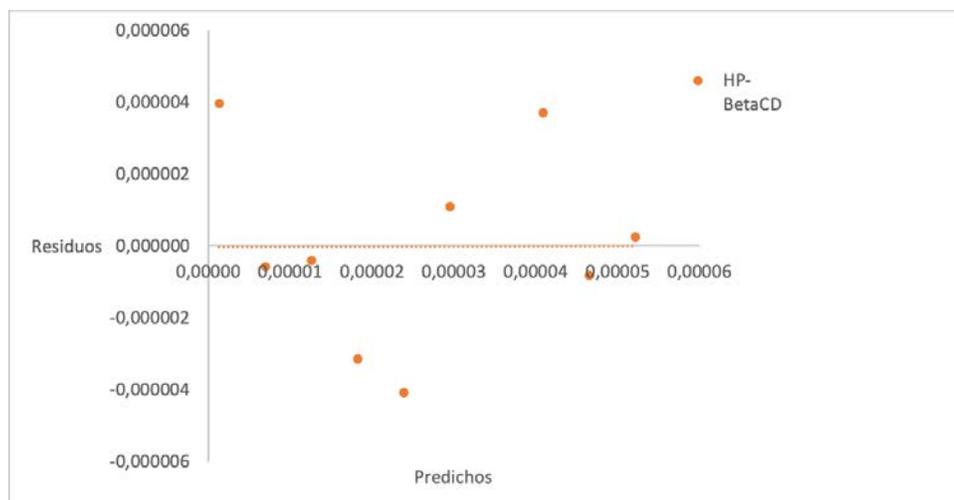


Figura 3.23 Residuos contra predichos en el modelo de la curva del diagrama de fases 24:HP-βCD.

Para el caso del modelo de regresión lineal con HP- β CD, los residuos de la Figura 3.23 se distribuyen de manera ideal alrededor de cero y cumplen el criterio de homoscedasticidad, sin embargo, no es evidente la independencia entre los errores, por lo que se realiza la prueba de Durbin-Watson para la determinación de la autocorrelación en caso de que exista.

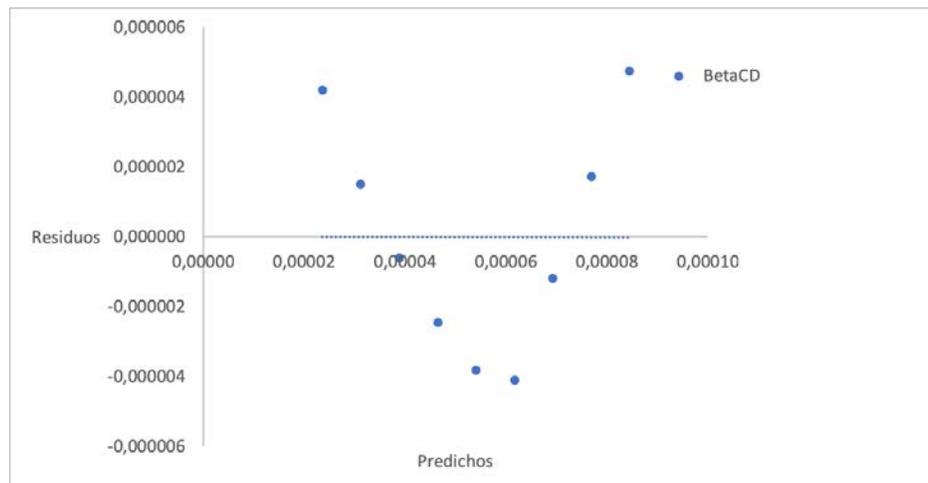


Figura 3.24 Residuos contra predichos en el modelo de regresión lineal del complejo 24: β CD.

Por otra parte, en la figura 3.24 se observa que los residuos del modelo de regresión lineal con β CD se encuentran correlacionados. Además, presentan heterodasticidad y una distribución alrededor de cero. La tendencia de los residuos es clara y esto implica ajustar la variable observada a un nuevo modelo de ajuste o aplicar alguna transformación en la variable dependiente. Se escoge lo primero, puesto que la autocorrelación es muy evidente, y se ajustan los datos a un modelo de regresión de segundo orden. En el siguiente cuadro, se muestran los resultados de las matrices $cov(\hat{\alpha})$ y $\hat{\alpha}$ al aplicar el método WTLS.

Cuadro 3.6 Parámetros del modelo de regresión de segundo orden para el complejo β CD.

Parámetro	β CD		
$cov(\hat{a})$	$8,79 \cdot 10^2$	$-4,18 \cdot 10^5$	$4,15 \cdot 10^7$
	$-4,18 \cdot 10^5$	$2,38 \cdot 10^8$	$-2,56 \cdot 10^{10}$
	$4,15 \cdot 10^7$	$-2,56 \cdot 10^{10}$	$2,91 \cdot 10^{12}$
\hat{a}	$\begin{pmatrix} 2,54512 \cdot 10^{-5} \\ 2,79592 \cdot 10^{-3} \\ 6,59865 \cdot 10^{-1} \end{pmatrix}$		

En la figura 3.25, al graficar residuos contra predichos de este nuevo modelo de ajuste para el complejo β CD, se obtiene una distribución de los errores alrededor de la línea punteada, cumple con el criterio de homoscedasticidad y se sospecha sobre la existencia de autocorrelación, por lo que se aplica la prueba de Durbin-Watson a estos residuos.

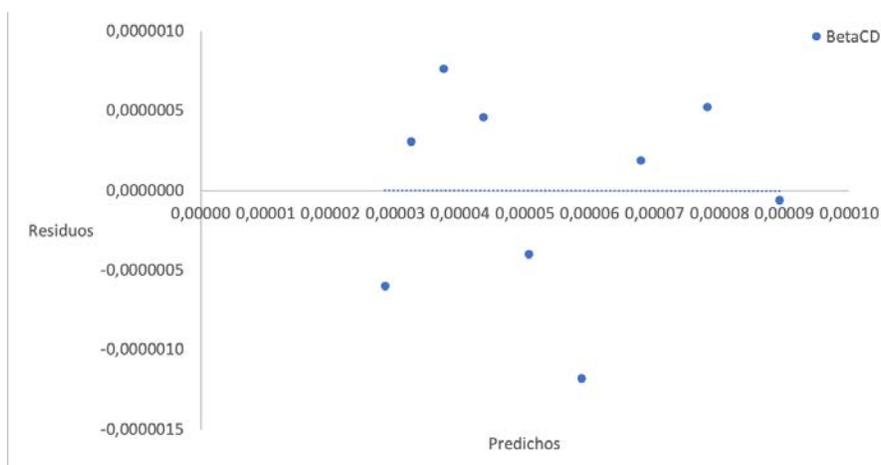


Figura 3.25 Residuos contra predichos en el modelo de regresión de segundo orden del complejo 24: β CD

Con la prueba de Durbin-Watson se pretende confirmar el criterio visual mediante un estadístico de prueba. Este estadístico se evalúa al nivel de significancia de 0,01 y para un total de 9 datos por muestra. En el siguiente cuadro se muestran los resultados de la prueba para los residuos de cada modelo de ajuste.

Cuadro 3.7 Prueba de Durbin-Watson para cada modelo de ajuste (Chatterjee et al., 2015)

Parámetro	Tipo de regresión		
	β CD lineal	β CD segundo orden	HP- β CD lineal
k'	1	2	1
d	0,509	1,539	1,443
d_L	0,554	0,408	0,554
d_U	0,998	1,389	0,998

De acuerdo al cuadro anterior, el valor de d en el modelo de regresión lineal para β CD, se encuentra por debajo de d_L , por lo tanto H_0 se rechaza y se dice que no se cuenta con certeza suficiente para afirmar que los errores no se encuentran correlacionados, esto a un 99% de confianza. Por eso, este modelo de ajuste es rechazado.

Los valores de d para los residuos de los modelos de ajuste de segundo orden para β CD y de regresión lineal para HP- β CD fueron, en ambos casos, superiores al umbral superior d_U y por lo tanto, la hipótesis nula se acepta y se puede afirmar con un 99% de confianza que, en ambos modelos, los errores no se encuentran correlacionados.

Enseguida, se muestran las gráficas de normalidad para los modelos de ajuste de cada complejo. El criterio de normalidad no se cumple en el ajuste polinomial de segundo orden con β CD: esto es permisible en ajustes de orden superior siempre y cuando se cumplan los demás supuestos de regresión. Por otra parte, los residuos ordenados del modelo para el complejo con HP- β CD respecto al valor normal Z , se ajustan sobre la recta de tendencia; sobre todo es importante que esto se cumpla en los extremos, por lo que se acepta el cumplimiento del criterio de normalidad de los residuos de este modelo (Chatterjee et al., 2015).

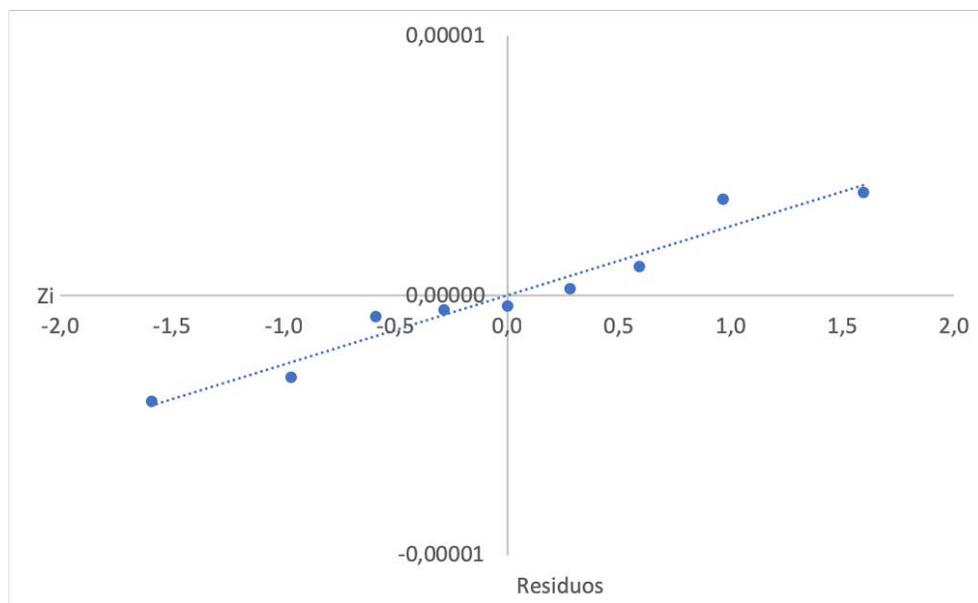


Figura 3.26 Gráfica de residuos ordenados contra valor normal Z del modelo de ajuste para el complejo con HP- β CD

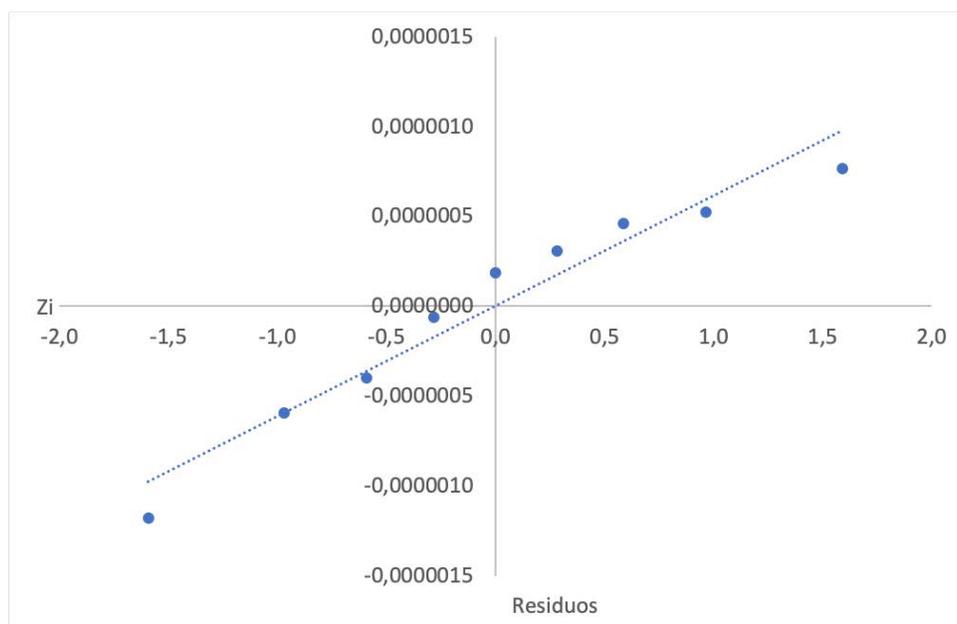


Figura 3.27 Gráfica de residuos ordenados contra valor normal Z del modelo de ajuste para el complejo con β CD.

En el siguiente cuadro, se observan las constantes de formación de los complejos de inclusión de cada ciclodextrina. En el complejo con la HP- β -CD, su diagrama de fases es de tipo A_L

y solo tiene un complejo 1:1 puesto que su modelo de ajuste es lineal y su pendiente es menor que uno (Lezcano, 2002). En el caso del complejo con la β -CD, su diagrama de fases es de tipo A_p debido a las desviaciones positivas respecto a la linealidad y como la mejor curva de ajuste fue un polinomio de segundo orden del tipo $a_0 + a_1X + a_2X^2$, se utiliza la ecuación 1.10 que modela este comportamiento.

Cuadro 3.8 Constantes de formación propuestas para cada complejo de inclusión

Parámetro	Valor	Incertidumbre asociada
$K_{11\text{HP-}\beta\text{-CD}}$	1405,32	$5,24 \cdot 10^6$
$K_{11\beta\text{-CD}}$	109,85	$3,23 \cdot 10^3$
$K_{12\beta\text{-CD}}$	0,01	$1,12 \cdot 10^2$

La constante de formación obtenida en la primera fila del cuadro 3.8 se obtuvo a partir de la siguiente ecuación:

$$K_{11\text{HP-}\beta\text{CD}} = \frac{b_{\text{HP-}\beta\text{CD}}}{P_{\text{HP-}\beta\text{CD}}(1-b_{\text{HP-}\beta\text{CD}})} \quad (3.2)$$

En el caso del complejo con β -CD se utilizaron las siguientes ecuaciones y sus resultados se tabularon en el Cuadro 3.8.

$$K_{11\beta\text{CD}} = \frac{a_{1\beta\text{CD}}}{P_{\beta\text{CD}}} \quad (3.3)$$

$$K_{12\beta\text{CD}} = \frac{a_{2\beta\text{CD}}}{P_{\beta\text{CD}} \cdot K_{11\beta\text{CD}}} \quad (3.4)$$

La incertidumbre asociada a cada constante se obtuvo de acuerdo a los lineamientos de la Guía de expresión de incertidumbre en las mediciones, aplicando la ley de propagación del error y las siguientes derivadas parciales respecto a las ecuaciones 3.5 a 3.7:

$$\frac{\partial K_{11\text{HP-}\beta\text{CD}}}{\partial P_{\text{HP-}\beta\text{CD}}} = \frac{-b_{\text{HP-}\beta\text{CD}}}{(P_{\text{HP-}\beta\text{CD}})^2(1-b_{\text{HP-}\beta\text{CD}})} \quad (3.5)$$

$$\frac{\partial K_{11\text{HP-}\beta\text{CD}}}{\partial b_{\text{HP-}\beta\text{CD}}} = \frac{-P_{\text{HP-}\beta\text{CD}}(1-2b_{\text{HP-}\beta\text{CD}})}{(P_{\text{HP-}\beta\text{CD}})^2(1-b_{\text{HP-}\beta\text{CD}})^2} \quad (3.6)$$

$$\frac{\partial K_{11\beta\text{CD}}}{\partial a_{1\beta\text{CD}}} = \frac{1}{P_{\beta\text{CD}}} \quad (3.7)$$

$$\frac{\partial K_{11\beta\text{CD}}}{\partial P_{\beta\text{CD}}} = \frac{-a_{1\beta\text{CD}}}{P_{\beta\text{CD}}^2} \quad (3.8)$$

$$\frac{\partial K_{12\beta\text{CD}}}{\partial a_{2\beta\text{CD}}} = \frac{1}{P_{\beta\text{CD}} * K_{11\beta\text{CD}}} \quad (3.9)$$

$$\frac{\partial K_{12\beta\text{CD}}}{\partial P_{\beta\text{CD}}} = \frac{-a_{2\beta\text{CD}}}{P_{\beta\text{CD}}^2 * K_{11\beta\text{CD}}} \quad (3.10)$$

$$\frac{\partial K_{12\beta\text{CD}}}{\partial K_{11\beta\text{CD}}} = \frac{-a_{2\beta\text{CD}}}{P_{\beta\text{CD}} * K_{11\beta\text{CD}}^2} \quad (3.11)$$

La constante $K_{11\text{HP-}\beta\text{CD}}$ es la que presenta un mayor valor entre las tres constantes determinadas por lo que el complejo de **24** con HP- β CD es más estable con respecto a los formados con β CD.

3.4 Evaluación de la actividad desinfectante de los complejos de inclusión con betaciclodextrinas

Una vez definida la estequiometría de complejación y las respectivas constantes de cada complejo, se prepararon las disoluciones filtradas de cada uno de los complejos con concentraciones dentro del rango de solubilidad de las curvas de los diagramas de fase para la evaluación de su actividad desinfectante: 0,0244 mM de **24** con HP- β CD y 0,0359 mM de **24** con β CD.

Estas disoluciones se midieron en el INISA, gracias a la colaboración de la microbióloga Kenia Barrantes Jimenez y un estudiante avanzado de la Lic. en Microbiología y Química Clínica de la UCR. Se siguió la metodología indicada en la Sección 2.3 y se obtuvieron los siguientes resultados respecto a las cepas multiresistentes evaluadas.

Cuadro 3.9 Evaluación de la actividad desinfectante de los complejos 24:HP- β CD y 24: β CD según el método ASTM E2315-16

Cepa	Tiempo			
	1 min		10 min	
	HP- β CD	β CD	HP- β CD	β CD
<i>P. aeruginosa</i> (MR) 449	-2,10 log	-1,72 log	-1,96 log	-1,74 log
<i>E.coli</i> ATCC 25922	-3,25 log	-2,23 log	-3,25 log	-2,23 log
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	-0,22 log	-0,89 log	-0,19 log	-0,81 log
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 14502	-2,23 log	-1,67 log	-2,23 log	-0,49 log
<i>E. coli</i> (MR) 471	-1,19 log	-0,43 log	-1,21 log	-0,31 log

En general, para ninguna de las cepas evaluadas se mostró disminución. Se considera que la concentración de **24** que se logró solubilizar, a través de los complejos, no fue suficiente para generar un efecto biocida en las cepas bacterianas evaluadas.

Antes de realizar estas evaluaciones, se contempló incrementar gradualmente la concentración libre de **24** con DMSO al 15%, la concentración empleada como base en la curva de calibración. Sin embargo, al realizar esta modificación en la formulación surgen otras complicaciones:

- Formación de complejos de inclusión DMSO con β -CD (Aree & Chaichit, 2002): No se conoce la interacción de estos complejos con los de **24**: β CD por lo que la estequiometría podría cambiar y esto implicaría la aplicación de otro estudio de estabilidad para este nuevo sistema.
- El codisolvente DMSO muestra actividad inhibitoria y bacterioestática según la concentración: un 15% se considera una concentración alta y es necesario un control adicional para el codisolvente (Ansel, Norred & Roth, 1969).
- El codisolvente DMSO es costoso: si el producto fuera eficaz, el costo del codisolvente es representativo.

La consideración de los aspectos anteriores necesariamente exigía otra etapa adicional de investigación en función de una mejora en los resultados ya obtenidos en el Cuadro 3.9 y correspondientes a la evaluación de los complejos **24**: β CD y **24**:HP- β CD sin codisolvente.

Capítulo 4. Conclusiones y recomendaciones

El derivado biliar 24 se sintetizó a través del método del anhídrido mixto con un rendimiento del 27%.

Se confirmó la identidad de los productos 15 y 24 y se caracterizó estructuralmente con técnicas espectroscópicas avanzadas como RMN en una y dos dimensiones, GC/MS y FT-IR.

Respecto a las pruebas de solubilidad en fase, se determinó que la curva de calibración de 24 al 15% DMSO presentaba un mejor ajuste lineal que la de 10% DMSO al validar los supuestos del modelo.

Además, se determinó el valor de la constante de complejación del complejo 24:HP- β CD, mucho mayor que la del complejo 1:1 de 24: β CD, por lo que el complejo 24:HP- β CD es más estable.

Por último, los complejos 24: β CD y 24:HP- β CD, a la concentración de aplicación, no mostraron actividad desinfectante significativa respecto a las cepas bacterianas evaluadas a 1 minuto y 10 minutos.

Se sugiere la introducción de un codisolvente en la formulación, como DMSO, que mejore la solubilidad de los complejos 24:HP- β CD y 24: β CD a pesar de las posibles limitaciones prácticas en la evaluación de la actividad desinfectante.

Se recomienda aumentar el tamaño de la muestra con el fin de reducir la dispersión con base en el error máximo permisible.

Capítulo 5. Bibliografía

- Adam Equipment Company. (2007). PW series manual. Reino Unido, Gran Bretaña.
- Amiri-Simkooei, A. & Jazaeri, S. (2012). Weighted total least squares formulated by standard least squares. *Journal of Geodetic Science*, 2(2), 113-124. doi:10.2478/v10156-011-0036-5
- Andersen, N. S., Köckenberg, W. (2005). A simple approach for phase-modulated single-scan 2D NMR spectroscopy. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 43(10), 795-797. doi:10.1002/mrc.1624
- Andrews, J. W. (2001). Determination of minimum inhibitory concentration. *J Antimicrob Chemother.* 48 (7) Suppl 1:5-16.
- Anelli, P., Lattuada, L., Uggeri, F. (1998). One-Pot Mitsunobu-Staudinger Preparation of 3-aminocholan-24-oic acid esters from 3-hidroxycholan-24-oic acid esters. *Synthetic Communications*, 28, 109–117. doi:10.1080/00397919808005079
- Ansel, H. C., Norred, W. P. & Roth, I. L. (1969). Antimicrobial Activity of Dimethyl Sulfoxide Against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Bacillus megaterium*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 58(7), 836-839. doi: 10.1002/jps.2600580708
- Aree, T. & Chaichit, N. (2002). Crystal structure of β -cyclodextrin-dimethylsulfoxide inclusion complex. *Carbohydrate Research*, 337, 2487-2494. doi:10.1016/S0008-6215(02)00335-X
- Aue, W. P., Bartholdi, E., Ernst, R. R. (1976). Two-dimensional spectroscopy. Application to nuclear magnetic resonance. *The Journal of Chemical Physics*, 64 (5), 2229-2246. doi:10.1063/1.432450
- Becerra, L.O. S., Peña, L. M. P. & Ramirez, L. V. (2012). Fitting curves to describe errors of indications in use of measuring instruments. *Ingeniería*, 22(1), 13-23.
- Begley, M., Gahan, C. G. M., & Hill, C. (2005). The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(4), 625–651. doi:10.1016/j.femsre.2004.09.003
- Bellini, A. M., Mencini, E., Quaglio, M. P., Guarneri, M., & Fini, A. (1990). Antimicrobial activity of basic cholane derivatives. Part IX. *Archiv Der Pharmazie*, 323(4), 201–205. doi:10.1002/ardp.19903230404
- Bienz, S. (2002). Anwendung Spektroskopischer Methoden. Teil: Kernmagnetische Resonanz. Universidad de Zurich. Suiza.
- Boeco. (2018). Liquid Handling. Alemania
- Caja Costarricense del Seguro Social (2007). Normas y procedimientos institucionales para la prevención y control de infecciones nosocomiales. Recuperado de <https://www.ccss.sa.cr/normativa>
- Cerf, O., Carpentier, B., Sanders, P. (2010). Tests for determining in-use concentrations of antibiotics and disinfectants are based on entirely different concepts: "resistance" has different meanings. *International Journal of Food Microbiology*, 136(3), 247-254. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.10.002
- Chatterjee, S. & Hadi, A. S. (2012). Regression Analysis by Example. Quinta edición. John Wiley & Sons. Estados Unidos de América.
- Connors, K. A. (1997). The Stability of Cyclodextrin Complexes in Solution. *Chem. Rev.* 97, 1325-1357.

- E35 Committee. (2016). E2315-16: Guide for Assessment of Antimicrobial Activity Using a Time-Kill Procedure. West Conshohocken, PA. ASTM International.
- Eband, R. F., Savage, P. B., & Eband, R. M. (2007). Bacterial lipid composition and the antimicrobial efficacy of cationic steroid compounds (Ceragenins). *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1768(10), 2500–2509. doi:10.1016/j.bbamem.2007.05.023
- Friedman, M. (2004). Applications of the Ninhydrin Reaction for Analysis of Amino Acids, Peptides, and Proteins to Agricultural and Biomedical Sciences. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 385-406.
- Fulmer, G. R., Miller, A. J. M., Sherden, N. H., Gottlieb, A. N., Stoltz, B. M., Bercaw, J. E. & Goldberg, K. I. NMR Chemical Shifts of Trace Impurities: Common Laboratory Solvents, Organics, and Gases in Deuterated Solvents Relevant to the Organometallic Chemist. *Organometallics*, 29, 2176–2179. doi:10.1021/om100106e
- Gupta, A., Kumar, B. S., & Negi, A. S. (2013). Current status on development of steroids as anticancer agents. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 137, 242–270. doi:10.1016/j.jsbmb.2013.05.011
- Hazra, B. G., Pore, V. S., Dey, S. K., Datta, S., Darokar, M., Saikia, D., Khanuja, S. P. S., Thakur, A. P. (2004). Bile acid amides derived from chiral amino alcohols: novel antimicrobials and antifungals. *Bioorganic & Medicinal Chemical Letters*, 14(3), 773-777. doi:10.1016/j.bmcl.2003.11.018
- Hayashi, T. (2001). UV-Vis Spectrophotometer UV-1700 series Service manual. Shimadzu Corporation. Tokio, Japón.
- Heftman, E. (1976). Chromatography of Steroids. *Journal of Chromatography Library*, 8, 71-78.
- Ikonen, S., Takala, S., Nonappa, Kolehmainen, E. (2009). Facile synthesis of 5b-cholane-sym-triazine conjugates starting from metformin and bile acid methyl esters: Liquid and solid state NMR characterization and single crystal structure of lithocholyl triazine. *Journal of Molecular Structure*, 936, 270-276. doi:10.1016/j.molstruc.2009.08.008
- Joint Committee for Guides in Metrology (JCGM). (2008). Evaluation of measurement data — Guide to the expression of uncertainty in measurement. Bélgica.
- Khan, H. A., Baig F. K. & Mehboob, R. (2017). Nosocomial infections: Epidemiology, prevention, control and surveillance. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(5), 478–482. doi:10.1016/j.apjtb.2017.01.019
- Krause, T., Baader, S., Erb, B., & Gooßen, L. J. (2016). Atom-economic catalytic amide synthesis from amines and carboxylic acids activated in situ with acetylenes. *Nature Communications*, 7, 11732. doi:10.1038/ncomms11732.
- Krystek, M. & Anton, M. (2007). A weighted total least-squares algorithm for fitting a straight line. *Measurement Science & Technology*, 18(11), 3438-3442. doi:10.1088/0957-0233/18/11/025
- Nelson, D. L. & Cox, M. M. (2012). Lehninger Principles of Biochemistry. Sexta edición. W.H. Freeman. New York, Estados Unidos de América.
- Lezcano, M. B. (2002). Complejación de biocidas por ciclodextrinas. Tesis doctoral. Universidad Santiago de Compostela. España.
- Mayer, S., Daigle, D. M., Brown, E. D., Khatri, J., & Organ, M. G. (2004). An expedient and facile one-step synthesis of a biguanide library by microwave irradiation coupled with simple product filtration. Inhibitors of dihydrofolate reductase. *Journal of Combinatorial Chemistry*, 6(5), 776–782. doi:10.1021/cc049953

- Metzger, L. E., Lee, J. K., Finer-Moore, J. S., Raetz, C. R. H., & Stroud, R. M. (2012). LpxI structures reveal how a lipid A precursor is synthesized. *Nature Structural & Molecular Biology*, *19*(11), 1132–1138. doi:10.1038/nsmb.2393
- Moolenaar R. L., Crutcher J. M., San Joaquín V. H., Sewell L.V., Hutwagner L. C. (2000). A Prolonged Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* in a Neonatal Intensive Care Unit: Did Staff Fingernails Play a Role in Disease Transmission? *Infection Control and Hospital Epidemiology*, *21*(2), 80-85. doi:10.1086/501739
- Nerandzic, M. M., & Donskey, C. J. (2015). Induced Sporicidal Activity of Chlorhexidine against *Clostridium difficile* Spores under Altered Physical and Chemical Conditions. *PLoS ONE*, *10*(4), e0123809. doi:10.1371/journal.pone.0123809
- Noponen, V., Belt, H., Lahtinen, M., Valkonen, A., Salo, H., Ulrichová, J., et al. (2012). Bile acid- cysteamine conjugates: structural properties, gelation, and toxicity evaluation. *Steroids*, *77*(3), 193–203. doi:10.1016/j.steroids.2011.11.006
- Nováková, Z., Tomanová, J., Štěrbová, L., & Drašar, P. (2011). Steroid and bile acids amide conjugates with D-glucosamine. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, *76*(1), 65–74. doi:10.1135/cccc2010105
- Omota, L., Iulian, O., Omota, F. & Ciocîrlan, O. (2009). Densities and derived properties of water, 1,4-dioxane and dimethyl sulfoxide binary and ternary systems at temperatures from 293.15 K to 313.15 K. *Revue Roumaine de Chimie*, *54*(1), 63-73.
- OMS (Organización Mundial de la Salud) (2002). Prevención de las infecciones nosocomiales: Guía práctica. Segunda edición. Malta: Minimum Graphics.
- OPS (Organización Panamericana de la Salud) (2017). Prevención y control de infecciones asociadas a la atención de la salud. Recomendaciones Básicas. Primera edición. Washington D.C.: Editorial OPS.
- Pavia, D. L., Lampman, G. M., Kriz, G. S. & Vyvyan J. R. (2013). Introduction to Spectroscopy. Quinta edición. Cengage learning. Estados Unidos de América.
- Pitha, J., Milecki, J., Fales, H., Pannell, L. & Uekama, K. (1986). Hydroxypropyl- β -cyclodextrin: preparation and characterization; effects on solubility of drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, *29*, 73-82. doi: 10.1016/0378-5173(86)90201-2
- Pudney, M., Gutteridge, W., Zeman, A., Dickins, M. & Woolley, J. L. (1999). Atovaquone and proguanil hydrochloride: A review of nonclinical studies. *Journal of Travel Medicine*. *6*, S8-S12.
- Raetz, C. R. H., Reynolds, C. M., Trent, M. S., & Bishop, R. E. (2007). Lipid A Modification Systems in Gram-Negative Bacteria. *Annual Review of Biochemistry*, *76*(1), 295–329. doi:10.1146/annurev.biochem.76.010307.145803
- Roca, I., Akova, M., Baquero, F., Carlet, J., Cavaleri, M., Coenen, S. (2015). The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention. *New Microbes and New Infections*, *6*, 22–29. doi:10.1016/j.nmni.2015.02.007
- Salazar, J. C. (2017). Síntesis y caracterización de derivados del ácido desoxicólico con posibles efectos biológicos sobre células cancerígenas y como potenciales desinfectantes. Trabajo final de graduación presentado para optar por el grado de Licenciatura en Química. UCR.
- Sadsad R., Sintchenko V., McDonnell G. D., Gilbert G.L. (2013). Effectiveness of Hospital-Wide Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Infection Control Policies Differs by Ward Specialty. *PLoS ONE* *8*(12), e83099. doi:10.1371/journal.pone.0083099

- Saokham, P., Muankaew, C., Jansook, P. & Thorsteinn, L. (2018). Solubility of Cyclodextrins and Drug/Cyclodextrin Complexes. *Molecules*, 23(5), 1161-1176. doi:10.3390/molecules23051161
- Shah, D. R., Modh, R. P., Chikhaliya, K. H. (2014). Privileged s-triazines: structure and pharmacological applications, 6(4), 463-477. doi:10.4155/fmc.13.212
- Silverstein, R. M., Kiemie, D. & Webster, F. X. (2005). *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. Sétima edición. John Wiley & Sons. Estados Unidos de América
- Somarribas, L. F. P. (2014). Evaluación del potencial antitumoral de derivados sintéticos de ácidos biliares. Tesis para optar por el grado y título de maestría académica en Ciencias Biomédicas con énfasis en Bioquímica y Fisiología Celular. UCR.
- Sooväli, L., Room, E., Kütt, A., Kaljurand, I. & Leito, I. (2006). Uncertainty sources in UV-Vis spectrophotometric measurement. *Accreditation and Quality Assurance*, 11, 246-255. doi:10.1007/s00769-006-0124-x
- Sommer, L. (1989). *Analytical Absorption Spectrophotometry in the Visible and Ultraviolet The Principles*. Vol. 8. Elsevier Science Publisher, Hungary.
- Soto, V. T. (2006). Estructuras supramoleculares generadas por ciclodextrinas, adamantanos y ácidos biliares. Tesis doctoral. Universidad Santiago de Compostela. España.
- Su, H. & Berenson, M. L. (2017). Comparing Tests of Homoscedasticity in Simple Linear Regression. *JSM Mathematics and Statistics*, 4(1), 1017-1027.
- Swan, J. T., Ashton, C. M., Bui, L. N., Pham, V. P., Shirkey, B. A., Blackshear, J. E., Wray, N. P. (2016). Effect of Chlorhexidine Bathing Every Other Day on Prevention of Hospital-Acquired Infections in the Surgical ICU: A Single-Center, Randomized Controlled Trial. *Critical Care Medicine*, 44(10), 1822-1832. doi:10.1097/ccm.0000000000001820
- Tamminen, J., & Kolehmainen, E. (2001). Bile acids as building blocks of supramolecular hosts. *Molecules*, 6, 21-46. doi:10.3390/60100021
- Vallejo, M., Castro, M. A. Medarde, M., Macías, R. I. R., Romero, M. R., El-Mir, M. Y., Monte, M. J., Briz, O., Serrano, M. A., Marín, J. J. G. (2007). Novel bile acid derivatives (BANBs) with cytostatic activity obtained by conjugation of their side chain with nitrogenated bases. *Biochemical Pharmacology*, 73(9), 1394-1404. doi:10.1016/j.bcp.2006.12.027
- Viollet, B. & Foretz M. (2013). Les mécanismes d'action de la metformine dans le foie revisités. *Annales d'Endocrinologie*, 74,123-129. doi:10.1016/j.ando.2013.03.006
- Wang, E. W. & Layon A. J. (2007). Chlorhexidine gluconate use to prevent hospital acquired infections – a useful tool, not a panacea. *Annals of translational medicine*, 5(1), 1-3. doi:10.21037/atm.2017.01.01
- Zhong, Z., Yan, J., & Zhao, Y. (2005). Cholic Acid-Derived Facial Amphiphiles with Different Ionic Characteristics. *Langmuir*, 21(14), 6235-6239. doi:10.1021/la050621b
- Zhu, X.-X., & Nichifor, M. (2002). Polymeric Materials Containing Bile Acids. *Accounts of Chemical Research*, 35(7), 539-546. doi:10.1021/ar0101180

Apéndice A. Datos Experimentales

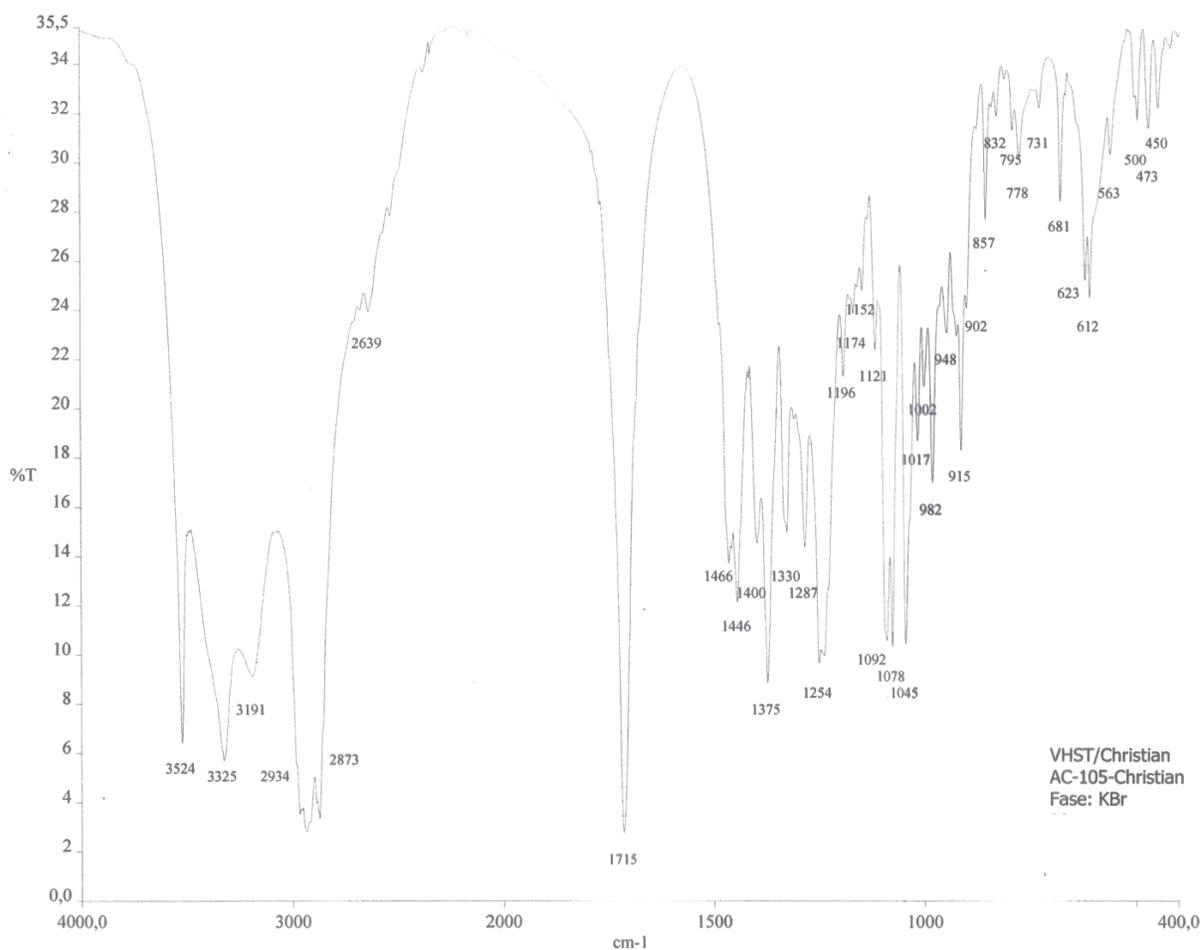


Figura A.1 Espectro IR del ácido cólico.

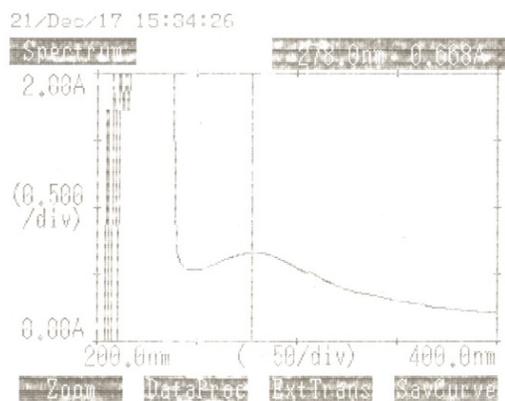


Figura A.2 Barrido UV del producto 24.

Cuadro A.1 Pruebas de solubilidad – cristalización para los distintos crudos a partir de **24**

Disolvente	Método de cristalización	Temp. crist. (°C)	Resultado
Acetona	No es muy soluble en caliente: dejar que se enfríe	Ambiente	Se evapora el disolvente y precipita
CH ₃ CN	Disolver en caliente, dejar enfriar	Ambiente	Se agrega.
CH ₃ CN:EtOH	Difusión	Ambiente	Polvo no cristalino en el fondo.
Dioxano: CH ₃ CN	Difusión de CH ₃ CN (con calor) en dioxano.	Ambiente	Se agrega.
Dioxano: hexano	Difusión hasta cambio ligero en turbidez.	Ambiente	Gelifica
Dioxano:tolueno	Difusión	Ambiente	Se agrega en la interfase.
Dioxano:hexano	Difusión	Ambiente	Precipita y se agrega.
Dioxano: EtOAc	Difusión	Ambiente	Se agrega.
DMF: H ₂ O	Difusión de agua en DMF	Ambiente	Se agrega.
DMSO	Disolución en volumen mínimo	Ambiente	Cristaliza al mes.
EtOH	Soluble en caliente y dejar que se enfríe.	Ambiente	Se agrega inmediatamente después de calentar
EtOH:CH ₃ CN	Difusión	Ambiente	Se precipita 2 días después.
iPrOH	Se calienta hasta disolver, luego se deja enfriar en el mismo baño de glicerina	Ambiente	Se precipita al evaporarse el disolvente.
MeOH	Disolver en caliente y dejar que se enfríe.	Ambiente	Precipita al evaporarse un poco de disolvente.
MeOH:Benceno	Difusión hasta cambio ligero en turbidez.	Ambiente	Precipita al evaporarse el disolvente.
MeOH: PrOH	Difusión hasta cambio ligero en turbidez.	Ambiente	Se agrega.
Tolueno:benceno	Difusión	Ambiente	Precipita y se agrega.

Cuadro A.2. Pruebas de solubilidad de **24** en ciclodextrinas

C _{tri} (M*10 ³)	C _{CD} (M*10 ³)	Ciclodextrina	Codisolvente	Resultado
0,5	20	α	No	Claro. Precipitado abundante.
0,34	10	β	No	Claro con precipitado.
1	10	β	MeOH 50%	Claro. Mucho precipitado

Cuadro A.2. Datos de prueba de solubilidad de **24** en ciclodextrinas (continuación)

C_{tri} ($M \cdot 10^3$)	C_{CD} ($M \cdot 10^3$)	Ciclodextrina	Codisolvente	Resultado
5	10	β	No	Bastante turbio.
1	10	β	DMSO 2%	Claro con precipitado.
1	10	β	DMSO 10%	Claro con poco precipitado.
1	10	β	DMSO 50%	Claro con muy poco precipitado.
0,34	30	γ	No	Turbio completamente.
0,5	25	γ	No	Turbio completamente.

Apéndice B. Datos intermedios.

Cuadro B.1 Datos necesarios para el cálculo de la concentración inicial de **24** utilizada en la preparación de los patrones de dilución de cada curva de calibración

Parámetro	% DMSO	
	10	15
m_0 (g*10 ³)	0,86	0,49
MM_{tri} (g/mol)	584,3367	584,3367
V_v (L)	0,025	0,025
fd	6/5	6/5

Cuadro B.2 Patrones de dilución empleados en la curva de calibración de **24** a partir de un 10% de DMSO en agua

n	A	C_{0n} (M*10 ⁵)
1	0,344	5,89
2	0,238	4,09
3	0,191	3,41
4	0,159	2,84
5	0,131	2,37
6	0,101	1,97
7	0,083	1,64
8	0,066	1,37
9	0,059	1,14

Cuadro B.3 Patrones de dilución empleados en la curva de calibración de **24** a partir de un 15% de DMSO en agua

n	A	C_{0n} (M*10 ⁵)
1	0,512	2,80
2	0,409	2,33
3	0,347	1,94
4	0,282	1,62
5	0,230	1,35
6	0,197	1,12
7	0,155	0,936
8	0,117	0,780
9	0,102	0,650

Cuadro B.4 Fuentes instrumentales de error en la medición de masa de la balanza analítica de cinco decimales (Adam Equipment Company, 2007).

Fuente de incertidumbre	Tolerancia	Valor de distribución	u (*10 ⁶)
Resolución	0,00001	$2\sqrt{3}$	2,89
Linealidad	0,0002	1,96	102
Repetibilidad	-	-	200

Cuadro B.5 Determinación de la incertidumbre de la micropipeta de 5000 μL

Fuente de incertidumbre	Tolerancia	Valor de distribución	u (*10 ⁴)
fd	$\pm 0,0015$	2	7,5

Cuadro B.6 Determinación de la incertidumbre de la masa molecular de 24

Fuente de incertidumbre	Tolerancia	Valor de distribución	u (g/mol*10 ⁵)
MM _{tri} (g/mol)	$\pm 0,0002$	$2\sqrt{3}$	5,77

Cuadro B.7 Fuentes instrumentales de error en la medición de absorbancia del espectrofotómetro UV-visible Shimadzu 1700-UV (Hayashi, 2001)

Fuente de incertidumbre	Tolerancia (A)	Valor de distribución	u (*10 ⁴)
A _{est}	0,001	$\sqrt{3}$	5,77
A _{lin}	$\pm 0,002$	2	10,0
A _{rui}	0,004	$\sqrt{3}$	23,1
A _{rep}	$\pm 0,002$	2	10,0

Cuadro B.8 Parámetros requeridos en la determinación de la incertidumbre del volumen de calibración a 20 °C (Omota et al., 2009).

Parámetro	% DMSO	
	10	15
ρ_{exp} (g/mL)	1,1016	1,1019
m_v (g)	27,42314	27,20534
V_v (mL*10 ³)	24,89473	24,89473
$\frac{\partial V_v}{\partial \rho_{\text{exp}}}$ (g)	-22,59944	-22,40466
$\frac{\partial V_v}{\partial m_v}$ (mL/g)	0	0
$u(\rho_{\text{exp}})$ (g/mL*10 ⁴)	1	1
$u(m_v)$ (g*10 ⁶)	5,86	5,86

Cuadro B.9 Varianza de la absorbancia asociada al error instrumental del espectrofotómetro UV para cada curva de calibración de 24

Parámetro	% DMSO	
	10	15
$s^2(A_{\text{esp}})$ (*10 ⁶)	7,67	7,67

Cuadro B.10 Parámetros requeridos en la determinación de la incertidumbre de la concentración de cada patrón en las curvas de calibración de **24**

Parámetro	% DMSO	
	10	15
$\frac{\partial C_{0n}}{\partial V_v}$	24,89473	24,89473
$\frac{\partial C_{0n}}{\partial MM_{tri}}$	-22,59944	-22,40466
$\frac{\partial C_{0n}}{\partial fd}$	0,90780	0,90749
$\frac{\partial C_{0n}}{\partial m_{0\ tri}}$	1	1
$u(V_v)$ (mL*10 ³)	2,26	2,24
$u(m_{0\ tri})$ (g*10 ⁶)	5,86	5,86

Cuadro B.11 Incertidumbre combinada de la concentración de cada patrón de calibración de **24**

n	$u(C_{0n})$ (M*10 ⁵)	
	10% DMSO	15% DMSO
1	8,53	8,46
2	7,11	7,05
3	5,92	5,87
4	4,93	4,89
5	4,11	4,08
6	3,43	3,40
7	2,86	2,83
8	2,38	2,36
9	1,98	1,97

Cuadro B.12 Varianza por muestra de absorbancia asociada al error instrumental para cada curva de calibración de **24**

n	$s^2(A_{conc})$ (*10 ²)		$s^2(A_t)$ (*10 ²)	
	10% DMSO	15% DMSO	10% DMSO	15% DMSO
1	24,8	239	24,8	239
2	17,1	4,97	17,1	4,97
3	11,0	3,75	11,0	3,75
4	7,63	2,36	7,63	2,36
5	5,17	1,57	5,17	1,57
6	3,09	1,16	3,09	1,16
7	2,09	7,17	2,09	7,17
8	1,31	4,06	1,32	4,06
9	1,05	3,10	1,05	3,10

Cuadro B.13 Matrices X y e generadas a partir del método WTLS en la determinación de los parámetros de regresión lineal para la curva de calibración de **24** en 10% y 15% DMSO

Matriz	% DMSO			
	10	15		
X	1	$5,89 \cdot 10^{-5}$	1	$2,80 \cdot 10^{-5}$
	1	$4,09 \cdot 10^{-5}$	1	$2,33 \cdot 10^{-5}$
	1	$3,41 \cdot 10^{-5}$	1	$1,94 \cdot 10^{-5}$
	1	$2,84 \cdot 10^{-5}$	1	$1,62 \cdot 10^{-5}$
	1	$2,37 \cdot 10^{-5}$	1	$1,35 \cdot 10^{-5}$
	1	$1,97 \cdot 10^{-5}$	1	$1,12 \cdot 10^{-5}$
	1	$1,64 \cdot 10^{-5}$	1	$0,94 \cdot 10^{-5}$
	1	$1,37 \cdot 10^{-5}$	1	$0,78 \cdot 10^{-5}$
	1	$1,14 \cdot 10^{-5}$	1	$0,65 \cdot 10^{-5}$
e		0,344		0,512
		0,238		0,409
		0,191		0,347
		0,159		0,282
		0,131		0,23
		0,101		0,197
		0,083		0,155
		0,066		0,117
		0,059		0,102

Cuadro B.14 Matriz Q generada a partir del método WTLS en la determinación de los parámetros de regresión lineal para las curvas de calibración de **24** en 10% DMSO

Valor Q									
4,03	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	5,85	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	9,09	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	13,1	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	19,4	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	32,4	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	47,9	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	76,0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	94,9	0

Cuadro B.15 Matriz Q generada a partir del método WTLS en la determinación de los parámetros de regresión lineal para las curvas de calibración de 24 en 15% DMSO

Valor Q									
0,418	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	2,01	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	2,80	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	4,23	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	6,38	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	8,66	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	14,0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	24,6	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	32,3

Cuadro B.16 Residuos de cada modelo respecto a los valores observados de calibración

n	Predichos		Residuos	
	10% DMSO	15% DMSO	10% DMSO	15% DMSO
1	0,341	0,506	0,00301	0,00589
2	0,233	0,417	0,00534	-0,00817
3	0,192	0,343	-0,00073	0,00363
4	0,157	0,283	0,00157	-0,00082
5	0,129	0,232	0,00186	-0,00172
6	0,105	0,188	-0,00407	0,00880
7	0,085	0,153	-0,00221	0,00162
8	0,069	0,124	-0,00296	-0,00686
9	0,055	0,099	0,00389	0,00274

Cuadro B.17 Datos generados en la prueba de normalidad Z para la curva de calibración al 10% DMSO

Residuos ordenados	a	Pr_a	Z
-0,00073	1	0,055556	-1,593219
-0,00407	2	0,166667	-0,967422
-0,00296	3	0,277778	-0,589456
-0,00221	4	0,388889	-0,282216
0,00157	5	0,500000	0,000000
0,00186	6	0,611111	0,282216
0,00301	7	0,722222	0,589456
0,00389	8	0,833333	0,967422
0,00534	9	0,944444	1,593219

Cuadro B.18 Datos generados en la prueba de normalidad Z para la curva de calibración al 15% DMSO

Residuos ordenados	a	Pr _a	Z
-0,00817	1	0,055556	-1,593219
-0,00686	2	0,166667	-0,967422
-0,00172	3	0,277778	-0,589456
-0,00082	4	0,388889	-0,282216
0,00162	5	0,500000	0,000000
0,00274	6	0,611111	0,282216
0,00363	7	0,722222	0,589456
0,00589	8	0,833333	0,967422
0,00880	9	0,944444	1,593219

Cuadro B.19 Datos de prueba para el diagrama de fases de **24** con β CD

n	A _{$\lambda_{\max}=277$ nm}	C _{βCD} (M*10 ⁴)	C _{tri} (M*10 ⁵)
1	0,503	8,83	2,78
2	0,596	17,7	3,78
3	0,700	26,5	3,82
4	0,809	35,3	4,40
5	0,927	44,1	5,02
6	1,066	53,0	5,76
7	1,265	61,8	6,81
8	1,464	70,6	7,86
9	1,665	79,4	8,92

Cuadro B.20 Datos de prueba para el diagrama de fases de **24** con HP- β CD

n	A _{$\lambda_{\max}=277$ nm}	C _{HP-βCD} (M*10 ⁴)	C _{tri} (M*10 ⁶)
1	0,077	9,43	5,32
2	0,098	18,9	6,43
3	0,208	28,3	12,2
4	0,263	37,7	15,2
5	0,352	47,2	19,9
6	0,557	56,6	30,7
7	0,820	75,5	44,6
8	0,841	84,9	45,7
9	0,968	94,3	52,4

Cuadro B.21 Coeficientes requeridos en la determinación de la incertidumbre de la concentración de **24** en el sistema triazina:βCD

n	$\frac{\partial C_{\text{tri}}}{\partial P_{\text{cal}}} (M^2 \cdot 10^9)$	$\frac{\partial C_{\text{tri}}}{\partial b_{\text{cal}}} (M \cdot 10^6)$
1	-1,47	-26,3
2	-1,73	-21,3
3	-2,02	-15,8
4	-2,32	-10,1
5	-2,66	-3,86
6	-3,04	3,49
7	-3,60	14,0
8	-4,15	24,5
9	-4,72	35,1

Cuadro B.22 Coeficientes requeridos en la determinación de la incertidumbre de la concentración de **24** en el sistema triazina:HP-βCD

n	$\frac{\partial C_{\text{tri}}}{\partial P_{\text{cal}}} (M^2 \cdot 10^{10})$	$\frac{\partial C_{\text{tri}}}{\partial b_{\text{cal}}} (M \cdot 10^6)$
1	-2,81	-48,8
2	-3,40	-47,7
3	-6,47	-41,8
4	-8,01	-38,9
5	-10,5	-34,2
6	-16,2	-23,4
7	-23,6	-9,51
8	-24,1	-8,40
9	-27,7	-1,69

Cuadro B.23 Parámetros adicionales requeridos en la determinación de la incertidumbre de la concentración de triazina en el sistema triazina:HP-βCD

Parámetro	Ciclodextrina	
	βCD	HP-βCD
$\frac{\partial C_{\text{tri}}}{\partial A} (M \cdot 10^5)$	5,41	5,41
P_{cal}	18923,27583	18923,27583
b_{cal}	-0,023740	-0,023740
$u(P_{\text{cal}})$	9,05	9,05
$u(b_{\text{cal}})$	887390,84	887390,84
$s^2(A_{\text{esp}}) (*10^6)$	7,67	7,67
$s^2(C_{\text{tri}}) (*10^1)$	4,66	16,1

Cuadro B.26 Matrices X y e generadas a partir del método WTLS en la determinación de los parámetros de regresión lineal de los diagramas de fases de cada complejo

Matriz	β CD						HP- β CD	
	Primer orden			Segundo orden			Primer orden	
X	1	$8,83 \cdot 10^{-4}$		1	$8,83 \cdot 10^{-4}$	$7,79 \cdot 10^{-7}$	1	$9,43 \cdot 10^{-4}$
	1	$1,77 \cdot 10^{-3}$		1	$1,77 \cdot 10^{-3}$	$3,12 \cdot 10^{-6}$	1	$1,89 \cdot 10^{-3}$
	1	$2,65 \cdot 10^{-3}$		1	$2,65 \cdot 10^{-3}$	$7,01 \cdot 10^{-6}$	1	$2,83 \cdot 10^{-3}$
	1	$3,53 \cdot 10^{-3}$		1	$3,53 \cdot 10^{-3}$	$1,25 \cdot 10^{-5}$	1	$3,77 \cdot 10^{-3}$
	1	$4,41 \cdot 10^{-3}$		1	$4,41 \cdot 10^{-3}$	$1,95 \cdot 10^{-5}$	1	$4,72 \cdot 10^{-3}$
	1	$5,30 \cdot 10^{-3}$		1	$5,30 \cdot 10^{-3}$	$2,80 \cdot 10^{-5}$	1	$5,66 \cdot 10^{-3}$
	1	$6,18 \cdot 10^{-3}$		1	$6,18 \cdot 10^{-3}$	$3,82 \cdot 10^{-5}$	1	$7,55 \cdot 10^{-3}$
	1	$7,06 \cdot 10^{-3}$		1	$7,06 \cdot 10^{-3}$	$4,99 \cdot 10^{-5}$	1	$8,49 \cdot 10^{-3}$
	1	$7,94 \cdot 10^{-3}$		1	$7,94 \cdot 10^{-3}$	$6,31 \cdot 10^{-5}$	1	$9,43 \cdot 10^{-3}$
e		$2,78 \cdot 10^{-5}$						$5,32 \cdot 10^{-6}$
		$3,78 \cdot 10^{-5}$						$6,43 \cdot 10^{-6}$
		$3,82 \cdot 10^{-5}$						$1,22 \cdot 10^{-5}$
		$4,40 \cdot 10^{-5}$						$1,52 \cdot 10^{-5}$
		$5,02 \cdot 10^{-5}$						$1,99 \cdot 10^{-5}$
		$5,76 \cdot 10^{-5}$						$3,07 \cdot 10^{-5}$
		$6,81 \cdot 10^{-5}$						$4,46 \cdot 10^{-5}$
		$7,86 \cdot 10^{-5}$						$4,57 \cdot 10^{-5}$
		$8,92 \cdot 10^{-5}$						$5,24 \cdot 10^{-5}$

Cuadro B.27 Suma de cuadrados de residuos del modelo de ajuste lineal respecto a los valores observados de C_{tri} en el sistema triazina:HP- β CD

n	$\epsilon_{al_i} (*10^7)$	$(\epsilon_{al_i} - \epsilon_{al_{i-1}})^2 (*10^{13})$	$\epsilon_{al_i}^2 (*10^{13})$
1	39,6	206	157
2	-5,73	0,284	3,28
3	-4,04	75,0	1,63
4	-31,4	8,87	98,7
5	-40,8	269	167
6	11,0	68,0	12,2
7	37,1	206	138
8	-8,22	11,4	6,75
9	2,45	-	0,600
Σ	-	844	585

Cuadro B.28 Suma de cuadrados de residuos del modelo de ajuste lineal respecto a los valores observados de C_{tri} en el sistema triazina: β CD

n	$\epsilon_{al_i} (*10^7)$	$(\epsilon_{al_i} - \epsilon_{al_{i-1}})^2 (*10^{13})$	$\epsilon_{al_i}^2 (*10^{13})$
1	42,0	72,6	176
2	15,1	44,6	22,7
3	-6,07	34,2	3,68
4	-24,6	18,9	60,3
5	-38,3	0,693	147
6	-40,9	84,5	167
7	-11,8	84,5	14,0
8	17,2	90,8	29,7
9	47,4	-	224
Σ	-	431	845

Cuadro B.29 Suma de cuadrados de residuos del modelo de ajuste de segundo orden respecto a los valores observados de C_{tri} en el sistema triazina: β CD

n	$\epsilon_{al_i} (*10^8)$	$(\epsilon_{al_i} - \epsilon_{al_{i-1}})^2 (*10^{14})$	$\epsilon_{al_i}^2 (*10^{14})$
1	-59,8	81,8	35,7
2	30,7	20,9	9,42
3	76,4	9,39	58,4
4	45,8	73,8	20,98
5	-40,1	60,4	16,08
6	-118	186	139
7	18,7	11,3	3,48
8	52,3	34,3	27,4
9	-6,21	-	0,386
Σ	-	478	311

Cuadro B.30 Datos generados en la verificación del supuesto de normalidad del modelo de regresión lineal del complejo triazina: β CD

Residuos ordenados ($M*10^7$)	a	Pr_a	Z
-40,9	1	0,0556	-1,593
-38,3	2	0,167	-0,967
-24,6	3	0,278	-0,589
-11,8	4	0,389	-0,282
-6,07	5	0,500	0,000
15,1	6	0,611	0,282
17,2	7	0,722	0,589
42,0	8	0,833	0,967
47,4	9	0,944	1,593

Cuadro B.31 Datos generados en la verificación del supuesto de normalidad del modelo de regresión lineal del complejo triazina:HP- β CD

Residuos ordenados ($M \cdot 10^7$)	a	Pr_a	Z
-4,08	1	0,0556	-1,593
-3,14	2	0,167	-0,967
-8,22	3	0,278	-0,589
-5,73	4	0,389	-0,282
-4,04	5	0,500	0,000
2,45	6	0,611	0,282
11,0	7	0,722	0,589
37,1	8	0,833	0,967
39,6	9	0,944	1,593

Cuadro B.32 Datos generados en la verificación del supuesto de normalidad del modelo de regresión de segundo orden del complejo triazina: β CD

Residuos ordenados ($M \cdot 10^7$)	a	Pr_a	Z
-11,8	1	0,0556	-1,593
-5,98	2	0,167	-0,967
-4,01	3	0,278	-0,589
-0,621	4	0,389	-0,282
1,87	5	0,500	0,000
3,07	6	0,611	0,282
4,58	7	0,722	0,589
5,23	8	0,833	0,967
7,64	9	0,944	1,593

Apéndice C. Muestra de Cálculo.

C.1 Cálculo de las concentraciones para la curva de calibración de 24 mediante el método de dilución extracción

Primero, se preparó una disolución madre a partir del patrón primario 24 pesado en un balón aforado con una balanza analítica. El cálculo de las n-1 diluciones involucra el factor de dilución correspondiente tal como se detalla en la siguiente ecuación:

$$C_{0n} = \frac{m_{0\text{ tri}}}{MM_{\text{tri}} * V_v} * [\text{fd}]^{n-1} \quad (\text{C.1})$$

Para la determinación de los parámetros de regresión de la curva de calibración de 24 a partir de una disolución al 10% DMSO, se utilizan los datos del Cuadro B.1, columna 2, filas 3,4 y 5. Cada concentración se encuentra tabulada en el Cuadro B.2, columna 3, filas 2 a 10.

En el caso de la curva de calibración de 24 a partir de un 15% DMSO, se utilizan los datos del Cuadro B.1, columna 3, filas 3,4 y 5 que se sustituyen en la ecuación C.1 y sus resultados se encuentran tabulados en el Cuadro B.3, columna 3, filas 2 a 10.

C.2 Cálculo de la incertidumbre por resolución de la masa medida de 24 en un matraz aforado de 25 mL mediante una balanza analítica ADAM PW 254

La incertidumbre por resolución de la masa medida de 24 en la balanza analítica se determina a partir de la siguiente relación:

$$u(\text{Res}) = \frac{0,00001\text{ g}}{2\sqrt{3}} \quad (\text{C.2})$$

Se utilizan los datos del Cuadro B.4, columnas 2 y 3, fila 2 que constituyen la ecuación C.2 y su resultado se encuentra tabulado en el Cuadro B.4, columna 4, fila 2.

C.3 Cálculo de la incertidumbre por linealidad de la masa medida de 24 en un matraz aforado de 25 mL mediante una balanza analítica ADAM PW 254

La incertidumbre por resolución de la masa medida de 24 en la balanza analítica se determina a partir de la siguiente relación:

$$u(\text{Lin}) = \frac{0,0002 \text{ g}}{1,96} \quad (\text{C.3})$$

Se utilizan los datos del Cuadro B.4, columnas 2 y 3, fila 3 que constituyen la ecuación C.3 y su resultado se encuentra tabulado en el Cuadro B.4, columna 4, fila 3.

C.4 Cálculo de la incertidumbre de la masa medida de 24 en un matraz aforado de 25 mL mediante la balanza analítica previamente indicada

La incertidumbre de la masa medida de 24 en la balanza analítica se determina a partir de la siguiente relación:

$$u(m_{0 \text{ tri}}) = \sqrt{u(\text{Res})^2 + u(\text{Lin})^2 + u(\text{Rep})^2} \quad (\text{C.4})$$

Se utilizan los datos del Cuadro B.4, columna 4, filas 2, 3 y 4 en la ecuación C.4 y su resultado se encuentra tabulado en el Cuadro B.10, columnas 2 y 3, fila 8.

C.5 Cálculo de la incertidumbre por corrección del efecto boyante de la masa medida al aforar un matraz de 25 mL mediante una balanza analítica

La incertidumbre de la masa medida de 24 en la balanza analítica se determina a partir de la siguiente ecuación:

$$u(m_v) = \sqrt{u(\text{Res})^2 + u(\text{Lin})^2 + u(\text{Rep})^2} \quad (\text{C.5})$$

Se utilizan los datos del Cuadro B.4, columna 4, filas 2, 3 y 4 en la ecuación C.5 y su resultado se tabula en el Cuadro B.8, columnas 2 y 3, fila 9.

C.6 Cálculo de la densidad de la disolución inicial de DMSO:H₂O para cada curva de calibración de 24 mediante interpolación lineal

La densidad de cada disolución inicial de DMSO:H₂O para cada curva de calibración se calcula a 20 °C a partir de la ecuación siguiente:

$$\rho_{exp} = \frac{(1,1015 \frac{g}{mL} - 1,1021 \frac{g}{mL})}{(0,0915 - 0,1713)} (x_{exp} - 0,1713) - 1,1021 \frac{g}{mL} \quad (C.6)$$

Se utilizan los datos del Cuadro B.8, columnas 2 y 3, fila 2 en la ecuación C.6 y sus resultados se tabulan en el Cuadro B.8, columnas 2 y 3, fila 3.

C.7 Cálculo de la incertidumbre de la densidad de la disolución DMSO:H₂O para cada curva de calibración de 24

La incertidumbre de la densidad de la disolución inicial DMSO:H₂O a la composición deseada se determina a partir de la siguiente ecuación:

$$u(\rho_{exp}) = \frac{\pm 0,0002 \text{ g/mL}}{2} \quad (C.7)$$

Los resultados correspondientes a cada composición se tabulan en el Cuadro B.8, columnas 2 y 3, fila 8.

C.8 Cálculo por calibración del volumen medido de 24 en balón aforado

La calibración del volumen asociada al aforo de la disolución patrón primario de 24 en el balón aforado de 25 mL se determina a partir de las siguientes relaciones:

$$u(V_v) = \sqrt{\left(\frac{\partial V_v}{\partial \rho_{exp}} * u(\rho_{exp})\right)^2 + \left(\frac{\partial V_v}{\partial m_v} * u(m_v)\right)^2} \quad (C.8)$$

$$\frac{\partial V_v}{\partial \rho_{exp}} = \frac{-m_v}{\rho_{exp}^2} \quad (C.9)$$

$$\frac{\partial V_v}{\partial m_v} = 0 \quad (C.10)$$

Se utilizan los datos del Cuadro B.8, columnas 2 y 3, filas 3 a 9 en las ecuaciones C.8, C.9 y C.10. Sus resultados se tabulan en el Cuadro B.10, columnas 2 y 3, fila 7.

C.9 Cálculo de la incertidumbre asociada a la determinación de la masa molecular de 24 medida en el detector del cromatógrafo de gases acoplado a masas del CIPRONA

La incertidumbre del pico M^+ correspondiente a 24 y medido en el detector del cromatógrafo de gases acoplado a masas del CIPRONA se determina a partir de la siguiente relación:

$$u(MM_{tri}) = \frac{0,0002}{2\sqrt{3}} \quad (C.11)$$

Se utilizan los datos del Cuadro B.6, columnas 2 y 3, fila 2 en la ecuación C.11 y su resultado se tabula en el Cuadro B.6, columna 4, fila 2.

C.10 Cálculo de la incertidumbre de la micropipeta de 5000 μ L asociada al factor de dilución de 24 en la preparación de cada patrón de calibración

Cada incertidumbre corresponde al factor de dilución de cada patrón de 24 preparado mediante el método de dilución-extracción. Esta incertidumbre se determina a partir de la siguiente relación:

$$u(fd) = \frac{\pm 0,0015}{2} \quad (C.12)$$

Se utilizan los datos del Cuadro B.5, columnas 2 y 3, fila 2 en la ecuación C.12 y su resultado se tabula en el Cuadro B.6, columna 4, fila 2.

C.11 Cálculo de la incertidumbre de cada patrón de calibración de 24

Cada incertidumbre corresponde a un patrón n de cada curva de calibración de 24. Esta incertidumbre se determina a partir de la siguiente relación:

$$u(C_{0n}) = \sqrt{\left(\frac{\partial C_{0n}}{\partial V_v} * u(V_v)\right)^2 + \left(\frac{\partial C_{0n}}{\partial MM_{tri}} * u(MM_{tri})\right)^2 + \left(\frac{\partial C_{0n}}{\partial fd} * u(fd)\right)^2 + \left(\frac{\partial C_{0n}}{\partial m_{0\ tri}} * u(m_{0\ tri})\right)^2} \quad (C.13)$$

Se sustituyen las siguientes ecuaciones en C.13 y se utilizan los datos del Cuadro B.1, columnas 2 y 3, filas 3 a 6. Además, se utilizan los datos de los Cuadros B.5 y B.6, columna 4, fila 2 y del Cuadro B.10, columnas 2 y 3, filas 7 y 8.

$$\frac{\partial C_{0n}}{\partial V_v} = \frac{-m_{0\text{ tri}}}{V_v^2 (MM_{\text{tri}} * fd^{n-1})} \quad (\text{C.14})$$

$$\frac{\partial C_{0n}}{\partial MM_{\text{tri}}} = \frac{-m_{0\text{ tri}}}{fd^{n-1} (MM_{\text{tri}}^2 * V_v)} \quad (\text{C.15})$$

$$\frac{\partial C_{0n}}{\partial fd} = \frac{(1-n)m_{0\text{ tri}}}{fd^n (MM_{\text{tri}} * V_v)} \quad (\text{C.16})$$

$$\frac{\partial C_{0n}}{\partial m_{0\text{ tri}}} = \frac{1}{fd^{n-1} (MM_{\text{tri}} * V_v)} \quad (\text{C.17})$$

Los resultados obtenidos se tabulan en el Cuadro B.11, columnas 2 y 3, filas 3 a 11.

C.12 Determinación de la incertidumbre estándar en la medición de absorbancia asociada a la concentración de cada patrón en cada curva calibración de 24

Para determinar la incertidumbre estándar de la absorbancia asociada a la concentración de cada patrón en cada curva calibración de 24 se utiliza la siguiente ecuación:

$$u(A_{\text{conc}}) = A_{\text{conc}} * \frac{u(C_{0n})}{C_{0n}} \quad (\text{C.18})$$

En la ecuación C.18 se utilizaron los datos del Cuadro B.12, columnas 2 a 5, filas 3 a 11. Además, se emplean los datos de los Cuadros B.2 y B.3, columnas 2 y 3 y filas 2 a 10. Los resultados se tabulan en el Cuadro B.12, columnas 2 y 3, filas 3 a 11.

C.13. Determinación de la matriz de diseño del método WTLS

Para construir la matriz de diseño, se utiliza la definición 1.13 y los datos de los Cuadros B.2 y B.3, columna 3, filas 2 a 10 según la curva de calibración. Además, se utilizan los datos de los Cuadros B.19 y B.20, columna 2, filas 2 a 10 según el diagrama de fases.

Las matrices generadas se encuentran en el Cuadro B.13, columnas 2 y 3, fila 3 y en el Cuadro B.26, columnas 2, 3 y 4, fila 3.

C.14. Determinación de la matriz de observaciones del método WTLS

Para constituir la matriz de observaciones, se utiliza la definición 1.15 y los datos de los Cuadros B.2 y B.3, columna 2, filas 2 a 10 según la curva de calibración. Además, se utilizan los datos de los Cuadros B.19 y B.20, columna 3, filas 2 a 10 según el diagrama de fases.

Las matrices generadas se encuentran en el Cuadro B.13, columnas 2 y 3, fila 4 y en el Cuadro B.26, columnas 2 y 3, fila 4.

C.15. Determinación de la matriz inversa de la varianza de las observaciones en el método WTLS

Para conformar la matriz inversa de la varianza de las observaciones, se utiliza la definición 1.14 y los datos del Cuadro B.12, columnas 4 y 5, filas 3 a 11 de acuerdo a la curva de calibración. Además, se usan los datos del Cuadro B.12, columnas 4 y 5, filas 3 a 11 según el diagrama de fases.

Las matrices generadas se encuentran en los Cuadros B.14 y B.15, columna 1, fila 2 y en los Cuadros B.24 y B.25, columna 1, fila 2.

C.16. Determinación de los residuos de cada modelo de ajuste

Para determinar los residuos de cada modelo se utiliza la siguiente ecuación:

$$\epsilon_{rj} = Y_{oj} - Y_{aj} \quad (C.21)$$

Para cada modelo de calibración se utilizan los datos de los Cuadros B.2 y B.3, columna 2, fila 2 a 10 y del Cuadro B.16, columnas 2 y 3, filas 3 a 11. Sus resultados se tabulan en el Cuadro B.16, columnas 4 y 5, filas 3 a 11.

Respecto al modelo de ajuste para cada diagrama de fases, se utilizan los datos de los Cuadros B.19 y B.20, columna 4, fila 2 a 10 y del Cuadro B.28, columnas 2 y 3, filas 3 a 11. Sus resultados se tabulan en el Cuadro B.28, columnas 4 y 5, filas 3 a 11.

C.17 Determinación del valor normal Z

Para determinar el valor normal Z en cada modelo se utiliza la siguiente ecuación C.22 y la función DISTR.NORM.ESTAND.INV de Microsoft® Excel:

$$Pr_j = \frac{j-1/2}{n} \quad (C.22)$$

En el caso del modelo de ajuste para la curva de calibración al 15% DMSO, se utilizan los datos del Cuadro B.17, columna 2, filas 2 a 10 en la ecuación C.22 y sus resultados se tabulan en el Cuadro B.17, columna 3, filas 2 a 10. Estos resultados de probabilidad acumulada se evalúan en la función descrita de la hoja de cálculo y sus resultados se obtienen en el Cuadro B.17, columna 4, filas 2 a 10.

En el caso de los modelos de ajuste para cada diagrama de fases, se utilizan los datos de los Cuadros B.30, B.31 y B.32, columna 2, filas 2 a 10 en la ecuación C.28 y sus resultados se tabulan en los Cuadros B.30, B.31 y B.32, columna 3, filas 2 a 10. Estos resultados de probabilidad acumulada se evalúan en la función descrita de la hoja de cálculo y sus resultados se obtienen en los Cuadros B.30, B.31 y B.32, columna 4, filas 2 a 10.

C.18 Cálculo de la concentración de 24 presente en cada patrón triazina:ciclodextrina

Cada valor de concentración de 24 corresponde a un patrón n en la formación del complejo triazina:ciclodextrina. Esta concentración se determina a partir de la siguiente relación:

$$C_{\text{tri}} = \frac{A - b_{\text{cal}}}{P_{\text{cal}}} \quad (\text{C.23})$$

Se utilizan los datos de los Cuadros B.19 y B20, columna 2, filas 2 a 10. Además, se utilizan los datos de los Cuadros B.23, columna 2 y 3, filas 4 y 5. Los resultados se tabulan en los Cuadros B.19 y B20, columna 4, filas 2 a 10.

C.19 Cálculo de la varianza de la concentración de 24 presente en cada patrón triazina:ciclodextrina

Cada incertidumbre determinada corresponde a un patrón n en la formación del complejo triazina:ciclodextrina. Esta incertidumbre se determina a partir de la siguiente relación:

$$s^2(C_{\text{tri}}) = \left(\frac{\partial C_{\text{tri}}}{\partial b_{\text{cal}}} * u(b_{\text{cal}}) \right)^2 + \left(\frac{\partial C_{\text{tri}}}{\partial P_{\text{cal}}} * u(P_{\text{cal}}) \right)^2 + \left(\frac{\partial C_{\text{tri}}}{\partial A} \right)^2 * s^2(A) \quad (\text{C.24})$$

Se sustituyen las siguientes ecuaciones en C.23 y se utilizan los datos de los Cuadros B.21 y B22, columnas 2 y 3, filas 2 a 10. Además, se utilizan los datos de los Cuadros B.19 y B.20, columna 2, filas 2 a 10 y del Cuadro B.23, columnas 2 y 3, filas 3 a 6.

$$\frac{\partial C_{\text{tri}}}{\partial b_{\text{cal}}} = \frac{A_{\text{esp}} - 1}{P_{\text{cal}}} \quad (\text{C.24})$$

$$\frac{\partial C_{\text{tri}}}{\partial P_{\text{cal}}} = \frac{b_{\text{cal}} - A_{\text{esp}}}{P_{\text{cal}}^2} \quad (\text{C.25})$$

$$\frac{\partial C_{\text{tri}}}{\partial A_{\text{esp}}} = \frac{1 - b_{\text{cal}}}{P_{\text{cal}}} \quad (\text{C.26})$$

Los resultados obtenidos se tabulan en el Cuadro B.23, columnas 2 y 3, fila 7.

Apéndice D. Procedimiento experimental

D.1 Procedimiento de síntesis de 12

En un balón de fondo redondo se colocaron 25 mmol (3.185 g) de 14, 27.5 mmol (2.31 g) de 15, 25 mmol (2.5 mL) de HCl como catalítico y 17.5 mL de etanol absoluto como disolvente. La mezcla se agita con reflujo durante 4 h. Se enfría con hielo, para acelerar el proceso de cristalización y la formación de nuevos núcleos. Al lavar con EtOH frío, se remueven las impurezas superficiales y al secar en una estufa de vacío se obtiene un polvo puro blanco cristalino.

Se caracteriza la identidad química de los productos 12 mediante resonancia magnética nuclear de una y dos dimensiones, infrarrojo, espectrometría de masas en el CIPRONA y la determinación del punto de fusión. Se utilizó DMSO- d_6 como disolvente deuterado para el análisis por resonancia magnética nuclear.

D.2 Procedimiento de síntesis de 24

La DMF se purifica mediante un equipo de destilación con vacío y se seca con tamices moleculares a 200 °C en una atmósfera inerte a base de nitrógeno. El metanol se seca mediante reflujo con cintas de magnesio.

En un balón de fondo redondo se añaden 2 mmol (0.5 g) de clorhidrato de *p*-clorofenilbiguanida en 2.3 mL de DMF seca y 0.5 mL de tri-*n*-butilamina (Bu₃N). En otro balón se agregan 2 mmol (810 mg) de ácido cólico, 1.2 mL de DMF seca, 0.6 mL de tri-*n*-butilamina (Bu₃N).

Se agita hasta disolución completa, se enfría la mezcla entre 8-10 °C y se añaden 0.2 mL de cloroformiato de etilo. A los 5 minutos se debe agregar el contenido del otro balón y se continúa la agitación por unos 5 minutos a temperatura ambiente y durante 1 hora a 70 – 75 °C. Se deja enfriar y se añade agua con el fin de precipitar el crudo de reacción y se transfiere la pasta a un embudo Buchner que se lava abundantemente con agua a pH 6.0 a 6.5, para remover en lo posible el contenido de DMF. El sólido remanente se seca a baja temperatura en una estufa de vacío durante 2 días empleando pentóxido de difósforo. Una vez seco, se

preparó una cabeza a base de sílica gel de 60 Å: este tipo de sílica se añade al crudo de reacción disuelto en metanol, se evapora parcialmente el disolvente mediante un rotavapor y se completa mediante la aplicación de mayor vacío con una bomba de aceite. Esta cabeza se agrega en la sección superior de una columna de cromatografía ya empacada con Sílica gel de 60 Å y se realiza una primera separación mediante la técnica de cromatografía en columna empleando una columna cromatográfica de 4 cm de diámetro, una relación en masa del crudo a purificar de 10 veces la masa de sílica en la cabeza de la columna y 40 veces la masa de sílica empacada en la columna. Se emplea una mezcla de elución 1:6 MeOH:CHCl₃.

El seguimiento de la formación de los productos y el control de las fracciones en el proceso de purificación, se realizó por cromatografía de capa fina, utilizando folios de aluminio con sílica gel 60 F₂₅₄ con revelador ultravioleta, marca Merck. Como reveladores se emplearon la disolución etanólica de ácido fosfomolibdico, ninhidrina en etanol y una lámpara ultravioleta de longitud de onda corta.

Se caracteriza la identidad química de los productos 24 mediante resonancia magnética nuclear de una y dos dimensiones, infrarrojo y espectrometría de masas en el CIPRONA. Se utilizó DMSO-*d*₆ como disolvente deuterado para el análisis por resonancia magnética nuclear.

D.3 Procedimiento de preparación de las curvas de calibración de 24

Para trazar la curva de calibración, se pesan 0.86 mg de 24 en un balón de 25 mL y se añade DMSO en la concentración de cosolvente asignada. Debido a la limitación de cantidad de 24 disponible, se tantea la cantidad necesaria de DMSO para su disolución y se alterna la colocación de disolvente con cosolvente en el balón hasta completar el volumen a un 10% o 15% de DMSO para cada caso. Se realiza el método de adición-extracción en 9 viales y se mantiene un factor de dilución de 6/5 en el balón de 25 mL. Se determina la absorbancia a una longitud de onda de absorción máxima de 278 nm de cada vial con una concentración conocida de 24,

D.4 Formación de los complejos de inclusión de **24** con β -ciclodextrinas

Se pesan 2.0 mg del derivado **24** en un vial de vidrio con capacidad para 10 mL. Cada vial se llena con una disolución de ciclodextrina previamente preparada: se pesa 0,5091 g de β -CD (o 0,6509 g de HP- β -CD) en un balón aforado de 50 mL. Se utiliza el siguiente patrón de diluciones para cada vial:

Cuadro D.1 Patrón de diluciones para la prueba de Higuchi Connors de **24** con cada ciclodextrina

Número de muestra	V _{CD} (L * 10 ⁶)	V _{H₂O} MilliQ (L * 10 ⁶)
1	500	4500
2	1000	4000
3	1500	3500
4	2000	3000
5	2500	2500
6	3000	2000
7	3500	1500
8	4000	1000
9	4500	500

Los viales se tapan y se sellan con parafilm y se colocan en un recipiente con un nivel de agua que los cubra hasta media altura. Cada vial se agita con una pastilla magnética a 1100 rpm, durante 3 días y a una temperatura controlada de 25 °C. Al terminar el período, se filtra el sólido remanente en cada vial a través de un filtro de 0,45 μ m con jeringa. Se mide la absorbancia de cada disolución clarificada y se obtiene la concentración de triazina mediante el modelo de ajuste de la curva de calibración de **24**. Se grafica la concentración de triazina respecto a la concentración de ciclodextrina.

Apéndice E. Nomenclatura.

Símbolo	Significado	Unidades
A	Absorbancia	Adimensional
C	Concentración de analito	M
H	Peso asignado	Variable
<i>H</i>	Hipótesis	Adimensional
I	Intensidad	Adimensional
K	Constante de equilibrio de primer orden	Adimensional
L	Concentración molar del ligando disuelto	M
MM	Masa molecular	g/mol
P	Pendiente	Variable
Pr	Probabilidad acumulada	Adimensional
Q	Matriz inversa de la covarianza del vector e	Variable
S	Concentración molar de soluto disuelto	M
X	Matriz de diseño	Variable
Y	Variable observada	Variable
Z	Calificación normal	Adimensional
a	Rango	Adimensional
b	Intercepto	Variable
d	Estadístico de prueba Durbin-Watson	Adimensional
e	Vector columna de componentes Y_o .	Variable
fd	Factor de dilución	Adimensional
l	Ancho de la celda	m
m	Masa	Kg

s	Desviación estándar de la muestra.	Variable
v	Grados de libertad	Adimensional
x	Composición	Adimensional
ϵ	Error	Variable
μ	Promedio	Variable
χ	Distribución Chi	Adimensional

Subíndice

0	Se refiere a un valor inicial.
a	Se refiere al valor ajustado al modelo.
al	Se refiere al error aleatorio.
CD	Se refiere a una ciclodextrina.
cal	Se refiere a la calibración.
calc	Se refiere al valor calculado
conc	Se refiere a la concentración
esp	Se refiere al espectrofotómetro
est	Se refiere a estabilidad de la línea base.
exp	Se refiere al valor experimental calculado.
m	Se refiere al coeficiente estequiométrico del soluto.
n	Se refiere al coeficiente estequiométrico del ligando.
i	Se refiere al número de fila.
j	Se refiere al número de columna/observación.
L	Se refiere al límite inferior
lin	Se refiere a linealidad de la línea base.
o	Se refiere al valor experimental observado.
rep	Se refiere a repetibilidad a 1 UA.
rui	Se refiere a nivel de ruido.
t	Se refiere al total.
teo	Se refiere al valor teórico.
tri	Se refiere a la triazina 24 .

U	Se refiere al límite superior
v	Se refiere al vacío.
x	Se refiere a la variable independiente.
y	Se refiere a la variable observada.

Superíndice

n	Número de muestra calculada/observada
---	---------------------------------------

Anexo A

Table A-1
Models with an intercept (from Savin and White)

Durbin-Watson Statistic: 1 Per Cent Significance Points of dL and dU

n	k*=1		k*=2		k*=3		k*=4		k*=5		k*=6		k*=7		k*=8		k*=9		k*=10	
	dL	dU																		
6	0.390	1.142	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
7	0.435	1.036	0.294	1.676	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
8	0.497	1.003	0.345	1.489	0.229	2.102	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
9	0.554	0.998	0.408	1.389	0.279	1.875	0.183	2.433	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
10	0.604	1.001	0.466	1.333	0.340	1.733	0.230	2.193	0.150	2.690	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
11	0.653	1.010	0.519	1.297	0.396	1.640	0.286	2.030	0.193	2.453	0.124	2.892	----	----	----	----	----	----	----	----
12	0.697	1.023	0.569	1.274	0.449	1.575	0.339	1.913	0.244	2.280	0.164	2.665	0.105	3.053	----	----	----	----	----	----
13	0.738	1.038	0.616	1.261	0.499	1.526	0.391	1.826	0.294	2.150	0.211	2.490	0.140	2.838	0.090	3.182	----	----	----	----
14	0.776	1.054	0.660	1.254	0.547	1.490	0.441	1.757	0.343	2.049	0.257	2.354	0.183	2.667	0.122	2.981	0.078	3.287	----	----
15	0.811	1.070	0.700	1.252	0.591	1.465	0.487	1.705	0.390	1.967	0.303	2.244	0.226	2.530	0.161	2.817	0.107	3.101	0.068	3.374
16	0.844	1.086	0.738	1.253	0.633	1.447	0.532	1.664	0.437	1.901	0.349	2.153	0.269	2.416	0.200	2.681	0.142	2.944	0.094	3.201
17	0.873	1.102	0.773	1.255	0.672	1.432	0.574	1.631	0.481	1.847	0.393	2.078	0.313	2.319	0.241	2.566	0.179	2.811	0.127	3.053
18	0.902	1.118	0.805	1.259	0.708	1.422	0.614	1.604	0.522	1.803	0.435	2.015	0.355	2.238	0.282	2.467	0.216	2.697	0.160	2.925
19	0.928	1.133	0.835	1.264	0.742	1.416	0.650	1.583	0.561	1.767	0.476	1.963	0.396	2.169	0.322	2.381	0.255	2.597	0.196	2.813
20	0.952	1.147	0.862	1.270	0.774	1.410	0.684	1.567	0.598	1.736	0.515	1.918	0.436	2.110	0.362	2.308	0.294	2.510	0.232	2.174
21	0.975	1.161	0.889	1.276	0.803	1.408	0.718	1.554	0.634	1.712	0.552	1.881	0.474	2.059	0.400	2.244	0.331	2.434	0.268	2.625
22	0.997	1.174	0.915	1.284	0.832	1.407	0.748	1.543	0.666	1.691	0.587	1.849	0.510	2.015	0.437	2.188	0.368	2.367	0.304	2.548
23	1.017	1.186	0.938	1.290	0.858	1.407	0.777	1.535	0.699	1.674	0.620	1.821	0.545	1.977	0.473	2.140	0.404	2.308	0.340	2.479
24	1.037	1.199	0.959	1.298	0.881	1.407	0.805	1.527	0.728	1.659	0.652	1.797	0.578	1.944	0.507	2.097	0.439	2.255	0.375	2.417
25	1.055	1.210	0.981	1.305	0.906	1.408	0.832	1.521	0.756	1.645	0.682	1.776	0.610	1.915	0.540	2.059	0.473	2.209	0.409	2.362
26	1.072	1.222	1.000	1.311	0.928	1.410	0.855	1.517	0.784	1.635	0.711	1.759	0.640	1.889	0.572	2.026	0.505	2.168	0.441	2.313
27	1.088	1.232	1.019	1.318	0.948	1.413	0.878	1.514	0.808	1.625	0.738	1.743	0.669	1.867	0.602	1.997	0.536	2.131	0.473	2.269
28	1.104	1.244	1.036	1.325	0.969	1.414	0.901	1.512	0.832	1.618	0.764	1.729	0.696	1.847	0.630	1.970	0.566	2.098	0.504	2.229
29	1.119	1.254	1.053	1.332	0.988	1.418	0.921	1.511	0.855	1.611	0.788	1.718	0.723	1.830	0.658	1.947	0.595	2.068	0.533	2.193
30	1.134	1.264	1.070	1.339	1.006	1.421	0.941	1.510	0.877	1.606	0.812	1.707	0.748	1.814	0.684	1.925	0.622	2.041	0.562	2.160
31	1.147	1.274	1.085	1.345	1.022	1.425	0.960	1.509	0.897	1.601	0.834	1.698	0.772	1.800	0.710	1.906	0.649	2.017	0.589	2.131
32	1.160	1.283	1.100	1.351	1.039	1.428	0.978	1.509	0.917	1.597	0.856	1.690	0.794	1.788	0.734	1.889	0.674	1.995	0.615	2.104
33	1.171	1.291	1.114	1.358	1.055	1.432	0.995	1.510	0.935	1.594	0.876	1.683	0.816	1.776	0.757	1.874	0.698	1.975	0.641	2.080
34	1.184	1.298	1.128	1.364	1.070	1.436	1.012	1.511	0.954	1.591	0.896	1.677	0.837	1.766	0.779	1.860	0.722	1.957	0.665	2.057
35	1.195	1.307	1.141	1.370	1.085	1.439	1.028	1.512	0.971	1.589	0.914	1.671	0.857	1.757	0.800	1.847	0.744	1.940	0.689	2.037
36	1.205	1.315	1.153	1.376	1.098	1.442	1.043	1.513	0.987	1.587	0.932	1.666	0.877	1.749	0.821	1.836	0.766	1.925	0.711	2.018
37	1.217	1.322	1.164	1.383	1.112	1.446	1.058	1.514	1.004	1.585	0.950	1.662	0.895	1.742	0.841	1.825	0.787	1.911	0.733	2.001
38	1.227	1.330	1.176	1.388	1.124	1.449	1.072	1.515	1.019	1.584	0.966	1.658	0.913	1.735	0.860	1.816	0.807	1.899	0.754	1.985
39	1.237	1.337	1.187	1.392	1.137	1.452	1.085	1.517	1.033	1.583	0.982	1.655	0.930	1.729	0.878	1.807	0.826	1.887	0.774	1.970
40	1.246	1.344	1.197	1.398	1.149	1.456	1.098	1.518	1.047	1.583	0.997	1.652	0.946	1.724	0.895	1.799	0.844	1.876	0.749	1.956
45	1.288	1.376	1.245	1.424	1.201	1.474	1.156	1.528	1.111	1.583	1.065	1.643	1.019	1.704	0.974	1.768	0.927	1.834	0.881	1.902
50	1.324	1.403	1.285	1.445	1.245	1.491	1.206	1.537	1.164	1.587	1.123	1.639	1.081	1.692	1.039	1.748	0.997	1.805	0.955	1.864
55	1.356	1.428	1.320	1.466	1.284	1.505	1.246	1.548	1.209	1.592	1.172	1.638	1.134	1.685	1.095	1.734	1.057	1.785	1.018	1.837
60	1.382	1.449	1.351	1.484	1.317	1.520	1.283	1.559	1.248	1.598	1.214	1.639	1.179	1.682	1.144	1.726	1.108	1.771	1.072	1.817
65	1.407	1.467	1.377	1.500	1.346	1.534	1.314	1.568	1.283	1.604	1.251	1.642	1.218	1.680	1.186	1.720	1.153	1.761	1.120	1.802
70	1.429	1.485	1.400	1.514	1.372	1.546	1.343	1.577	1.313	1.611	1.283	1.645	1.253	1.680	1.223	1.716	1.192	1.754	1.162	1.792
75	1.448	1.501	1.422	1.529	1.395	1.557	1.368	1.586	1.340	1.617	1.313	1.649	1.284	1.682	1.256	1.714	1.227	1.748	1.199	1.783
80	1.465	1.514	1.440	1.541	1.416	1.568	1.390	1.595	1.364	1.624	1.338	1.653	1.312	1.683	1.285	1.714	1.259	1.745	1.232	1.777
85	1.481	1.529	1.458	1.553	1.434	1.577	1.411	1.603	1.386	1.630	1.362	1.657	1.337	1.685	1.312	1.714	1.287	1.743	1.262	1.773
90	1.496	1.541	1.474	1.563	1.452	1.587	1.429	1.611	1.406	1.636	1.383	1.661	1.360	1.687	1.336	1.714	1.312	1.741	1.288	1.769
95	1.510	1.552	1.489	1.573	1.468	1.596	1.446	1.618	1.425	1.641	1.403	1.666	1.381	1.690	1.358	1.715	1.336	1.741	1.313	1.767
100	1.522	1.562	1.502	1.582	1.482	1.604	1.461	1.625	1.441	1.647	1.421	1.670	1.400	1.693	1.378	1.717	1.357	1.741	1.335	1.765
150	1.611	1.637	1.598	1.651	1.584	1.665	1.571	1.679	1.557	1.693	1.543	1.708	1.530	1.722	1.515	1.737	1.501	1.752	1.486	1.767
200	1.664	1.684	1.653	1.693	1.643	1.704	1.633	1.715	1.623	1.725	1.613	1.735	1.603	1.746	1.592	1.757	1.582	1.768	1.571	1.779

*k' is the number of regressors excluding the intercept

Durbin-Watson Significance Tables

n	k'=11		k'=12		k'=13		k'=14		k'=15		k'=16		k'=17		k'=18		k'=19		k'=20	
	dL	dU																		
16	0.060	3.446	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
17	0.084	3.286	0.053	3.506	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
18	0.113	3.146	0.075	3.358	0.047	3.557	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
19	0.145	3.023	0.102	3.227	0.067	3.420	0.043	3.601	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
20	0.178	2.914	0.131	3.109	0.092	3.297	0.061	3.474	0.038	3.639	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
21	0.212	2.817	0.162	3.004	0.119	3.185	0.084	3.358	0.055	3.521	0.035	3.671	----	----	----	----	----	----	----	----
22	0.246	2.729	0.194	2.909	0.148	3.084	0.109	3.252	0.077	3.412	0.050	3.562	0.032	3.700	----	----	----	----	----	----
23	0.281	2.651	0.227	2.822	0.178	2.991	0.136	3.155	0.100	3.311	0.070	3.459	0.046	3.597	0.029	3.725	----	----	----	----
24	0.315	2.580	0.260	2.744	0.209	2.906	0.165	3.065	0.125	3.218	0.092	3.363	0.065	3.501	0.043	3.629	0.027	3.747	----	----
25	0.348	2.517	0.292	2.674	0.240	2.829	0.194	2.982	0.152	3.131	0.116	3.274	0.085	3.410	0.060	3.538	0.039	3.657	0.025	3.766
26	0.381	2.460	0.324	2.610	0.272	2.758	0.224	2.906	0.180	3.050	0.141	3.191	0.107	3.325	0.079	3.452	0.055	3.572	0.036	3.682
27	0.413	2.409	0.356	2.552	0.303	2.694	0.253	2.836	0.208	2.976	0.167	3.113	0.131	3.245	0.100	3.371	0.073	3.490	0.051	3.602
28	0.444	2.363	0.387	2.499	0.333	2.635	0.283	2.772	0.237	2.907	0.194	3.040	0.156	3.169	0.122	3.294	0.093	3.412	0.068	3.524
29	0.474	2.321	0.417	2.451	0.363	2.582	0.313	2.713	0.266	2.843	0.222	2.972	0.182	3.098	0.146	3.220	0.114	3.338	0.087	3.450
30	0.503	2.283	0.447	2.407	0.393	2.533	0.342	2.659	0.294	2.785	0.249	2.909	0.208	3.032	0.171	3.152	0.137	3.267	0.107	3.379
31	0.531	2.248	0.475	2.367	0.422	2.487	0.371	2.609	0.322	2.730	0.277	2.851	0.234	2.970	0.193	3.087	0.160	3.201	0.128	3.311
32	0.558	2.216	0.503	2.330	0.450	2.446	0.399	2.563	0.350	2.680	0.304	2.797	0.261	2.912	0.221	3.026	0.184	3.137	0.151	3.246
33	0.585	2.187	0.530	2.296	0.477	2.408	0.426	2.520	0.377	2.633	0.331	2.746	0.287	2.858	0.246	2.969	0.209	3.078	0.174	3.184
34	0.610	2.160	0.556	2.266	0.503	2.373	0.452	2.481	0.404	2.590	0.357	2.699	0.313	2.808	0.272	2.915	0.233	3.022	0.197	3.126
35	0.634	2.136	0.581	2.237	0.529	2.340	0.478	2.444	0.430	2.550	0.383	2.655	0.339	2.761	0.297	2.865	0.257	2.969	0.221	3.071
36	0.658	2.113	0.605	2.210	0.554	2.310	0.504	2.410	0.455	2.512	0.409	2.614	0.364	2.717	0.322	2.818	0.282	2.919	0.244	3.019
37	0.680	2.092	0.628	2.186	0.578	2.282	0.528	2.379	0.480	2.477	0.434	2.576	0.389	2.675	0.347	2.774	0.306	2.872	0.268	2.969
38	0.702	2.073	0.651	2.164	0.601	2.256	0.552	2.350	0.504	2.445	0.458	2.540	0.414	2.637	0.371	2.733	0.330	2.828	0.291	2.923
39	0.723	2.055	0.673	2.143	0.623	2.232	0.575	2.323	0.528	2.414	0.482	2.507	0.438	2.600	0.395	2.694	0.354	2.787	0.315	2.879
40	0.744	2.039	0.694	2.123	0.645	2.210	0.597	2.297	0.551	2.386	0.505	2.476	0.461	2.566	0.418	2.657	0.377	2.748	0.338	2.838
45	0.835	1.972	0.790	2.044	0.744	2.118	0.700	2.193	0.655	2.269	0.612	2.346	0.570	2.424	0.528	2.503	0.488	2.582	0.448	2.661
50	0.913	1.925	0.871	1.987	0.829	2.051	0.787	2.116	0.746	2.182	0.705	2.250	0.665	2.318	0.625	2.387	0.586	2.456	0.548	2.526
55	0.979	1.891	0.940	1.945	0.902	2.002	0.863	2.059	0.825	2.117	0.786	2.176	0.748	2.237	0.711	2.298	0.674	2.359	0.637	2.421
60	1.037	1.865	1.001	1.914	0.965	1.964	0.929	2.015	0.893	2.067	0.857	2.120	0.822	2.173	0.786	2.227	0.751	2.283	0.716	2.338
65	1.087	1.845	1.053	1.889	1.020	1.934	0.986	1.980	0.953	2.027	0.919	2.075	0.886	2.123	0.852	2.172	0.819	2.221	0.789	2.272
70	1.131	1.831	1.099	1.870	1.068	1.911	1.037	1.953	1.005	1.995	0.974	2.038	0.943	2.082	0.911	2.127	0.880	2.172	0.849	2.217
75	1.170	1.819	1.141	1.856	1.111	1.893	1.082	1.931	1.052	1.970	1.023	2.009	0.993	2.049	0.964	2.090	0.934	2.131	0.905	2.172
80	1.205	1.810	1.177	1.844	1.150	1.878	1.122	1.913	1.094	1.949	1.066	1.984	1.039	2.022	1.011	2.059	0.983	2.097	0.955	2.135
85	1.236	1.803	1.210	1.834	1.184	1.866	1.158	1.898	1.132	1.931	1.106	1.965	1.080	1.999	1.053	2.033	1.027	2.068	1.000	2.104
90	1.264	1.798	1.240	1.827	1.215	1.856	1.191	1.886	1.166	1.917	1.141	1.948	1.116	1.979	1.091	2.012	1.066	2.044	1.041	2.077
95	1.290	1.793	1.267	1.821	1.244	1.848	1.221	1.876	1.197	1.905	1.174	1.943	1.150	1.963	1.126	1.993	1.102	2.023	1.079	2.054
100	1.314	1.790	1.292	1.816	1.270	1.841	1.248	1.868	1.225	1.895	1.203	1.922	1.181	1.949	1.158	1.977	1.136	2.006	1.113	2.034
150	1.473	1.783	1.458	1.799	1.444	1.814	1.429	1.830	1.414	1.847	1.400	1.863	1.385	1.880	1.370	1.897	1.355	1.913	1.340	1.931
200	1.561	1.791	1.550	1.801	1.539	1.813	1.528	1.824	1.518	1.836	1.507	1.847	1.495	1.860	1.484	1.871	1.474	1.883	1.462	1.896

*k' is the number of regressors excluding the intercept

Table A-2
Models with an intercept (from Savin and White)

Durbin-Watson Statistic: 5 Per Cent Significance Points of dL and dU

n	k*=1		k*=2		k*=3		k*=4		k*=5		k*=6		k*=7		k*=8		k*=9		k*=10		
	dL	dU																			
6	0.610	1.400	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
7	0.700	1.356	0.467	1.896	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
8	0.763	1.332	0.559	1.777	0.367	2.287	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
9	0.824	1.320	0.629	1.699	0.455	2.128	0.296	2.588	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
10	0.879	1.320	0.697	1.641	0.525	2.016	0.376	2.414	0.243	2.822	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
11	0.927	1.324	0.758	1.604	0.595	1.928	0.444	2.283	0.315	2.645	0.203	3.004	----	----	----	----	----	----	----	----	----
12	0.971	1.331	0.812	1.579	0.658	1.864	0.512	2.177	0.380	2.506	0.268	2.832	0.171	3.149	----	----	----	----	----	----	----
13	1.010	1.340	0.861	1.562	0.715	1.816	0.574	2.094	0.444	2.390	0.328	2.692	0.230	2.985	0.147	3.266	----	----	----	----	----
14	1.045	1.350	0.905	1.551	0.767	1.779	0.632	2.030	0.505	2.296	0.389	2.572	0.286	2.848	0.200	3.111	0.127	3.360	----	----	----
15	1.077	1.361	0.946	1.543	0.814	1.750	0.685	1.977	0.562	2.220	0.447	2.471	0.343	2.727	0.251	2.979	0.175	3.216	0.111	3.438	----
16	1.106	1.371	0.982	1.539	0.857	1.728	0.734	1.935	0.615	2.157	0.502	2.388	0.398	2.624	0.304	2.860	0.222	3.090	0.155	3.304	----
17	1.133	1.381	1.015	1.536	0.897	1.710	0.779	1.900	0.664	2.104	0.554	2.318	0.451	2.537	0.356	2.757	0.272	2.975	0.198	3.184	----
18	1.158	1.391	1.046	1.535	0.933	1.696	0.820	1.872	0.710	2.060	0.603	2.258	0.502	2.461	0.407	2.668	0.321	2.873	0.244	3.073	----
19	1.180	1.401	1.074	1.536	0.967	1.685	0.859	1.848	0.752	2.023	0.649	2.206	0.549	2.396	0.456	2.589	0.369	2.783	0.290	2.974	----
20	1.201	1.411	1.100	1.537	0.998	1.676	0.894	1.828	0.792	1.991	0.691	2.162	0.595	2.339	0.502	2.521	0.416	2.704	0.336	2.885	----
21	1.221	1.420	1.125	1.538	1.026	1.669	0.927	1.812	0.829	1.964	0.731	2.124	0.637	2.290	0.546	2.461	0.461	2.633	0.380	2.806	----
22	1.239	1.429	1.147	1.541	1.053	1.664	0.958	1.797	0.863	1.940	0.769	2.090	0.677	2.246	0.588	2.407	0.504	2.571	0.424	2.735	----
23	1.257	1.437	1.168	1.543	1.078	1.660	0.986	1.785	0.895	1.920	0.804	2.061	0.715	2.208	0.628	2.360	0.545	2.514	0.465	2.670	----
24	1.273	1.446	1.188	1.546	1.101	1.656	1.013	1.775	0.925	1.902	0.837	2.035	0.750	2.174	0.666	2.318	0.584	2.464	0.506	2.613	----
25	1.288	1.454	1.206	1.550	1.123	1.654	1.038	1.767	0.953	1.886	0.868	2.013	0.784	2.144	0.702	2.280	0.621	2.419	0.544	2.560	----
26	1.302	1.461	1.224	1.553	1.143	1.652	1.062	1.759	0.979	1.873	0.897	1.992	0.816	2.117	0.735	2.246	0.657	2.379	0.581	2.513	----
27	1.316	1.469	1.240	1.556	1.162	1.651	1.084	1.753	1.004	1.861	0.925	1.974	0.845	2.093	0.767	2.216	0.691	2.342	0.616	2.470	----
28	1.328	1.476	1.255	1.560	1.181	1.650	1.104	1.747	1.028	1.850	0.951	1.959	0.874	2.071	0.798	2.188	0.723	2.309	0.649	2.431	----
29	1.341	1.483	1.270	1.563	1.198	1.650	1.124	1.743	1.050	1.841	0.975	1.944	0.900	2.052	0.826	2.164	0.753	2.278	0.681	2.396	----
30	1.352	1.489	1.284	1.567	1.214	1.650	1.143	1.739	1.071	1.833	0.998	1.931	0.926	2.034	0.854	2.141	0.782	2.251	0.712	2.363	----
31	1.363	1.496	1.297	1.570	1.229	1.650	1.160	1.735	1.090	1.825	1.020	1.920	0.950	2.018	0.879	2.120	0.810	2.226	0.741	2.333	----
32	1.373	1.502	1.309	1.574	1.244	1.650	1.177	1.732	1.109	1.819	1.041	1.909	0.972	2.004	0.904	2.102	0.836	2.203	0.769	2.306	----
33	1.383	1.508	1.321	1.577	1.258	1.651	1.193	1.730	1.127	1.813	1.061	1.900	0.994	1.991	0.927	2.085	0.861	2.181	0.796	2.281	----
34	1.393	1.514	1.333	1.580	1.271	1.652	1.208	1.728	1.144	1.808	1.079	1.891	1.015	1.978	0.950	2.069	0.885	2.162	0.821	2.257	----
35	1.402	1.519	1.343	1.584	1.283	1.653	1.222	1.726	1.160	1.803	1.097	1.884	1.034	1.967	0.971	2.054	0.908	2.144	0.845	2.236	----
36	1.411	1.525	1.354	1.587	1.295	1.654	1.236	1.724	1.175	1.799	1.114	1.876	1.053	1.957	0.991	2.041	0.930	2.127	0.868	2.216	----
37	1.419	1.530	1.364	1.590	1.307	1.655	1.249	1.723	1.190	1.795	1.131	1.870	1.071	1.948	1.011	2.029	0.951	2.112	0.891	2.197	----
38	1.427	1.535	1.373	1.594	1.318	1.656	1.261	1.722	1.204	1.792	1.146	1.864	1.088	1.939	1.029	2.017	0.970	2.098	0.912	2.180	----
39	1.435	1.540	1.382	1.597	1.328	1.658	1.273	1.722	1.218	1.789	1.161	1.859	1.104	1.932	1.047	2.007	0.990	2.085	0.932	2.164	----
40	1.442	1.544	1.391	1.600	1.338	1.659	1.285	1.721	1.230	1.786	1.175	1.854	1.120	1.924	1.064	1.997	1.008	2.072	0.952	2.149	----
45	1.475	1.566	1.430	1.615	1.383	1.666	1.336	1.720	1.287	1.776	1.238	1.835	1.189	1.895	1.139	1.958	1.089	2.022	1.038	2.088	----
50	1.503	1.585	1.462	1.628	1.421	1.674	1.378	1.721	1.335	1.771	1.291	1.822	1.246	1.875	1.201	1.930	1.156	1.986	1.110	2.044	----
55	1.528	1.601	1.490	1.641	1.452	1.681	1.414	1.724	1.374	1.768	1.334	1.814	1.294	1.861	1.253	1.909	1.212	1.959	1.170	2.010	----
60	1.549	1.616	1.514	1.652	1.480	1.689	1.444	1.727	1.408	1.767	1.372	1.808	1.335	1.850	1.298	1.894	1.260	1.939	1.222	1.984	----
65	1.567	1.629	1.536	1.662	1.503	1.696	1.471	1.731	1.438	1.767	1.404	1.805	1.370	1.843	1.336	1.882	1.301	1.923	1.266	1.964	----
70	1.583	1.641	1.554	1.672	1.525	1.703	1.494	1.735	1.464	1.768	1.433	1.802	1.401	1.838	1.369	1.874	1.337	1.910	1.305	1.948	----
75	1.598	1.652	1.571	1.680	1.543	1.709	1.515	1.739	1.487	1.770	1.458	1.801	1.428	1.834	1.399	1.867	1.369	1.901	1.339	1.935	----
80	1.611	1.662	1.586	1.688	1.560	1.715	1.534	1.743	1.507	1.772	1.480	1.801	1.453	1.831	1.425	1.861	1.397	1.893	1.369	1.925	----
85	1.624	1.671	1.600	1.696	1.575	1.721	1.550	1.747	1.525	1.774	1.500	1.801	1.474	1.829	1.448	1.857	1.422	1.886	1.396	1.916	----
90	1.635	1.679	1.612	1.703	1.589	1.726	1.566	1.751	1.542	1.776	1.518	1.801	1.494	1.827	1.469	1.854	1.445	1.881	1.420	1.909	----
95	1.645	1.687	1.623	1.709	1.602	1.732	1.579	1.755	1.557	1.778	1.535	1.802	1.512	1.827	1.489	1.852	1.465	1.877	1.442	1.903	----
100	1.654	1.694	1.634	1.715	1.613	1.736	1.592	1.758	1.571	1.780	1.550	1.803	1.528	1.826	1.506	1.850	1.484	1.874	1.462	1.898	----
150	1.720	1.747	1.706	1.760	1.693	1.774	1.679	1.788	1.665	1.802	1.651	1.817	1.637	1.832	1.622	1.846	1.608	1.862	1.593	1.877	----
200	1.758	1.779	1.748	1.789	1.738	1.799	1.728	1.809	1.718	1.820	1.707	1.831	1.697	1.841	1.686	1.852	1.675	1.863	1.665	1.874	----

*k' is the number of regressors excluding the intercept

Anexo B

Table 2

Densities for the binary systems at different temperatures

X_1	$\rho, g\ cm^{-3}$				
	293.15 K	298.15 K	303.15 K	308.15 K	313.15 K
Water(1)+1,4-Dioxane(2)*					
0.0000	1.0339	1.0280	1.0225	1.0172	1.0121
0.1007	1.0354	1.0294	1.0239	1.0186	1.0135
0.1995	1.0366	1.0308	1.0254	1.0200	1.0147
0.3422	1.0385	1.0328	1.0275	1.0222	1.0170
0.4256	1.0396	1.0340	1.0288	1.0236	1.0186
0.5379	1.0412	1.0357	1.0306	1.0256	1.0208
0.6640	1.0424	1.0372	1.0323	1.0275	1.0227
0.7530	1.0415	1.0368	1.0321	1.0274	1.0226
0.8197	1.0386	1.0343	1.0299	1.0255	1.0210
0.8710	1.0338	1.0298	1.0258	1.0218	1.0177
0.9130	1.0270	1.0234	1.0200	1.0166	1.0133
0.9470	1.0188	1.0158	1.0128	1.0100	1.0073
0.9760	1.0091	1.0068	1.0045	1.0022	1.0000
1.0000	0.9982	0.9971	0.9956	0.9940	0.9922
Water(1)+DMSO(2)					
0.0000	1.1012	1.0957	1.0901	1.0850	1.0804
0.0915	1.1015	1.0966	1.0924	1.0883	1.0843
0.1713	1.1021	1.0979	1.0942	1.0908	1.0873
0.2415	1.1026	1.0989	1.0956	1.0926	1.0895
0.3038	1.1028	1.0997	1.0966	1.0939	1.0910
0.3594	1.1029	1.1001	1.0972	1.0947	1.0921
0.4795	1.1019	1.0996	1.0972	1.0952	1.0930
0.5669	1.0994	1.0973	1.0953	1.0937	1.0919
0.6541	1.0941	1.0922	1.0906	1.0894	1.0881
0.7021	1.0894	1.0876	1.0861	1.0852	1.0843
0.7842	1.0769	1.0756	1.0741	1.0735	1.0730
0.8637	1.0575	1.0563	1.0550	1.0545	1.0542
0.9218	1.0370	1.0361	1.0346	1.0339	1.0333
0.9649	1.0174	1.0166	1.0150	1.0139	1.0128
1.0000	0.9982	0.9971	0.9956	0.9940	0.9922
1,4-Dioxane(1)+DMSO(2)					
0.0000	1.1012	1.0957	1.0901	1.0850	1.0804
0.0419	1.0983	1.0934	1.0880	1.0831	1.0787
0.1062	1.0939	1.0895	1.0845	1.0800	1.0759
0.2171	1.0864	1.0825	1.0781	1.0740	1.0703
0.3094	1.0801	1.0764	1.0723	1.0685	1.0649
0.4050	1.0737	1.0699	1.0660	1.0623	1.0588
0.4541	1.0704	1.0665	1.0627	1.0589	1.0554
0.5041	1.0670	1.0630	1.0592	1.0554	1.0519
0.6071	1.0601	1.0558	1.0518	1.0479	1.0442
0.7139	1.0529	1.0482	1.0440	1.0399	1.0359
0.8250	1.0455	1.0403	1.0357	1.0312	1.0268
0.9112	1.0398	1.0343	1.0292	1.0243	1.0196
0.9530	1.0370	1.0313	1.0260	1.0210	1.0161
1.0000	1.0339	1.0280	1.0225	1.0172	1.0121

* data reported in ref. 6

Tabla 3 Señales características para la espectroscopía RMN

Disolvente (deuterado)	Smp. [°C]	Sdp. ⁷⁶⁰ [°C]		¹ H-NMR δ [ppm]	¹³ C-NMR δ [ppm]
CCl ₄	-23	77		—	96.0
CS ₂	-112	46	T	—	192.8
CDCl ₃	-64	61		7.26	77.0
MeOD	-98	64	T	3.35 4.78	49.3
Me ₂ CO	-95	56	T	2.04	29.3 206.3
C ₆ D ₆	6	80		7.27	128.0
CD ₂ Cl ₂	-97	40	T	5.32	53.5
MeCN	-45	82		1.93	1.3 117.7
CDBr ₃	8	150	H	6.83	10.2
C ₂ D ₂ Cl ₄	-44	146	H	6.00	74.0
THF	-108	66		1.73 3.58	25.5 67.7
Dioxan	12	102		3.58	66.5
DMSO	19	189	H	2.49	39.7
Pyridin	-42	115		7.19 7.55 8.71	123.5 135.5 149.5
D ₂ O	0	100		4.65	—
AcOD	17	118		2.03 11.53	20.0 178.4
CF ₃ CO ₂ D	-15	72		11.5	116.5 164.4
HMPTA	7	233	H	2.53	35.8