



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA LICENCIATURA EN INGENIERÍA QUÍMICA

“Diseño orientado de experimentos para la optimización de la producción del derivado $3\beta,16\beta,26\beta$ -triacetoxi-22-oxocolest-5-enico (PCVE4) a nivel laboratorio”

Tesis para obtener el título de
LICENCIADO EN INGENIERÍA QUÍMICA

Presenta:

Cecilia Ramírez de la Paz

Director de tesis:

Dr. Alan Carrasco Carballo

Fecha de examen: 03/23





BUAP

“HUP, 50 años de enseñanza y salud”

Oficio No. FIQ/AC/411/2022

Asunto: Registro de Tema de Tesis

C. CECILIA RAMÍREZ DE LA PAZ
PASANTE DE LA LICENCIATURA EN
INGENIERÍA QUÍMICA
P R E S E N T E:

Por medio del presente me permito informarle, de la aprobación del Registro de Tema de Tesis de la Licenciatura en Ingeniería Química cuyo título es el siguiente:

“Diseño orientado de experimentos para la optimización de la producción del 3 β ,16 β ,26 β -triacetoxi-22-oxocolest-5-enico a nivel laboratorio”

Con el siguiente contenido:

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1	ANTECEDENTES
CAPÍTULO 2	METODOLOGÍA
CAPÍTULO 3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CONCLUSIONES
BIBLIOGRAFÍA

Director de Tesis: Dr. Alan Carrasco Carballo.

Lo cual me permito comunicarle para su conocimiento y fines consiguientes aclarando que la vigencia de este tema será **UNICAMENTE POR UN AÑO**.

Atentamente
"Pensar Bien, Para Vivir Mejor"
H. Puebla de Z., a 9 de Diciembre de 2022

Dra. Valeria Jordana González Coronel
Secretaria Académica

C.c.p. Director de Tesis: Dr. Alan Carrasco Carballo.
C.c.p. Archivo.

Facultad
de Ingeniería
Química

Av. San Claudio s/n, Col. San
Manuel, Ciudad Universitaria,
Puebla, Pue. C. P. 72590
01 (222) 229 55 00
Exts. 7250 y 7251

Permiso de impresión

DEDICATORIA

A mi madre por nunca dejar de creer en mí, a mi padre por ser mi inspiración en el ámbito académico y en un futuro, profesional.

A mis cuatro hermanos, Rubén, Elba, Víctor y Valentina por ser mi mayor fuente de vitalidad en la vida.

A mis abuelitos por ser mis mejores consejeros en esta carrera llamada vida.

A mi primo, amigo y confidente Roberto Leyja, aquel que hace mi camino un poco más humano.

A mi compañera y amiga Guiee por apoyarme desde el inicio de mis estudios universitarios, académica y personalmente.

Agradecimientos

A mi director, el Dr. Alan Carrasco Carballo por su apoyo para cumplir esta meta y guiarme en este proceso para culminar mis estudios universitarios.

A la comisión revisora conformada por la Dra. Lydia María Pérez Díaz y Dra. María del Consuelo Mendoza Herrera por su tiempo, paciencia y consejos para enriquecer este trabajo.

Agradezco enormemente la labor de mi asesora, la Ingeniera Guiee Niza López Castillo por su apoyo y el sinfín de dudas resultas.

Al Dr. Jesús Sandoval por ser una fuente de inspiración y ser un gran ejemplo.

A mi tutora, la Mtra. Emma Juárez por brindarme su apoyo y esclarecer mis dudas durante mi carrera universitaria.

A todos los integrantes del laboratorio LESQO por compartir sus experiencias y conocimientos, por ser siempre amables y éticos.

A mi compañero David por sus consejos y empatía durante mi estancia en el LESQO.

ÍNDICE

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	8
ÍNDICE DE FIGURAS.....	9
ÍNDICE DE TABLAS.....	9
RESUMEN.....	10
INTRODUCCIÓN	11
ANTECEDENTES	14
1. BRASINOESTEROIDES	14
2. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LOS BRASINOESTEROIDES	17
3. PROMOTORES DE CRECIMIENTO VEGETAL	18
4. OPTIMIZACIÓN DE PROCESOS	19
5. DISEÑO ORIENTADO DE EXPERIMENTOS	20
5.1 Tipos de diseños experimentales.....	21
6. CUANTIFICACIÓN POR RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (QRMN)	22
OBJETIVOS.....	22
OBJETIVO GENERAL	22
OBJETIVOS PARTICULARES	23
METODOLOGÍA	23
1. RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.	24
2. CROMATOGRAFÍA.	24
3. DISOLVENTES Y MATERIAS PRIMAS.	24
4. OBTENCIÓN DEL PCVE4 (4)	24
5. CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS UTILIZADOS.	25
5.1 Diosgenina (5):.....	25
5.2 PCVE4:	25
6. ANÁLISIS DEL DISEÑO DE EXPERIMENTOS	26
7. MODELO MATEMÁTICO	26
DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	27
1. SÍNTESIS	27
1.1 Diosgenina: caracterización y selección de señal de referencia.	28
1.2 PCVE4 (4): caracterización y selección de señal de referencia.....	30
2. ANÁLISIS DEL DISEÑO ORIENTADO DE EXPERIMENTOS	32
3. MODELO MATEMÁTICO	36
CONCLUSIONES.....	40
BIBLIOGRAFÍA.....	41

Símbolos y abreviaturas

PCVE4	Derivado 3 β ,16 β ,26-triacetoxi-22-oxocolest-5-enico
PCV	Promotor de crecimiento vegetal
DOE	Diseño orientado de experimentos
BR	Brasinoesteroides
qRMN	Cuantificación por Resonancia magnética Nuclear
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
MHz	Megahertz
TMS	Tetrametilsilano
δ	Desplazamientos químicos
ppm	Partes por millón
J	Constantes de acoplamiento
Hz	Hertz
Ac ₂ O	Anhídrido acético
(Et ₂ O•BF ₃)	Eterato de trifluoruro de boro
BUAP	Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Índice de figuras

<i>Figura 1. Incremento en el área de producción agrícola VS incremento en la población mundial [Fuente: FAO].....</i>	<i>11</i>
<i>Figura 2 Principales hormonas en plantas</i>	<i>12</i>
<i>Figura 3 Compuestos 22- oxocolestánicos con actividad promotora de crecimiento vegetal reportada.</i>	<i>13</i>
<i>Figura 4 Estructura del derivado PCVE4</i>	<i>14</i>
<i>Figura 5 Brassica napus L.</i>	<i>15</i>
<i>Figura 6 Plantas y brasinoesteroides producidas por estas.</i>	<i>16</i>
<i>Figura 7 Esquema de reacción de apertura de sapogeninas esteroidales.</i>	<i>17</i>
<i>Figura 8 Estructuras de Brasinoesteroides representativos.</i>	<i>17</i>
<i>Figura 9 Estructura química de los brasinoesteroides naturales</i>	<i>18</i>
<i>Figura 10 Diagrama de flujo de la metodología empleada.</i>	<i>23</i>
<i>Figura 11 Esquematación del orden de presentación de los resultados de este trabajo.</i>	<i>27</i>
<i>Figura 12 Estructura de disgenina (5).</i>	<i>28</i>
<i>Figura 13 Espectro de RMN 1H a 500 MHz de diosgenina (5).</i>	<i>29</i>
<i>Figura 14 Espectro de RMN 13C a 125 MHz de diosgenina (5).</i>	<i>29</i>
<i>Figura 15 Estructura del PCVE4 (4).</i>	<i>30</i>
<i>Figura 16 Espectro de RMN 1H a 500 MHz de PCVE4 (4).</i>	<i>31</i>
<i>Figura 17 Espectro de RMN 13C a 125 MHz de PCVE4 (4).</i>	<i>32</i>
<i>Figura 18 Espectros de RMN integrados para calcular el rendimiento de reacción.</i>	<i>33</i>
<i>Figura 19 Gráfica de efectos estandarizados.....</i>	<i>34</i>
<i>Figura 20 Gráfica de residuos para los resultados experimentales de obtención de PCVE4.</i>	<i>35</i>
<i>Figura 21 Gráfico de ajuste vs residuos del modelo lineal para los datos experimentales de obtención de PCVE4.</i>	<i>37</i>
<i>Figura 22 Variación entre resultados teóricos del modelo 1 y experimentales.....</i>	<i>38</i>
<i>Figura 23 Variación entre resultados teóricos del modelo completo y experimentales.</i>	<i>39</i>

Índice de tablas

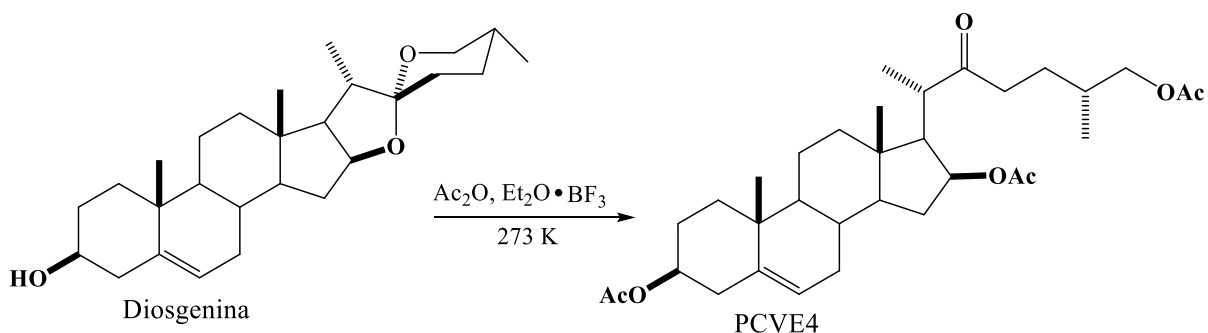
<i>Tabla 1 Resumen de las variables evaluadas en el diseño de experimentos.....</i>	<i>33</i>
<i>Tabla 2 Resumen de resultados experimentales del diseño para la obtención del PCVE4 .</i>	<i>35</i>
<i>Tabla 3 Resumen de modelos ajustados a la variación del rendimiento con las variables de estudio.....</i>	<i>37</i>

Anexo

<i>Tabla A Resultados obtenidos a partir del diseño de experimentos.....</i>	<i>45</i>
--	-----------

RESUMEN

El incremento de la población se ve reflejada en la demanda de alimentos provenientes del campo, y a su vez debido a diversos efectos la producción se ha estancado a manera en que no satisface completamente el abasto requerido, por esta razón nuestro grupo de investigación se ha dado a la tarea el buscar compuestos que sean empleados en el campo para mejorar la producción, una familia de interés son los derivados 22-oxocolestánicos que han demostrado actividad en diversas etapas del crecimiento vegetal, sin embargo, en el proceso de obtención se obtiene una mezcla de subproductos, por lo que fue interesante estudiar el efecto de las variables involucradas en la síntesis del derivado $3\beta,16\beta,26\beta$ -triacetoxi-22-oxocolest-5-enico (PCVE4) (4).



La influencia de las variables sobre el rendimiento se evaluó mediante el análisis de un diseño orientado de experimentos (DOE) de tipo factorial (2^4) que permitió determinar que el punto óptimo del proceso analizado para esta reacción es con 2.253 mmol de anhídrido acético y 1.136 mmol de $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ a 273 K por 20 min y también desarrollar un modelo matemático que representa el comportamiento de la reacción. Con estos resultados se da paso a la optimización del proceso y el escalamiento a lotes mayores a nivel laboratorio, lo que beneficiará en el desarrollo de nuevos proyectos que incluyan evaluaciones en campo para poder estudiar el efecto de este compuesto en un entorno real, así como la disminución de costos de producción que permitan el acceso a estos tratamientos a una mayor parte de agricultores en nuestro país.

1. INTRODUCCIÓN

La agricultura representa el 3.7% del PIB con respecto a la economía total del país según cifras del INEGI en el año 2014, es una de las principales actividades y sustento de muchas familias y proporciona empleo al 13% de la población [1]. Sin embargo, en la actualidad esta actividad sufre de diversas desventajas como los altos costos de los equipos necesarios, la pérdida de las cosechas debido a las condiciones climáticas y de plagas o la baja producción resultante [2]. A partir de esto crece la importancia de buscar nuevas técnicas en beneficio de los cultivos, un ejemplo de ello es el uso de fertilizantes y pesticidas, para la protección y mejora agrícola, estos productos a pesar de su respuesta benéfica en contra de plagas presentan la desventaja de degradar los suelos y alterar sus propiedades físicas, químicas y biológicas, ya que estas se acumulan en el medio y poseen carácter tóxico el cual alteran las comunidades microbianas y contamina el suelo, el agua superficial y subterránea.

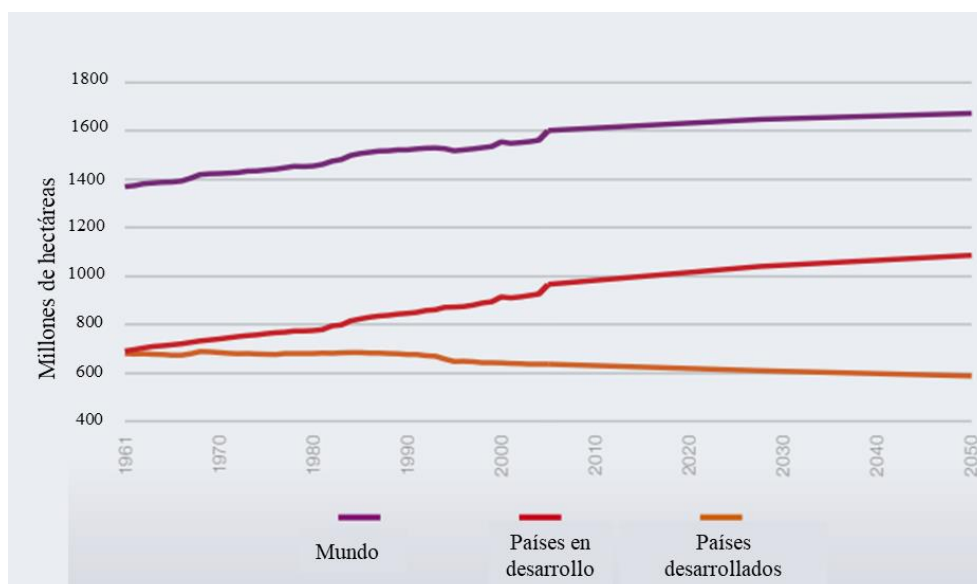


Figura 1. Incremento en el área de producción agrícola VS incremento en la población mundial [Fuente: FAO]

Las hormonas vegetales, también conocidas como fitohormonas (Figura 2), son sustancias que juegan un papel clave en el desarrollo de las plantas, ya que son capaces de regular de manera predominante los fenómenos fisiológicos de las mismas, como el crecimiento y el desarrollo en respuesta a las señales del medio ambiente como la luz; una clasificación de estos son los brasinoesteroides (BR), los cuales son compuestos sintetizados por la misma planta y se encuentran en pequeñas cantidades en sus órganos, encontrándose principalmente en polen, hojas, yemas, flores y semillas, caracterizándose como compuestos polihidroxifenólicos [3]. El primero de estos compuestos fue aislado del polen de *Brassica*

napus, con un rendimiento de 1 mg por cada 10 kg de materia vegetal empleada, fue a partir de eso la búsqueda por su esclarecimiento, la cual se logró en 1979 por científicos norteamericanos. En la actualidad se conocen más de 45 miembros de la familia de los BR, por lo que constituyen una amplia familia de compuestos de potente actividad biológica.

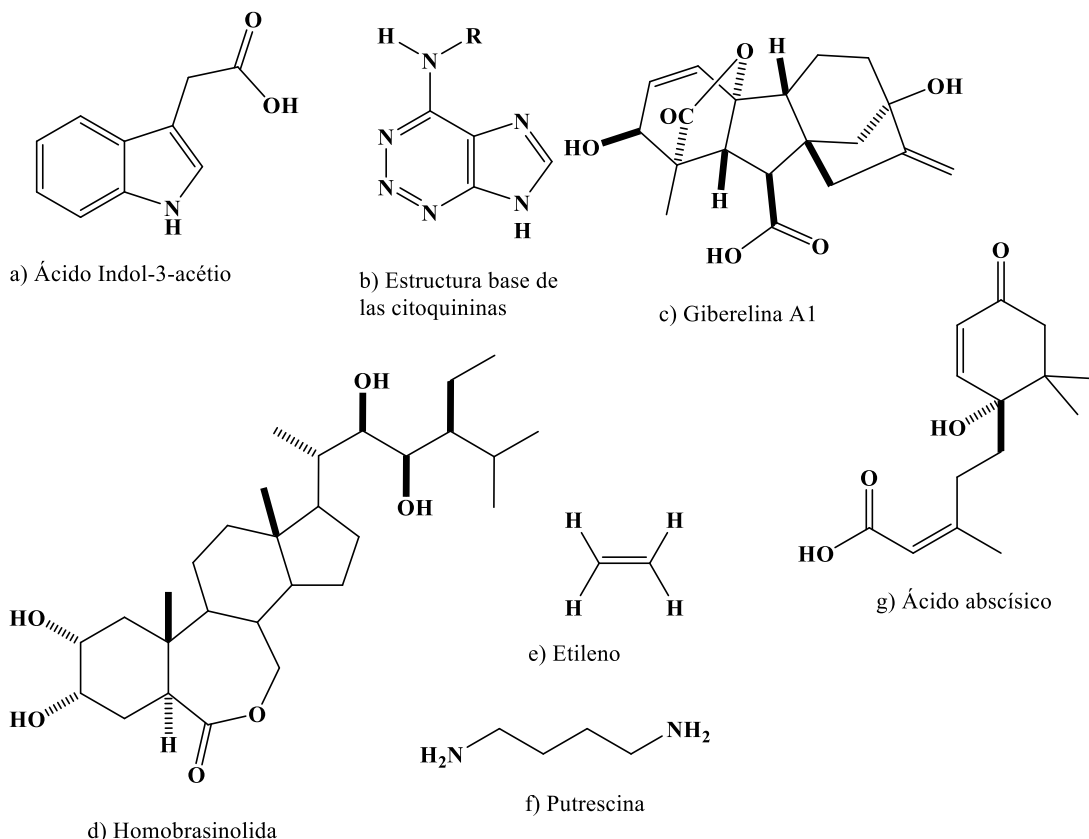


Figura 2 Principales hormonas en plantas

Esta familia de hormonas regula una amplia gama de procesos en el desarrollo de las plantas, algunos de sus efectos son:

- Respuesta a estrés abiótico y biótico
- Crecimiento y respuesta gravitrópica de la raíz
- Fotomorfogénesis
- Elongación y división celular
- Metabolismo de radicales de oxígeno
- Diferenciación vascular y estomática floración y maduración de frutos

Debido a la respuesta en la actividad promotora de crecimiento vegetal (PCV) estos compuestos representan una alternativa en la mejora de los cultivos, a partir de esto nace la búsqueda por nuevas estructuras con potencial biológico. A través del estudio de los BR naturales se puede suponer qué los grupos funcionales que le confieren actividad a la molécula son los que se encuentran en los anillos A, B y en la cadena lateral [4]. A lo largo

del tiempo se han reportado diversas metodologías de obtención que parten de diferentes ácidos biliares; sin embargo, en la última década se han reportado estructuras PCV obtenidos mediante la apertura del espiroacetal, oxidación y adición de grupos oxigenados a sapogeninas [5-6] algunas de las estructuras se presentan en la Figura 3.

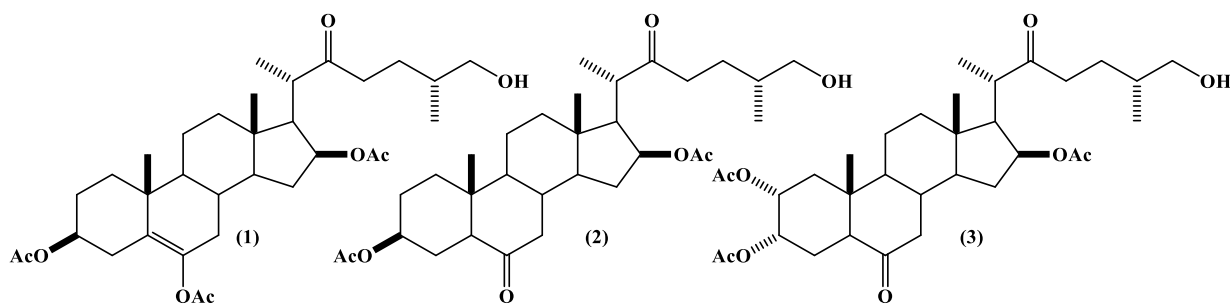


Figura 3 Compuestos 22- oxocolestánicos con actividad promotora de crecimiento vegetal reportada.

En el laboratorio de síntesis y modificación de productos naturales de la Facultad de Ciencias Químicas de la BUAP se han desarrollado compuestos promotores de crecimiento vegetal de tipo 22-oxocolestánicos producidos a partir de sapogeninas esteroidales como diosgenina y hecogenina, con actividad similar e incluso superior a la de los BRs [7]. Zeferino Díaz y colaboradores demostraron su actividad promotora de crecimiento a partir de bioensayos en lámina de arroz, obteniendo ángulos de apertura mayores a los del BR de referencia, brasinólida [5-6]. Por otro lado, Moreno [8] y Zurita [9] en el año 2009 y 2011 respectivamente, notaron un aumento en la acumulación de biomasa e inducción de respuestas de resistencia a estrés abiótico en plantas de variedades nativas de maíz; no obstante, no se ha probado su efecto en plantas infectadas con algún patógeno. Particularmente una estructura ha sido de gran interés, la denominada PCVE4 (Figura 4) que se caracteriza por presentar tres acetatos en las posiciones 3, 16 y 26, un carbonilo en 22 y un doble enlace en 6, este ha demostrado incrementar el crecimiento vegetal en especies endémicas de maíz y frijol en el país. En este trabajo se estudió el efecto de las variables involucradas en la reacción de obtención de dicho compuesto con el fin de determinar el grado de influencia de cada una. Se diseñó un modelo matemático que describe el comportamiento de la reacción a nivel laboratorio, lo cual representa un avance para el desarrollo de su producción a una escala mayor.

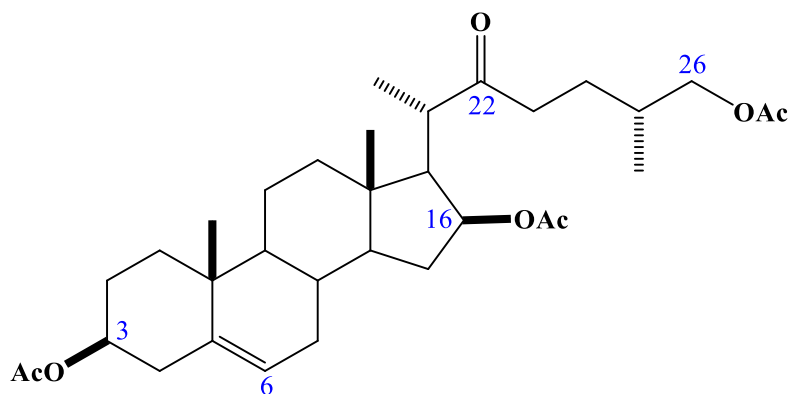


Figura 4 Estructura del derivado PCVE4

2. ANTECEDENTES

2.1 Brasinoesteroides

Los brasinoesteroides (BR) se consideran dentro de las principales hormonas vegetales debido a su gran distribución en el reino vegetal, así como a su diversa actividad biológica en las etapas del desarrollo de las plantas y por su capacidad de resistencia a condiciones de estrés [10]. El interés por este grupo de fitohormonas comenzó con la caracterización de los componentes de extractos naturales empleados en bioensayos que demostraron actividad en las plantas, uno de estos estudios en 1970 llevó a la extracción de polen de colza de la planta *Brassica napus* L. (Figura 5) que causaba elongación en el tallo de frijol, a las sustancias que promovían el crecimiento contenidas en el extracto de esta planta fueron llamadas “brasinós” [11] de las cuales años más tarde se pudo identificar el primero BR, una lactona esteroidal denominada brasinólida [12].



Figura 5 Brassica napus L.

Años más tarde en 1982 se aisló la castasterona del extracto de la planta *Castanea spp* (Figura 6). La cual demostró una alta actividad en bioensayos de inclinación en lámina de arroz, pese a su excelente actividad promotora su rendimiento fue bajo, ya que se obtuvieron 2.375 mg a partir de 10 kg de extracto [13]. El descubrimiento de esta variedad de hormonas promotoras de crecimiento fue un gran paso para la biología vegetal y el desarrollo de técnicas de crecimiento de plantas *in vitro*. Sin embargo, las cantidades obtenidas mediante extracciones eran escasas, el mayor rendimiento reportado fue de 6.4 mg de 6-desoxitifaesterol a partir de 1 kg de polen de *Cupressus arizonica* [14], es por esto el interés en la búsqueda de obtención sintética de estos compuestos, para el caso de la brasinólida, las primeras obtenciones mediante síntesis fueron posibles a partir de estigmasterol [15] mediante múltiples etapas con resultados biológicos idénticos al BR natural, las rutas de obtención incrementaron con el paso del tiempo, aun así la problemática referente a los rendimientos persistió ya que los reportes se encontraban en un intervalo de 5-30 % globales, así mismo, en la búsqueda de sintetizar BR se obtuvieron derivados estructuralmente similares con alto potencial de actividad biológica [16-17], es decir, análogos de BR.

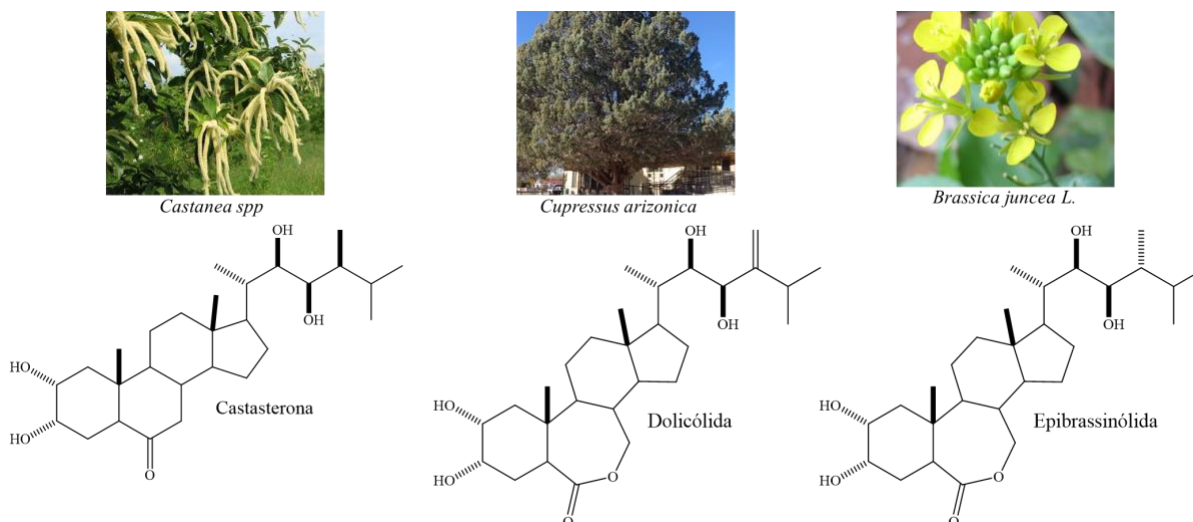


Figura 6 Plantas y brasinoesteroides producidas por estas.

El uso de BR y sus análogos han demostrado no solo ser viables para aumentar la tasa de crecimiento de las plantas si no que hay estudios que sugieren que el uso de estos aumenta su resistencia a factores externos causantes de estrés [18]. Otras de las ventajas que presentan es su gran efecto a bajas concentraciones (cien veces menos que otros reguladores de crecimiento), estimulan el crecimiento de raíz, a pesar de que aceleran el crecimiento no causan deformidad en esta, este efecto es especialmente fuerte en condiciones de estrés por lo que pueden utilizarse para evitar la pérdida de cosechas en condiciones adversas hacia los cultivos (bajas temperaturas, alta salinidad, etc.) y estos compuestos tiene poca o nula toxicidad después de haber sido cosechados [19]. A través del estudio de los BR naturales se puede suponer que los grupos funcionales que le confieren a la molécula la actividad biológica son los que se encuentran en los anillos A, B y en la cadena lateral [20] sobre todo aquellos que poseen oxígeno en su estructura, como hidroxilos, ácidos carboxílicos, cetonas y acetilos, solo por mencionar algunos ejemplos.

A lo largo del tiempo diversos grupos de investigación se han dado a la tarea de desarrollar rutas de obtención de este tipo de promotores de crecimiento vegetal (PCV), en sus inicios a partir de la modificación estructural y específica de diferentes ácidos biliares, sin embargo, ya que estas materias primas igual implican desventajas para su obtención en la última década se han obtenido mediante la modificación de esteroides, que se obtienen a partir de extracciones con rendimientos mucho mayores lo que permite mayor accesibilidad a ellos, realizando en ellos la apertura de su espiroacetal, con una posterior oxidación o adición de grupos oxigenados a sapogeninas [5-6].

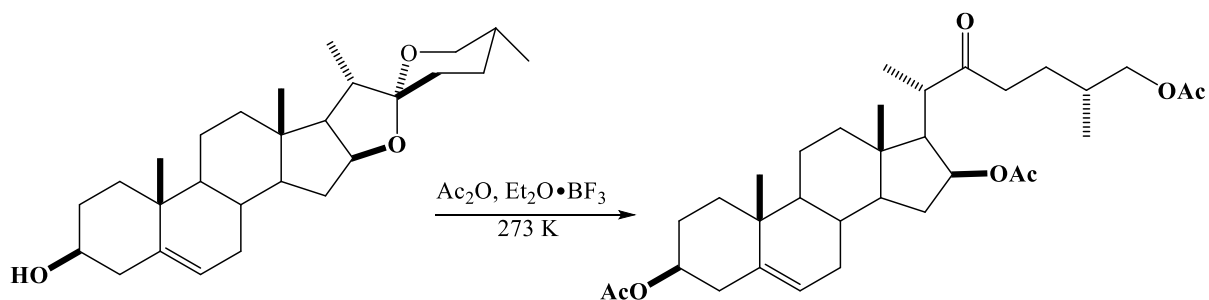


Figura 7 Esquema de reacción de apertura de sapogeninas esteroidales.

2.2 Estructura química de los brasinoesteroides

Las hormonas presentes tanto en animales y plantas poseen diversas estructuras entre las que se encuentran los péptidos de bajo peso molecular y los esteroides. Aunque las hormonas esteroides de ambos grupos de organismos comparten similitudes en su biosíntesis y funciones generales, los mecanismos moleculares de reconocimiento y transducción de la señal hasta el núcleo de la célula son diferentes. Las fitohormonas esteroidales son las únicas hormonas vegetales con una estructura química de este tipo en las plantas, y agrupa hasta el momento a 59 miembros [3].

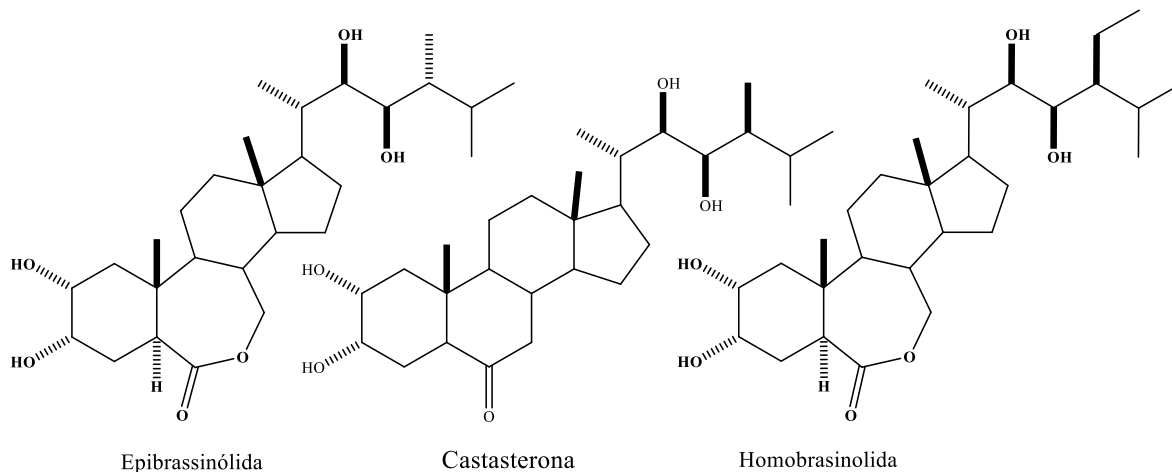


Figura 8 Estructuras de Brasinoesteroides representativos.

Las moléculas de los brasinoesteroides (Figura 8) cuentan con cuatro anillos y una cadena lateral y se forman a partir de la condensación de bloques de cinco átomos de carbono, denominados isoprenos. Los brasinoesteroides con mayor presencia en plantas son los que poseen 28 átomos de carbono con diferentes sustituyentes en dos anillos, así como en la cadena lateral. Se han identificado químicamente más de 50 brasinoesteroides de fuentes vegetales, y el brasinólido es hasta ahora el que produce la mayor actividad biológica de todos, ya que puede sintetizarse directamente del campesterol o a través de la síntesis general de los esteroides. Los esteroides vegetales, además de su papel como precursores de los

brasinoesteroides, son componentes integrantes de las membranas celulares, donde regulan su fluidez y permeabilidad.

Las diferencias en cuanto a la estructura de los brasinoesteroides naturales (Figura 9) se deben a la presencia de un oxígeno en el átomo de carbono tres y otros adicionales en el carbono dos y seis de los anillos A y B, así como en las posiciones de los carbonos 22 y 23 de la cadena lateral (de acuerdo con el orden numérico de los carbonos de los esteroides). Los análogos de brasinoesteroides son compuestos que tienen una estructura similar a los brasinoesteroides naturales y tienen una actividad muy parecida a la brasinólida.

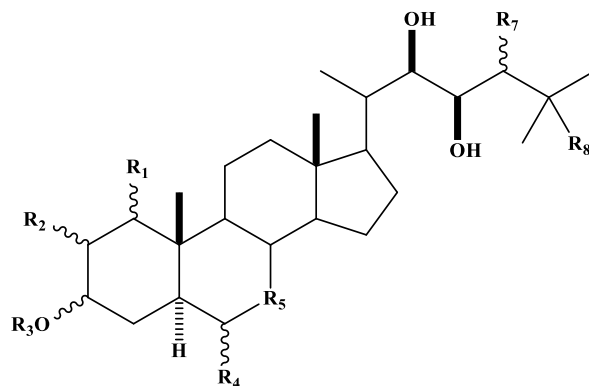


Figura 9 Estructura química de los brasinoesteroides naturales

2.3 Promotores de crecimiento vegetal

Observando el amplio potencial de los esteroides Sandoval y colaboradores han trabajado con una nueva familia de derivados 22-oxocolestánicos los cuales han presentado amplia variedad de actividad biológica como PCV, recientemente han reportado la síntesis de derivados diacetilados de diosgenina y hecogenina los cuales se evaluaron en ensayos de inclinación de lámina de arroz [5-6] y derivados 26 hidroxilados obtenidos a partir de la apertura del espiroacetal en medio ácido [21] dando, en ambos casos, resultados de actividad similares a los de un brasinoesteroide natural de referencia.

De gran importancia en nuestro grupo de investigación es el análogo PCVE4 (4) cuya síntesis y evaluación ha sido desarrollada en diversos trabajos de tesis. Dentro de los mejores reportados se encuentra el análisis de los efectos en los cultivos de maíz, jitomate, frijol y orquídeas. Su aplicación ha permitido observar la influencia y efecto de este análogo en el desarrollo de las plántulas cultivadas, en elongación celular, germinación y en respuesta a condiciones de estrés, por ello la gran importancia de la producción de derivados promotores de crecimiento vegetal que mejoren el rendimiento de diversos cultivos [5-8, 22].

En colaboración con el Jardín Botánico de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP) existe una diversidad de proyectos, como cultivo de tejidos y micropropagación de especies ornamentales, evaluación de semillas de plantas silvestres en condiciones de estrés, bioensayos para evaluar diferentes efectos de promotores de crecimiento vegetal; evaluación de la actividad antioxidante de vegetales verdes tratados con compuestos 22-oxocolestánicos y efectos producidos por promotores de crecimiento en la expresión genética de plantas, entre otros [22-23].

El uso indiscriminado de agroquímicos para aumentar la productividad de los cultivos es una práctica no amigable con el ambiente. Como estrategia para desplazar el uso de químicos agrícolas, se aplica la bioinoculación de microorganismos promotores de crecimiento vegetal. Los promotores de crecimiento vegetal (PCV), son un grupo de diferentes especies que pueden incrementar el crecimiento y productividad en las plantas. Teniendo en cuenta las propiedades de los microorganismos PCV y la versatilidad ambiental que los caracteriza, se han realizado varios esfuerzos en todo el mundo para formular y utilizar estos microorganismos como biofertilizantes. Los biofertilizantes son productos que contienen microorganismos vivos o partes activa de ellos, los cuales ejercen uno o varios efectos benéficos en las plantas, usando diferentes mecanismos [24-25].

El uso de PCV permite mejorar o reducir las diversas formas de fertilización química al suelo, e incluso en pesticidas químicos, generando de esta forma prácticas más amigables con la salud del suelo y el ambiente, mientras que al mismo tiempo se beneficia la planta y la economía del agricultor [26].

2.4 Optimización de procesos

Actualmente el concepto de optimización es empleado con mayor regularidad, esto se debe a que la forma de vida actual es competitiva y necesitamos optimizar todas nuestras actividades para poder realizarlas en menor tiempo y así ser más productivos. A nivel empresarial esto se aplica desde la planeación de recurso humano hasta los procesos de producción industriales y el diseño de equipos, en cuanto a costos, eficiencia de diseño y tiempo.

La optimización de un proceso es una técnica matemática que se aplica al modelo ajustado a dicho proceso a estudiar con la finalidad de extraer información sobre el punto óptimo [27]. Algunas técnicas empleadas son la derivada de la función, multiplicadores de Lagrange, operaciones con matrices y sistemas de ecuaciones simultáneas.

Para realizar la optimización a través de un modelo matemático es necesario que para su validez este tenga una R^2 de 0.7 como mínimo, a través del cual se explorará el valor o dirección óptima de movimiento para los siguientes experimentos necesarios a realizar.

Existen tres métodos de optimización, el primero es aplicable a modelos de primer orden y los últimos para modelos de segundo orden [27]:

1. Escalamiento ascendente: con este método se explora una nueva región experimental fuera de la región inicial, con lo que se podrá determinar la dirección del punto óptimo. Este considera que dicho punto se encuentra lejos de los valores evaluados inicialmente.
2. Análisis canónico: este método explora una región experimental con un diseño de segundo orden, ajustado a un modelo codificado que posteriormente se transforma a su forma canónica con nuevas variables relacionadas a las codificadas.
3. Análisis de cordillera: este método se dedica a la búsqueda del mejor punto dentro de la región experimental a través de calcular el máximo/mínimo de la superficie de respuesta sobre esferas concéntricas ascendentes desde el centro del diseño.

El punto óptimo es la mejor combinación de valores de los factores estudiados en la cual se considera toda la región de operabilidad [28-29].

2.5 Diseño orientado de experimentos

El diseño de experimentos (DOE según sus siglas en inglés) es un método de trabajo empleado por entidades de todos los sectores para conocer cómo funciona un proceso, estudiar las variables que le afectan y, empleando herramientas estadísticas, obtener la información necesaria para su mejora.

En el campo de la industria es frecuente hacer experimentos o pruebas con la intención de resolver un problema o comprobar una idea (conjetura, hipótesis); por ejemplo, hacer algunos cambios en los materiales, métodos o condiciones de operación de un proceso, probar varias temperaturas en una máquina hasta encontrar la que da el mejor resultado o crear un nuevo material con la intención de lograr mejoras o eliminar pérdidas.

El diseño estadístico de experimentos es precisamente la forma más eficaz de hacer pruebas, consiste en determinar cuáles pruebas se deben realizar y de qué manera, para obtener datos que, al ser analizados estadísticamente, proporcionen evidencias objetivas que permitan responder las interrogantes planteadas, y de esa manera clarificar los aspectos inciertos de un proceso, resolver un problema o lograr mejoras. Algunos casos típicos que pueden resolverse con el diseño y el análisis de experimentos son los siguientes [27]:

1. Comparar a dos o más materiales con el fin de elegir al que mejor cumple los requerimientos.
2. Comparar varios instrumentos de medición para verificar si trabajan con la misma precisión y exactitud.
3. Determinar los factores (variables) de un proceso que tienen impacto sobre una o más características del producto final.

4. Encontrar las condiciones de operación (temperatura, velocidad, humedad, por ejemplo) donde se reduzcan los defectos o se logre un mejor desempeño del proceso.
5. Reducir el tiempo de ciclo del proceso.
6. Hacer el proceso insensible o robusto a oscilaciones de variables ambientales.
7. Apoyar el diseño o rediseño de nuevos productos o procesos.
8. Ayudar a conocer y caracterizar nuevos materiales.

Tipos de diseños experimentales

2.5.1 Experimentos factoriales completos

Los experimentos con factoriales completos en la forma de arreglos ortogonales (balanceados) están bien ajustados para determinar la extensión para la cual el efecto sobre la respuesta de un cambio en el nivel de un factor difiere a niveles diferentes para los otros factores [30].

2.5.2 Experimentos factoriales fraccionarios

Los diseños factoriales fraccionarios más recientemente fueron popularizados por Taguchi. Hay disponibles un número importante de arreglos ortogonales simples, con muchas instrucciones publicadas para la selección, aplicación y análisis. Se muestran consideraciones técnicas que algunas interacciones no son consideradas aptas para ser importantes. Como mínimo se requiere un diseño de tres niveles para investigar la no linealidad.

2.5.3 Diseño anidado o jerárquico

En este diseño cada nivel de un factor dado aparece solo en un nivel único de cualquier otro factor.

2.5.4 Diseños compuestos de respuestas de superficie

Estos se usan en el desarrollo de respuestas de superficie para encontrar las combinaciones óptimas de los factores de nivel en presencia de interacciones y no linealidad y cuando solo se consideran la no linealidad de primer orden y dos interacciones.

2.5.5 Diseños mezcla

Un diseño mezcla es una clase especial de experimento en el cual la respuesta depende solamente de las proporciones relativas de los factores y no de sus cantidades absolutas. Se aplican a productos que comprenden una mezcla de dos o más ingredientes para optimizar el desempeño de varias combinaciones y mezclas.

2.5.6 Diseño Operación Evolutiva (EVOP)

La operación evolutiva avanza dentro del escenario del experimento en dos maneras específicas: uno, como un diseño extremadamente simple, y, dos, como una técnica para una

búsqueda numérica intensiva muy difícil de calcular, típicamente usando algoritmos genéticos para determinar soluciones óptimas [31].

2.6 Cuantificación por Resonancia Magnética Nuclear (qRMN)

La RMN es una técnica espectroscópica no destructiva basada en las propiedades magnéticas de la materia y se puede aplicar a cualquier sustancia en estado líquido o sólido siempre que este contenga núcleos con espín nuclear. Es ampliamente utilizada en la investigación química para elucidación estructural, determinación conformacional, cinética química, cuantificación de mezclas, análisis conformacionales y estereoquímicos, además ha cobrado gran valor en la industria para el control de calidad [34].

Es posible determinar las concentraciones por otros métodos espectroscópicos; sin embargo, se prefiere este debido a la rapidez y poca preparación de las muestras debido a que no es necesario construir una curva de calibración ya que las absorptividades de los protones son constantes [35] y no se ve afectada por interacción entre el soluto y los solventes a menos que estas señales se traslapen.

La única limitante que podría presentar es que para hacer uso de esta técnica es necesario conocer la estructura del componente que se desea determinar el rendimiento, así como la elección de las señales adecuadas y tener presente el fundamento para un correcto análisis de los resultados, de lo contrario el resultado puede ser erróneo, sin embargo, esto puede solucionarse realizando una purificación con una escala laboratorio para poder determinar estos aspectos. Sin embargo, cabe resaltar que este no necesita de una calibración intensa, requiere de pocos tiempos de lectura y es posible determinar de manera simultánea el porcentaje de distintos compuestos en una sola mezcla sin requerir de un aislamiento previo al análisis [36-37].

La qRMN es una técnica para la obtención de rendimientos mediante el análisis de espectros de ^1H -RMN; este se fundamenta en que el área bajo la curva de los picos es directamente proporcional al número de núcleos, por lo que hay una proporcionalidad entre la integral del pico y la cantidad del compuesto que está produciendo la señal en el espectro [32-33].

3. OBJETIVOS

Objetivo general

Modelar la reacción de obtención del promotor de crecimiento vegetal PCVE4 (4) a nivel laboratorio mediante el uso de un diseño de experimentos de tipo factorial.

Objetivos particulares

- Analizar los resultados del diseño orientado de experimentos para la obtención del promotor de crecimiento vegetal PCVE4 (4).
- Determinar el punto óptimo para la obtención del promotor de crecimiento vegetal PCVE4 (4).
- Construir un modelo matemático que describa el comportamiento de la reacción de obtención del promotor de crecimiento vegetal PCVE4 (4).

4. METODOLOGÍA

En este capítulo se describe la metodología que se desarrolló en la presente investigación (Figura 10) donde se engloban todos los reactivos y equipos que se utilizaron, así como las técnicas de purificación y caracterización empleadas.



Figura 10 Diagrama de flujo de la metodología empleada.

La experimentación del diseño ya estaba realizada previamente por un compañero del laboratorio, este trabajo se centra en el análisis de los resultados, la obtención del punto óptimo y desarrollar un modelo matemático que describa su comportamiento, pero para llevar a cabo estos puntos es necesario conocer el proceso por lo que en la primera etapa se realizó la síntesis del PCVE4 (4) y su debida caracterización a partir de elucidación por comparativa por RMN ya que son puntuales los cambios observados entre estos y dichas señales fueron utilizadas como referencia para poder determinar los rendimientos mediante qRMN. Posteriormente se llevó a cabo el análisis de los resultados experimentales para encontrar el

punto con mayor rendimiento y mediante el uso de herramientas estadísticas se determinó si el efecto de las variables evaluadas es de importancia.

4.1 Resonancia Magnética Nuclear.

Se utilizó el método de resonancia magnética nuclear para la caracterización del compuesto y la comparativa para corroborar los datos reportados previamente a través de la asignación de sus señales características mediante espectros 1D (^1H y ^{13}C), los cuales se obtuvieron con un equipo Bruker de 500 MHz empleando como disolvente cloroformo deuterado (CDCl_3) conteniendo tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Los desplazamientos químicos se expresan en ppm (δ). Las constantes de acoplamiento (J) están expresadas en Hertz (Hz).

4.2 Cromatografía.

Se realiza la purificación de la mezcla obtenida en la reacción mediante la técnica de cromatografía y posteriormente la caracterización para seleccionar las señales de referencia. Se emplearon columnas empacadas con gel de sílice de 230-400 mallas grado 60 y se utiliza un sistema eluyente de hexano-acetato de etilo.

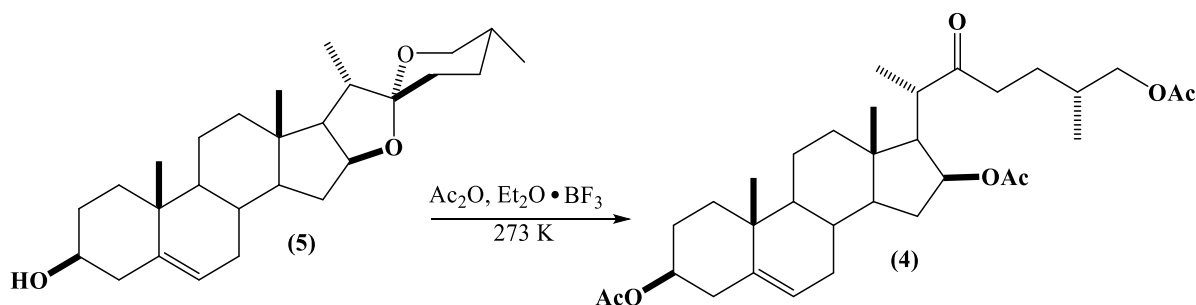
4.3 Disolventes y materias primas.

La materia prima para la obtención del PCVE4 (**4**) fue diosgenina (Chemical-Guilps 93%).

Los reactivos utilizados fueron anhídrido acético (Ac_2O) y eterato de trifluoruro de boro ($\text{Et}_2\text{O}\cdot\text{BF}_3$), de grado analítico, marca Sigma-Aldrich.

Los disolventes empleados fueron diclorometano, hexano y acetato de etilo, adquiridos en grado técnico los cuales se purificaron previo a su uso, mediante destilación simple con la finalidad de remover los contaminantes, además fueron secados con sulfato de sodio anhidro para retirar trazas de humedad.

4.4 Obtención del PCVE4 (4)



Esquema 1 Apertura del spiroacetal de diosgenina para obtener (4).

Se disolvieron 0.241 mmol de diosgenina en 10 mL de CH_2Cl_2 , paralelamente se preparó una disolución de 2.253 mmol de anhídrido acético y 1.136 mmol de $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, ambas disoluciones se enfriaron a 273 K. La segunda solución se adicionó a la de **5** y el tiempo de reacción fue de 15 min con agitación constante manteniendo la temperatura a 273 K. La reacción se finalizó adicionando agua a la misma temperatura, el producto se extrajo con CH_2Cl_2 se neutralizó con una disolución saturada de bicarbonato de sodio, se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida. El compuesto de interés (**4**) fue purificado por cromatografía en columna utilizando gel de sílice como fase estacionaria y un sistema eluyente hexano-acetato de etilo (8:2).

4.4.1 Caracterización de los compuestos utilizados.

Diosgenina (**5**):

RMN ^1H (500 MHz) δ : 5.35 (1H, ddd, $J_{6-7a} = 5.3$ Hz, $J_{6-7e} = J_{6-4a} = 2.0$ Hz, H-6), 4.41 (1H, ddd, $J_{16-17} = 8.7$ Hz, $J_{16-15a} = 7.5$ Hz, $J_{16-15e} = 6.4$ Hz, H-16), 3.53 (1H, dddd, $J_{3-2a} = 11.8$ Hz, $J_{3-2e} = 6.8$ Hz, $J_{3-4a} = 5.9$ Hz, $J_{3-4e} = 4.4$ Hz, H-3), 3.47 (1H, ddd, $J_{\text{gem}} = 10.9$ Hz, $J_{26e-25} = 4.4$ Hz, $J_{26e-24e} = 2.1$ Hz, H-26e), 3.38 (1H, t, $J_{\text{gem}} = J_{26a-25} = 10.9$ Hz, H-26a), 1.86 (1H, dd, $J_{20-17} = 6.4$ Hz, $J_{20-21} = 3.0$ Hz, H-20), 1.03 (3H, s, CH_3 -19), 0.97 (3H, d, $J_{21-20} = 7.0$ Hz, CH_3 -21), 0.79 (3H, d, $J_{27-25} = 3.2$ Hz, CH_3 -27), 0.79 (3H, s, CH_3 -18).

RMN ^{13}C (125 MHz) δ : 37.2 (C-1), 31.4 (C-2), 71.7 (C-3), 42.2 (C-4), 140.8 (C-5), 121.4 (C-6), 32.0 (C-7), 31.6 (C-8), 50.0 (C-9), 36.6 (C-10), 20.8 (C-11), 39.9 (C-12), 40.4 (C-13), 56.5 (C-14), 31.8 (C-15), 80.8 (C-16), 62.0 (C-17), 16.2 (C-18), 19.4 (C-19), 41.6 (C-20), 14.5 (C-21), 109.3 (C-22), 31.3 (C-23), 28.8 (C-24), 30.3 (C-25), 66.8 (C-26), 17.1 (C-27).

PCVE4:

NMR ^1H (500 MHz) δ : 5.36 (1H, dd, $J_{6-4a} = 4.5$ Hz, $J_{6-7} = 2.7$ Hz, H-6), 4.99 (1H, dddd, $J_{16-17} = J_{16-15e} = 8.3$ Hz, $J_{16-15a} = J_{16-14} = 3.6$ Hz, H-16), 4.60 (1H, m, H-3), 3.43 (2H, d, $J_{26-25} = 5.9$ Hz, H-26), 2.03 (3H, s, H-16"), 1.97 (3H, s, H-3"), 1.14 (3H, dd, $J_{21-20} = 7.0$ Hz, $J_{21-17} = 3.6$ Hz, H-21), 1.02 (3H, s, H-19), 0.91 (3H, d, $J_{27-25} = 6.7$ Hz, H-27), 0.87 (3H, s, H-18).

RMN ^{13}C (125 MHz) δ : 36.8 (C-1), 27.7 (C-2), 73.8 (C-3), 169.9 (C-3'), 21.2 (C-3''), 38.0 (C-4), 139.6 (C-5), 122.3 (C-6), 31.6 (C-7), 31.2 (C-8), 49.7 (C-9), 36.5 (C-10), 20.7 (C-11), 39.6 (C-12), 41.9 (C-13), 53.9 (C-14), 34.8 (C-15), 75.7 (C-16), 170.6 (C-16'), 21.5 (C-16''), 55.1 (C-17), 13.2 (C-18), 19.3 (C-19), 43.5 (C-20), 16.9 (C-21), 213.7 (C-22), 38.0 (C-23), 26.2 (C-24), 35.5 (C-25), 67.5 (C-26), 16.7 (C-27).

4.5 Análisis del diseño de experimentos

Se realizó el análisis de un diseño de experimentos factorial n^k (2^4) mediante el estudio estadístico del efecto de las variables evaluadas, tiempo (A), temperatura de reacción (B), moles de anhídrido acético (C) y los moles de BF_3 (D) haciendo uso del software Minitab 18 [38]. Primero para la generación del DOE una vez configuradas las especificaciones del diseño en la sección estadísticas > DOE > Factorial > Crear diseño factorial. Posteriormente al tener la tabla de resultados experimentales se realizó el análisis en la sección estadísticas > DOE > Factorial > Analizar DOE.

4.6 Modelo matemático

Una vez determinada la importancia de las variables estudiadas sobre la influencia en el rendimiento del PCVE4 se realizó el ajuste de los datos con el software Minitab 18 a modelos de contribución de las variables elegidas en la sección estadísticas > Regresión > Gráfica de línea ajustada.

5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Se presentan los resultados obtenidos mediante la metodología descrita en el capítulo anterior, estos se dividen en tres secciones (Figura 11 **Error! Reference source not found.**). La primera etapa consta de los resultados de síntesis y caracterización de la materia prima (5) y el promotor de crecimiento vegetal (4) con la finalidad de seleccionar las señales a emplearse como referencia en los espectros de ^1H de RMN para la cuantificación de los rendimientos, después se presenta el análisis de los datos del diseño de experimentos factorial diseñado y evaluado para determinar el efecto de las variables involucradas en la reacción, y se presenta el punto óptimo para la síntesis de 4. Finalmente, se presenta el desarrollo y evaluación de modelos matemáticos independientes y contributivos para la descripción del comportamiento de la reacción de apertura para obtener el PCVE4.

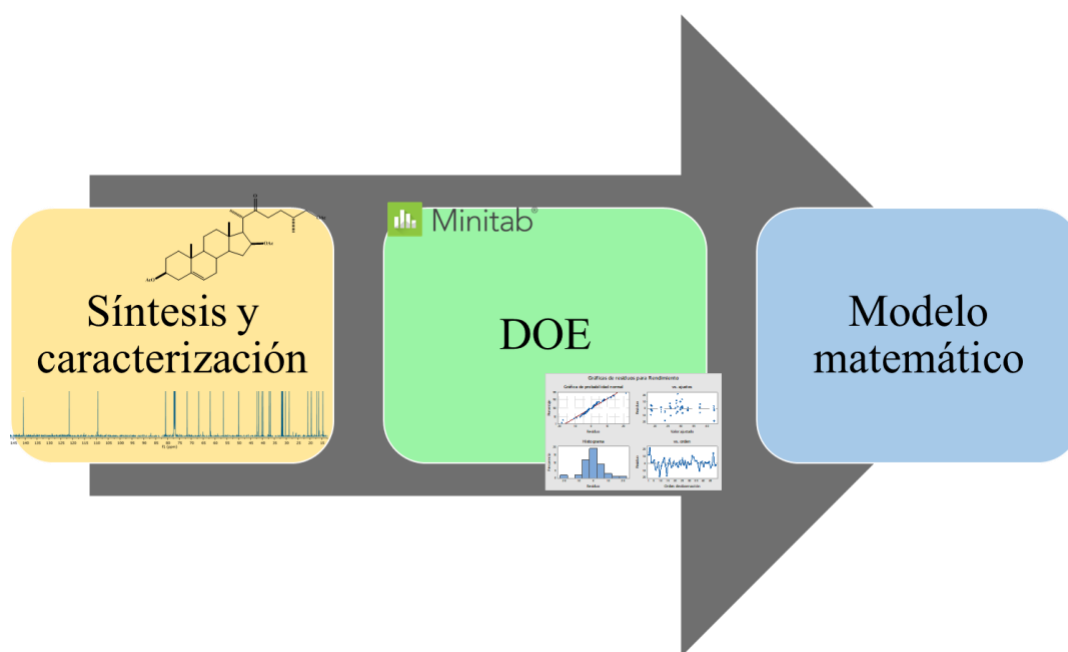


Figura 11 Esquemización del orden de presentación de los resultados de este trabajo.

5.1 Síntesis

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos a partir de la metodología descrita en el capítulo anterior, los cuales se dividen en 3 secciones. Primero se presentan los resultados obtenidos de la síntesis, caracterización espectroscópica y elección de las señales de referencia. Posteriormente se presentan los resultados del análisis de las variables estudiadas en el diseño de experimentos para la obtención del PCVE4 (4).

5.1.1 Diosgenina: caracterización y selección de señal de referencia.

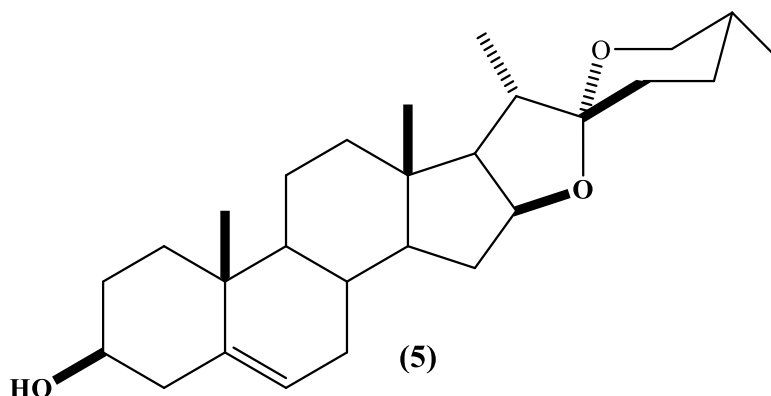


Figura 12 Estructura de disgenina (5).

Se realizó la caracterización mediante espectros de RMN por comparativa ya que este compuesto (Figura 12 **Error! Reference source not found.**) ha sido ampliamente reportado en bibliografía [39], se discutirán señales características que se usaron como referencia para la caracterización del PCVE4 (4).

En el espectro de ^1H (Figura 13), a 5.35 ppm, se observa la señal a mayor frecuencia correspondiente al protón vinílico H-6, a 4.41 ppm se encuentra la señal de H-16 como un *ddd* debido a las interacciones con el protón de C-17 y los dos de C-15. En 3.53 ppm se observa una señal *ddd* correspondiente a H-3, seguido de las señales de los protones diastereotópicos de C-26 en 3.47 y 3.38 ppm de H-26eq y H-26ax respectivamente, estas últimas tres señales se encuentran ligeramente traslapadas debido al ambiente químico similar en el que se encuentran estos protones y finalmente, las señales de los grupos metilo de la molécula, CH₃-19 en 1.03 ppm, CH₃-21 en 0.97 ppm, CH₃-18 y CH₃-27 en 0.79 ppm ambas.

Para corroborar algunas de las modificaciones se usaron señales del espectro de ^{13}C (Figura 14) en el cual se observan las 27 señales de carbonos que contiene la molécula, siendo las de referencia las correspondientes al carbono cuaternario C-5 en 140.8 ppm que debido a la presencia del doble enlace aparece a frecuencia alta seguido de la señal del carbono vecino, C-6, en 121.4 ppm. En 109.3 ppm se observa la señal que corresponde a C-22 espiroacetálico, esta señal sirvió para corroborar la apertura del espiroacetal en las modificaciones posteriores. Las señales de C-16, C-3 y C-26 se observaron en 80.8, 71.7 y 66.8 ppm respectivamente, todos con base de oxígeno. Finalmente, en la región de 14 a 20 ppm se pueden apreciar las señales de los metilos de C-19, C-27, C-18 y C-21 en 19.4, 17.1, 16.2 y 14.5 ppm respectivamente.

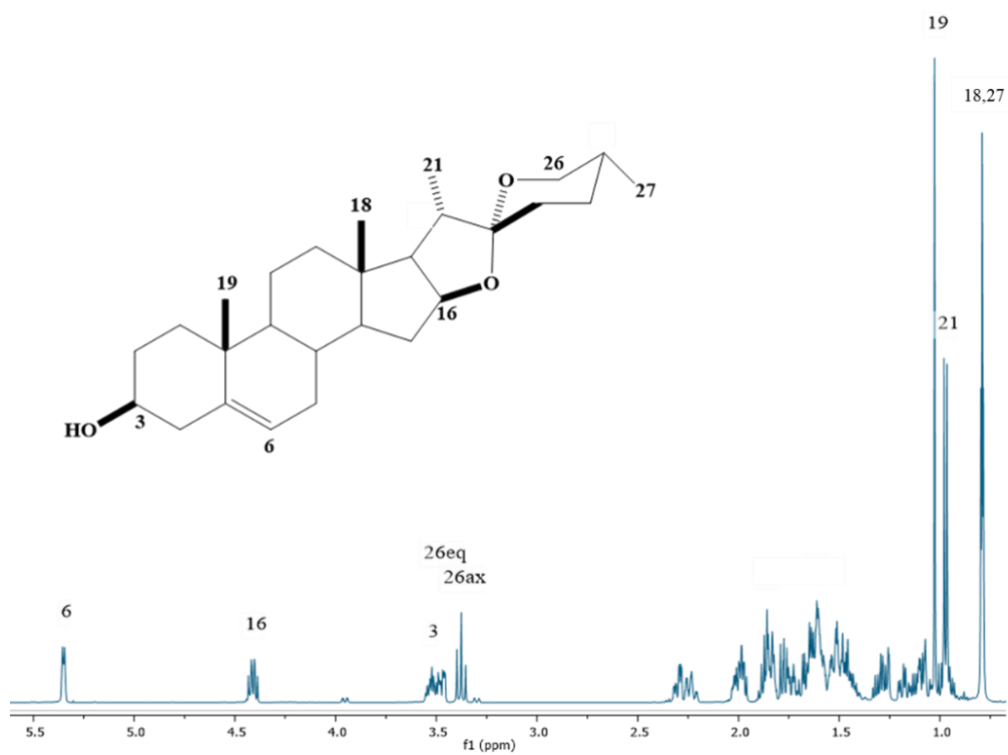


Figura 13 Espectro de RMN 1H a 500 MHz de diosgenina (5).

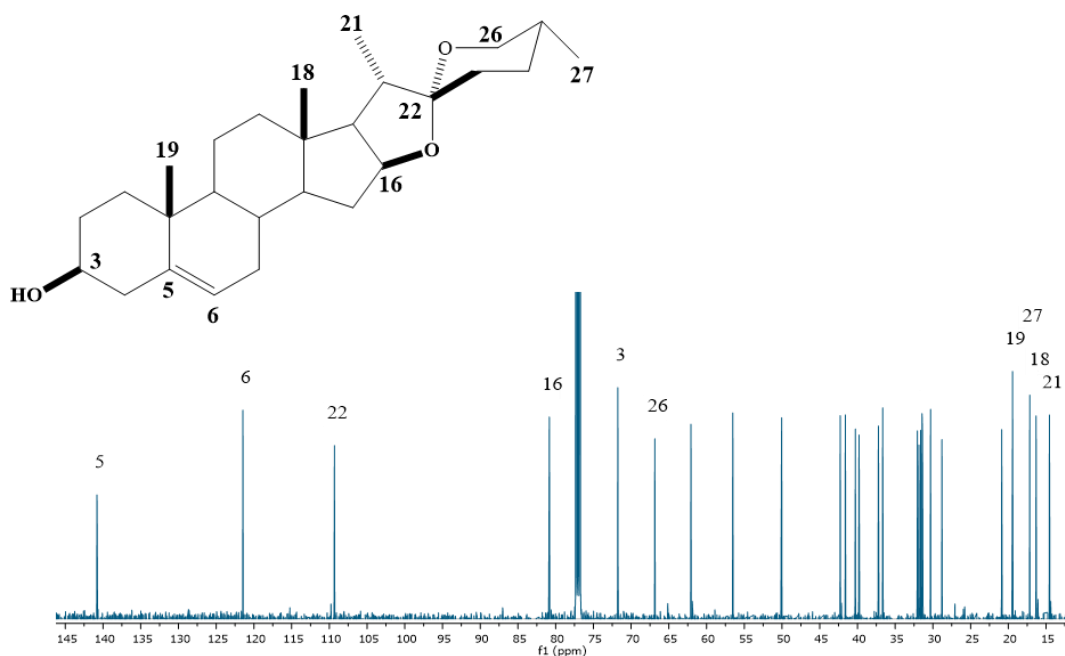


Figura 14 Espectro de RMN 13C a 125 MHz de diosgenina (5).

Ya con las señales características de la materia prima fue posible realizar la asignación por comparativa del PCVE4 (4), los rendimientos obtenidos por el grupo de investigación de este producto se encuentran de 70-80% [40], la importancia de su optimización a pesar de presentar rendimientos elevados se debe a que esto es posible al realizarlo en lotes pequeños de 1-3 gramos pero no más ya que los fenómenos de transporte toman mayor relevancia al aumentar las proporciones resultando en una disminución del producto de interés.

5.1.2 PCVE4 (4): caracterización y selección de señal de referencia.

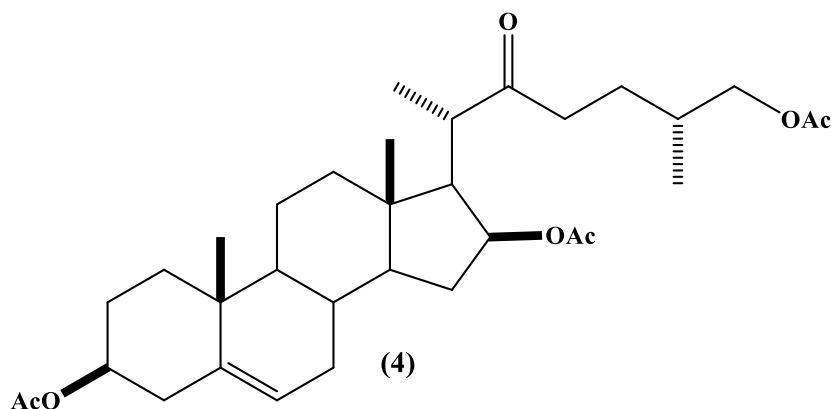


Figura 15 Estructura del PCVE4 (4).

PCVE4 (4) se obtuvo mediante la apertura del anillo E y el espiroacetal de diosgenina el cual se llevó a cabo utilizando un ácido de Lewis ($\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$) (el cual cataliza la formación del ión oxonio y esto da lugar a la protección del oxígeno en C-16 con un grupo acetato, al igual que con el grupo hidroxilo en C-3. Posteriormente, se adicionó agua a la reacción dando pie con esto a la apertura del espiroacetal con la formación de la cadena 22-oxocolestánica con un grupo hidroxilo en C-26 y que al estar en presencia de anhídrido acético en el medio se obtiene el acetato ya que sus carbono base de carbonilo son susceptibles a un ataque por parte del alcohol en C-26. A pesar de ser PCVE4 (4) el producto mayoritario se presentan ciertas desventajas que afectan el rendimiento de la reacción al formarse subproductos, entre ellos el derivado sustituido con hidroxilo en C-26.

La obtención 4 se corroboró por elucidación comparativa con la caracterización de diosgenina tomando las señales de referencia antes descritas. Al realizar la apertura del espiroacetal y generar la cadena lateral confiriéndole mayor libertad a los protones, esto ocurre con los H-26 que se pueden observar en el espectro de ^1H en la Figura 16 como una sola señal base de acetato a 3.43 ppm pues al tener libre giro se detectan como uno mismo, tras la modificación también C-3 es base de acetato así como C-16 cambiando así su ambiente químico por lo que la señal de sus protones se desplazan a frecuencias mayores por la deficiencia electrónica, H-3 a 4.60 ppm y H-16 a 4.99 ppm. Como se mencionó C-3 y C-6 presentan sustitución por grupo acetato, lo que implica la presencia de dos nuevas señales correspondientes a sus CH_3 las cuales se observan como s que integran para 3H cada una, a 2.1 ppm y 1.97 ppm CH_3 -16'' y CH_3 -3'' respectivamente.

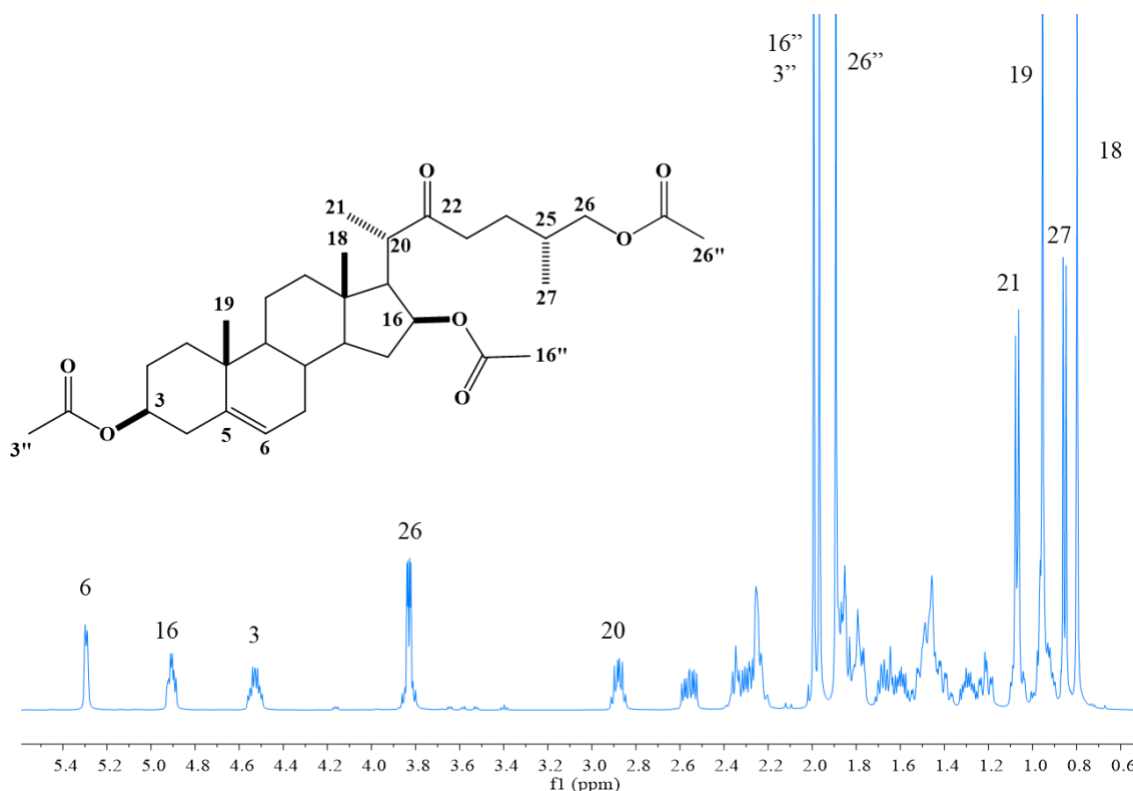


Figura 16 Espectro de RMN 1H a 500 MHz de PCVE4 (4).

En la estructura podemos observar que el doble enlace no se ve afectado y esto a través del espectro se corroboró con la señal del protón vinílico H-6 a 5.36 ppm el cual no presenta desplazamiento con respecto del de su materia prima, a frecuencias menores podemos observar las señales de los grupos metilo cuyo desplazamiento es mínimo debido a la apertura del espiroacetal, CH₃-19 en 1.02 ppm, CH₃-21 en 1.14 ppm y CH₃-18 en 0.87 ppm y CH₃-27 en 0.97 ppm.

En el espectro de ¹³C (Figura 17) podemos observar el desplazamiento de la señal de C-22 ahora base de carbonilo a una frecuencia mayor a 213.7 ppm, se observan 4 señales nuevas que corresponden a los carbonos de acetato, cada grupo posee uno base de carbonilo que se encuentra a frecuencias altas y uno de metilo a frecuencias menores, en 170.6 y 169.9 ppm se encuentran C-3' y C-16', en 21.5 y 21.2 ppm CH₃-16'' y CH₃-3'' respectivamente además por la presencia de estos grupos C-16 y C-3 se ven ligeramente desplazados a 75.7 y 73.8 ppm. En el espectro de ¹³C también podemos observar que los C-5 y C-6 vinílicos no sufren desplazamiento ya que no se ven afectados por las modificaciones dejando sus señales en 140 y 122 ppm. C-26 paso de ser CH₂ dentro de un anillo a uno de cadena lineal lo que le confiere menor rigidez el cual se ve reflejado en un desplazamiento mínimo, a 68 ppm. Finalmente, en el intervalo de 10 a 20 ppm se observan las señales de los metilos.

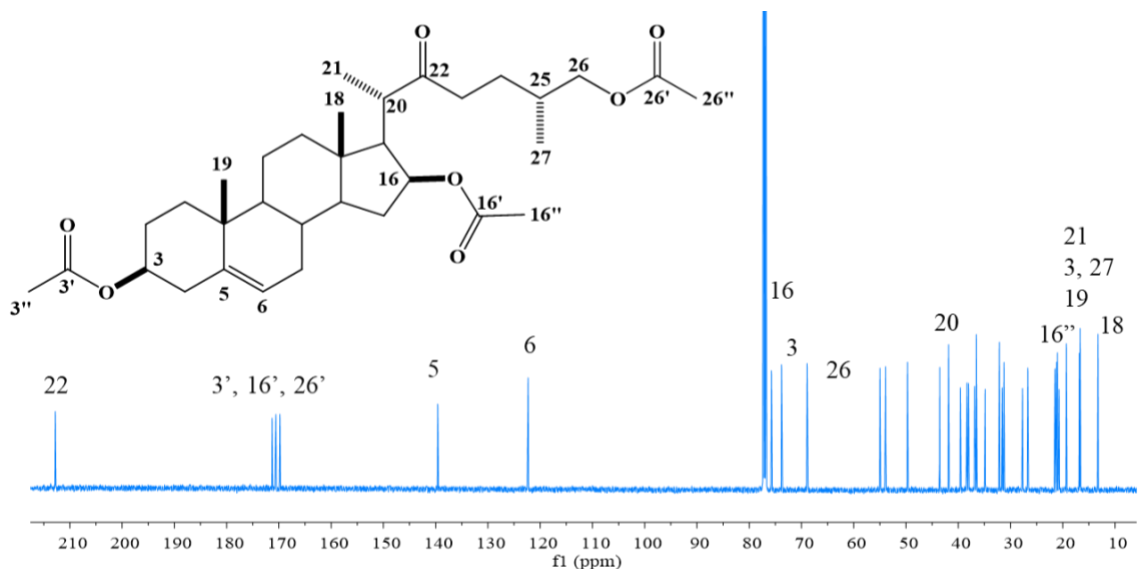


Figura 17 Espectro de RMN ^{13}C a 125 MHz de PCVE4 (4).

5.2 Análisis del Diseño Orientado de Experimentos

Como se mencionó previamente, en la síntesis del PCVE4 se obtienen subproductos y al aumentar la proporción de estos se genera una disminución en el rendimiento del compuesto de interés debido a la influencia de las variables involucradas, para poder determinar el grado de importancia de 4 de las variables del proceso, temperatura, tiempo y los moles de ácido acético y BF_3 se realizó el análisis de un diseño de experimentos, realizado previamente por compañeros de LESQO, factorial, de tipo n^k para la optimización de la reacción, ya que mediante este diseño es posible la evaluación multifactorial sobre una misma variable de respuesta, donde, las variables fueron evaluadas en dos niveles (Tabla 1) y los resultados constan de un total de 48 experimentos correspondientes a 16 tratamientos por triplicado (Tabla A). Para el análisis estadístico y poder determinar cuáles variables resultan de importancia se utilizó el software Minitab 18.

Para seleccionar los límites del diseño se tomaron como referencia las condiciones reportadas previamente [5-6], en el caso de la temperatura para el límite superior, así como el inferior se consideraron 5 K de diferencia hacia arriba y hacia abajo respectivamente considerando que un proceso a mayor escala implica un mayor requerimiento para el control de una temperatura completamente constante. En cuanto al tiempo y cantidad de ambos reactivos se consideró un criterio similar, donde la finalidad es evaluar los márgenes de considerar mayores y menores valores, en el tiempo poder determinar el efecto de que la reacción continúe por casi el doble de la referencia o que se corte a menos de la mitad, y lo mismo con los reactivos.

Tabla 1 Resumen de las variables evaluadas en el diseño de experimentos.

Variable	Límite superior	Límite inferior
Temperatura (K)	278	268
Tiempo (min)	25	5
Ácido acético (mmol)	5.191	1.273
BF ₃ •EtO ₂ (mmol)	1.8940	0.1890

Para determinar el rendimiento del PCVE4 en cada uno de los experimentos este se cuantifico a través de la integración de la señal de H-26, tomando como referencia H-6 como 1H (un protón) ya que este protón no presenta un desplazamiento significativo entre la materia prima y el producto (Figura 18)

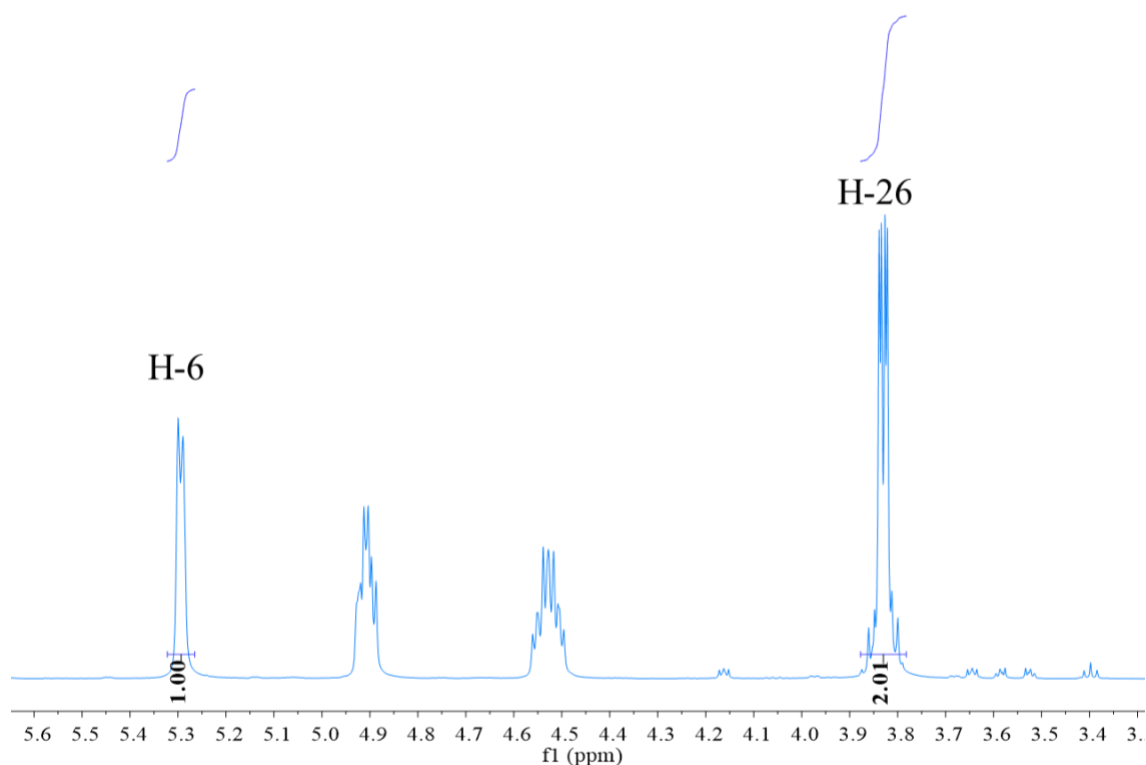


Figura 18 Espectros de RMN integrados para calcular el rendimiento de reacción.

A continuación, se describen las ecuaciones empleadas para determinar el rendimiento a partir del valor de la integral de las señales de referencia.

$$\% \text{ de } \mathbf{4} = 100 * \frac{\frac{1}{2}(\text{Int. H-26})}{\text{Int. H-6}} \quad \text{---Ec. 1}$$

Donde,

Int. H-26 es la integral para la señal de H-26

Int. H-6 es la integral para la señal de H-6

En la primera etapa para determinar el efecto de las variables estudiadas, a través de la gráfica de efectos normales estandarizados generada con el análisis de los datos experimentales nos indica que los factores que están más distantes de 0 son significativos estadísticamente hablando. En específico en la Figura 19 (izquierda) podemos observar que los moles de anhídrido acético (C) y los moles de BF_3 (D) son significativos con $\alpha = 0.05$ lo que indica que el efecto de la de estos dos factores sobre el rendimiento son los más importantes. Para poder determinar la dirección que toma el efecto de estas dos variables en la Figura 19 (derecha) podemos observar la gráfica normal de efectos en donde los moles de anhídrido acético (C) y de BF_3 (D) tienen efectos estandarizados negativos, lo cual indica que cuando estas variables disminuyen el rendimiento aumenta.

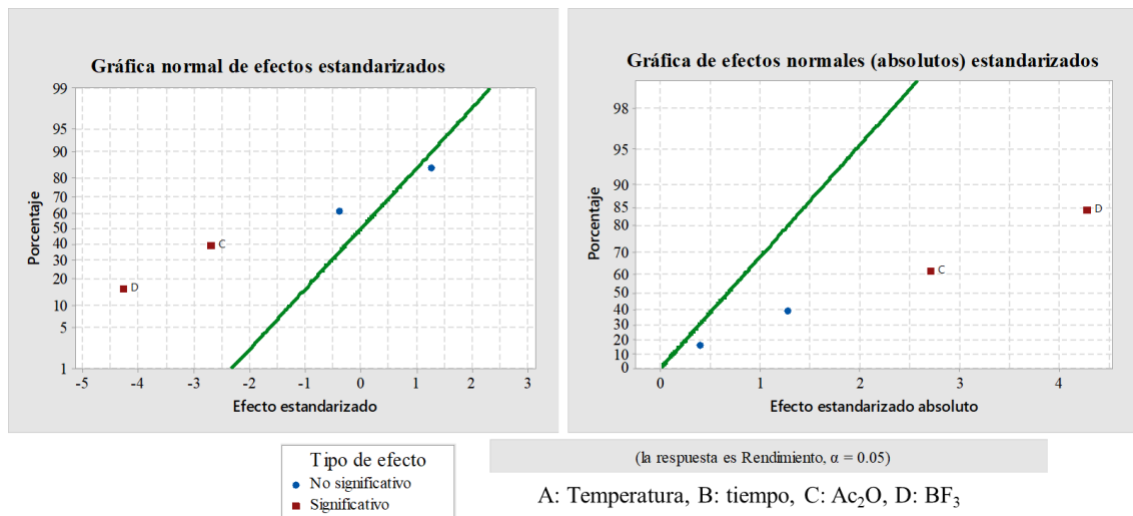


Figura 19 Gráfica de efectos estandarizados.

De la Figura 20 donde se observa la gráfica de probabilidad normal, podemos decir que los residuos sí presentan una distribución normal, en cuanto a la gráfica vs ajustes notamos que la varianza de los residuos permanece constante ya que se distribuyen alrededor del valor cero. En la gráfica vs orden podríamos decir que los datos son independientes entre sí, mediante el análisis de las gráficas determinamos que el modelo empleado es válido, sin embargo, se presentan valores atípicos como podemos notar en el histograma los cuales pueden afectar los resultados.

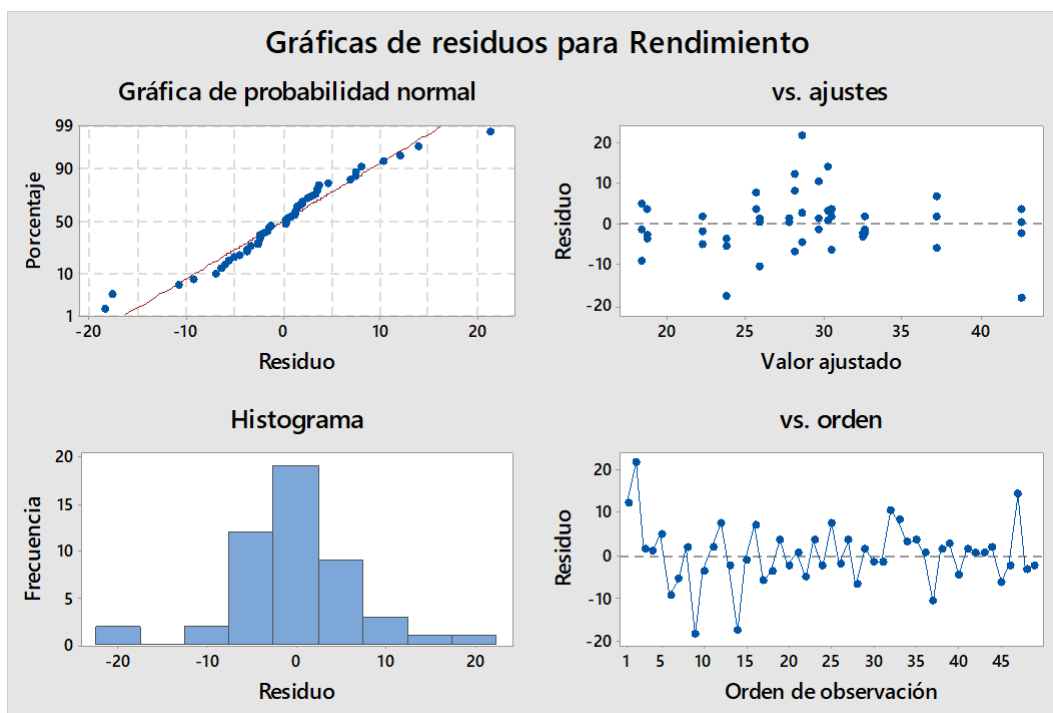


Figura 20 Gráfica de residuos para los resultados experimentales de obtención de PCVE4.

Habiendo determinado que es el efecto de los reactivos los que presentan mayor influencia sobre el rendimiento se procedió a encontrar el punto óptimo, considerando los niveles de mayor conveniencia para la temperatura de reacción y el tiempo, esto por comodidad y ya que su efecto no es significativo, analizando los resultados de la Tabla 2 podemos observar que para obtener el PCVE4 en un rendimiento de 40% la reacción debe realizarse con 2.253 mmol de anhídrido acético y 1.136 mmol de $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ a 273 K y 20 minutos.

Tabla 2 Resumen de resultados experimentales del diseño para la obtención del PCVE4

Tratamiento	Temperatura (K)	Tiempo (min)	Ac_2O (mmol)	$\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (mmol)	Rendimiento %
1	273	25	2.253	1.136	32 ± 8.2
2	273	20	2.253	1.136	35 ± 11.0
3	273	10	2.253	1.136	33 ± 5.1
4	273	5	2.253	1.136	36 ± 5.7
5	275	15	2.253	1.136	30 ± 0.5
6	275	15	2.253	1.136	30 ± 4.3

7	271	15	2.253	1.136	28 ± 0.5
8	268	15	2.253	1.136	23 ± 5.4
9	273	15	5.191	1.136	18 ± 3.1
10	273	15	4.212	1.136	20 ± 2.9
11	273	15	3.232	1.136	32 ± 1.9
12	273	15	1.273	1.136	32 ± 1.7
13	273	15	2.253	0.568	38 ± 5.4
14	273	15	2.253	0.189	38 ± 8.5
15	273	15	2.253	1.515	15 ± 6.2
16	273	15	2.253	1.89432	16 ± 5.7

5.3 Modelo Matemático

Teniendo presente que es el efecto del anhídrido acético y el BF₃ los que ejercen influencia significativa sobre el rendimiento para el diseño del modelado de la reacción se realizó a través del software Minitab 18 una regresión lineal en primera instancia, de esta se obtuvo el modelo correspondiente que a continuación se presenta:

$$\text{Rendimiento} = -219 - 0.120 \text{Tiempo} + 1.009 \text{Temperatura} - 3.62 \text{Ac}_2\text{O} - 14.77 \text{BF}_3 \text{ --- Ec. 2}$$

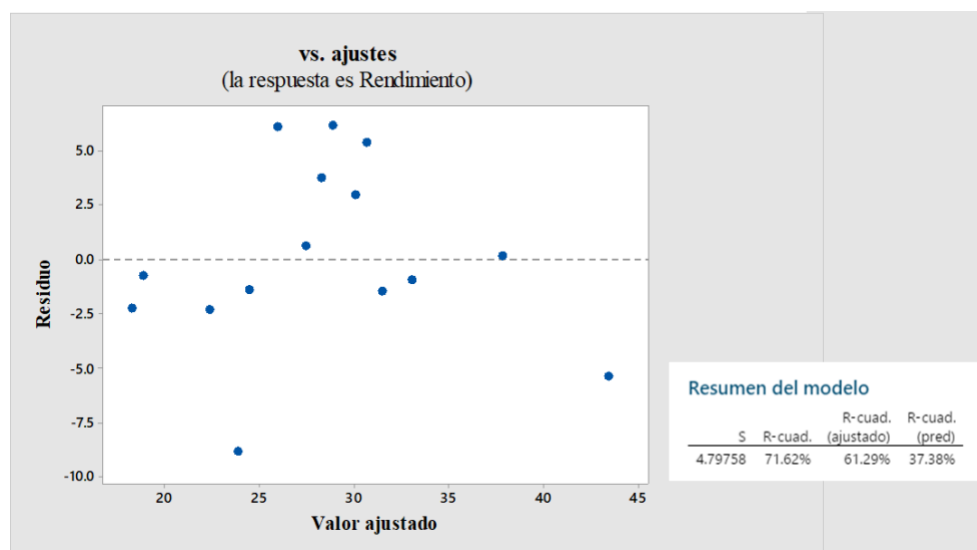


Figura 21 Gráfico de ajuste vs residuos del modelo lineal para los datos experimentales de obtención de PCVE4.

Como se observa en la Figura 21 este primer ajuste presenta una desviación estándar de 7.3439 lo que es un valor con mucho error, hecho que se confirma con el coeficiente de

determinación (R^2) que es de 45% dando así un error promedio del 11% para el modelo lineal (Ec. 2). El análisis descrito se realizó con la finalidad de tener un patrón de referencia con el cual comparar el modelo diseñado a partir de los ajustes realizados a cada una de las variables.

Partiendo del análisis de tendencias se realizó un ajuste del efecto independiente de cada una de las variables sobre el rendimiento del PCVE4 (4), a partir de esto se seleccionó el tipo de polinomio que mejor describe cada comportamiento (Tabla 3) con ellos se construyó un modelo matemático contributivo (Ec. 3) que involucra solo a las variables significativas.

$$\text{Rendimiento} = 37.6161 - 0.112821Ac_2O^3 - 3.3619BF_3^3 \text{ ---Ec. 3}$$

A continuación, se presenta la tabla de resumen de los ajustes de cada variable de manera independiente a los datos obtenidos con el diseño de experimentos. Para todas se modeló con un polinomio de grado 3, excepto para la temperatura siendo de grado 2, con un coeficiente de determinación de 1 para unos casos y muy cercano a 1 para otros lo que indica un gran ajuste del modelo para cada variable.

Tabla 3 Resumen de modelos ajustados a la variación del rendimiento con las variables de estudio.

Variables	Modelo	R^2
Tiempo	Polinómico grado 3	0.9998
Temperatura	Polinómico grado 2	0.9841
Ac ₂ O	Polinómico grado 3	1.000
BF ₃	Polinómico grado 3	1.000

Este modelo fue analizado estadísticamente con los datos experimentales del DOE para determinar el grado de ajuste y asegurar que este sea adecuado para su futura aplicación en la optimización y escalamiento a nivel planta piloto. Sin embargo, a pesar de que sus parámetros son aparentemente mejores que los del modelo lineal presenta una desviación estándar de 7.1298 con SSE final de 2338. Al determinar el error entre los datos experimentales y los teóricos esperados con el modelo se obtuvo un error promedio de 14%, lo cual representa un ajuste peor que el lineal (Figura 22) la consideración realizada para este es únicamente de las variables de mayor importancia determinadas en el trabajo previo antes mencionado, donde son los moles de ambos reactivos los que representan un efecto significativo sobre la respuesta.

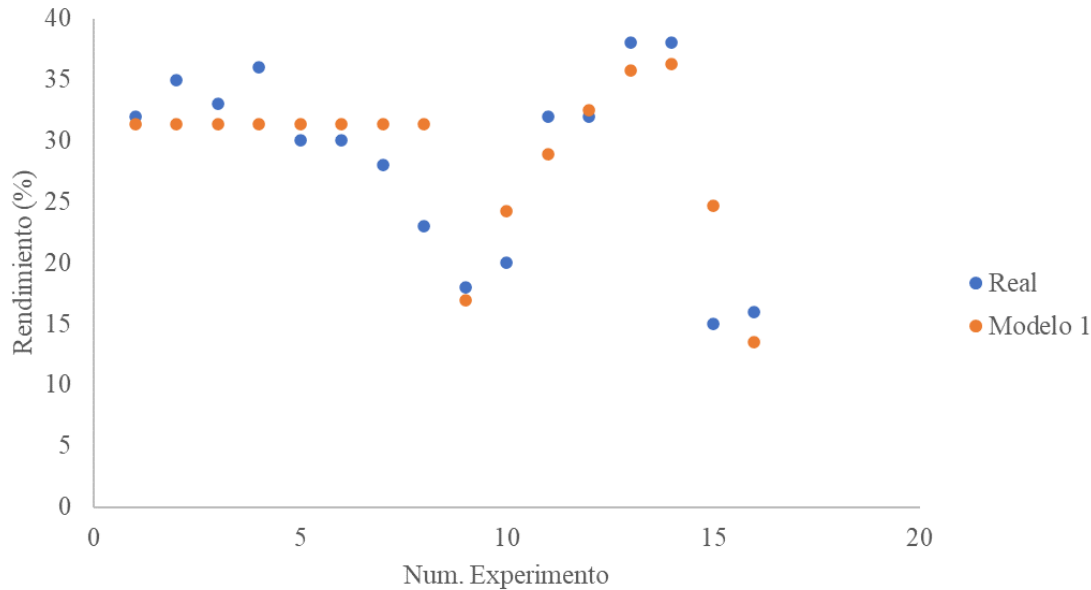


Figura 22 Variación entre resultados teóricos del modelo 1 y experimentales.

Para poder asegurar que las otras dos variables, temperatura de reacción y el tiempo no presentan un efecto importante sobre el rendimiento, se diseñó un modelo que incluya estos términos (Ec. 4).

$$Rendimiento = -119.54 - 0.113324Ac_2O^3 - 3.63667BF_3^3 + 0.00210956 Temperatura^2 + 4.11348x10^{-0.005}Tiempo^3 \quad \text{--- Ec. 4}$$

Los parámetros obtenidos para este modelo son, una desviación estándar de 7.1216 con SSE final de 2282, siendo estos valores menores que el modelo que no los contiene, al determinar el error promedio obtenido de comparar los resultados teóricos del modelo con los experimentales (Figura 23) siendo este valor del 13.6 % lo que nos indica que ambos modelos, el que solo incluye a la cantidad de reactivo y este que incluye todos los términos se encuentran dentro del mismo rango y como primer aproximado son un buen modelo para la optimización a nivel laboratorio. Sin embargo, es el modelo lineal el que representa menor error dentro del intervalo de las variables evaluadas y por su sencillez del modelo representa una mejor opción para trabajar, ahora bien es necesario como perspectivas de este trabajo llevar a cabo estudios con mayor detalle para el proceso de optimización en el que se involucra la prueba de condiciones fuera de los límites de operación aquí estudiados que permitan corroborar el ajuste de dicha expresión para considerarla en el escalamiento mediante el uso de otras herramientas de optimización.

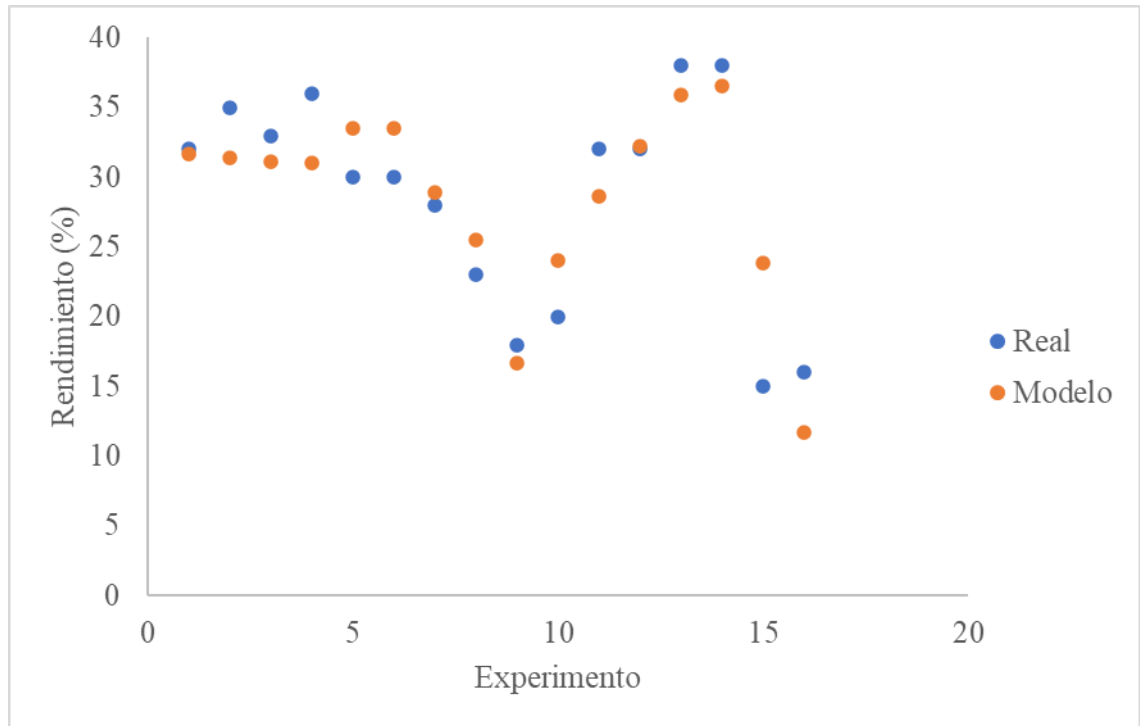


Figura 23 Variación entre resultados teóricos del modelo completo y experimentales.

6. CONCLUSIONES

Se determinó que para maximizar a nivel laboratorio la obtención del promotor de crecimiento vegetal 22-oxocolestánico, PCVS4 (4), las condiciones óptimas de producción son 273 K (0 °C) durante 20 minutos de reacción empleando las cantidades estequiométricas sugeridas por la metodología, una relación molar 1:4.7 y 1:9.4 diosgenina:BF₃ y diosgenina:Ac₂O respectivamente, en búsqueda del escalamiento a un nivel mayor se evaluaron modelos matemáticos de tipo contributivos con la finalidad de seleccionar aquel que presentara un mejor ajuste, que en este caso es un modelo lineal el que describe mejor el comportamiento del sistema, que permitirá diseñar nuevos experimentos a fin de incrementar la especificidad de la reacción hacia el producto deseado que será empleado en un futuro para la optimización del proceso a nivel banco.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] I. Corona, «cefp,» 2016. [En línea]. Disponible en: https://cefp.gob.mx/formulario/Trabajo_12a.pdf. [Último acceso: 30 Agosto 2021].
- [2] A. Macías, Y. L. Sevilla, “Desarrollo agroindustrial y degradación ambiental en México (1941-2021)”, *Obs. Medioambient.* vol. 24, pp. 195-228, 2021.
- [3] E. Hernández, I. García, “Brasinoesteroides en la agricultura”, *Rev. Mex. Cienc. Agric.* vol. 7, no. 2, 2016.
- [4] J. Li, *Encyclopedia of Hormones*, pp. 214-219, 2003.
- [5] R. Zeferino, J. Hilario, R. Rodríguez, C. A., M. Hernández, J. Sandoval y M. Fernandez, “22-Oxocholestanes as plant growth promoters” *Steroids*, vol. XCVIII, pp. 126-131, 2015.
- [6] R. Zeferino-Díaz, J. C. Hilario-Martínez, M. Rodríguez-Acosta, A. Carrasco-Carballo, M. G. Hernández-Linares, J. Sandoval-Ramírez, M. A. Fernández-Herrera, “Mimicking natural phytohormones. 26-Hydroxycholestan-22-one derivatives as plant growth promoters” *Steroids*, vol. 125, pp. 20-26, 2017.
- [7] BUAP, «Boletines BUAP,» 19 Julio 2018. [En línea]. Disponible en: <https://www.boletin.buap.mx/node/511>. [Último acceso: 11 Octubre 2021].
- [8] A. Moreno, “Efecto de análogos de brasinoesteroides en diferentes variedades de maíz (*Zea mays* L.) criollo” Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Tesis de Licenciatura, 2009.
- [9] L. A. L. Zurita, “Efectos de análogos de brasinoesteroides en maíz criollo (*Zea mays* L.) con variaciones de temperatura” Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Tesis de Licenciatura, 2011.
- [10] N. Takahashi, M. S., *Chemistry of Plant Hormones*, Florida: CRC Press, 1988.
- [11] J. W. Mitchell, N. Mandava, J. F. Worley, J. F. Plimmer, M. V. Smith, “Brassinins—a New Family of Plant Hormones from Rape Pollen” *Nature*, vol. 225, pp. 1065-1066, 1970.
- [12] M. Grove, “Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen” *Nature*, vol. CCLXXXI, no. 5728, pp. 216-217, 1979.

- [13] T. Yokota, M. Arima, N. Takahashi, "Castasterone, a new phytosterol with plant-hormone potency, from chesnut insect gall" *Tetrahedron Lett.*, vol. XXIII, no. 12, pp. 1275-1278, 1982.
- [14] A. Bajguz, M. Codreanu, L. Hategan, A. Tanaka, *Brassinosteroids: A Class of Plant Hormone*, New York: SPRINGER, 2011.
- [15] S. Fung, J. B. Siddall, "Stereoselective Synthesis of Brassinolide: A Plant Growth Promoting Steroidal Lactone" *J. Am. Chem. Soc.* vol. CII, no. 21, pp. 6580-6581, 1980.
- [16] M. Thompson, "Synthesis of Brassino Steroids: New Plant-Growth-Promoting Steroids" *J. Org. Chem.* vol. XLIV, no. 26, pp. 5002-5004, 1979.
- [17] J. Donaubaer, A. Greaves, T. McMorris, "A Novel Synthesis of Brassinolide" *J. Org. Chem.* vol. XLIX, no. 15, pp. 2833-2834, 1984.
- [18] K. D. C. Robles-Ríos, "Respuesta molecular inducida por promotores del crecimiento vegetal en plantas de maíz sometidas a estrés por frío" Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, 2019.
- [19] N. Ikekawa, Y. J. Zhao, "Application of 24-Epibrassinolide in Agriculture" *Brassinosteroids*, vol. 59, no. 8, pp. 280-291, 1991.
- [20] V. Khripach, V. Zhabinskii, A. de Groot, "Brassinosteroids: Steroidal Plant Hormones Warrant Better Crops for the XXI Century" *Annals of Botany*, vol. 86, pp. 441-447, 2000.
- [21] M. A. Fernández-Herrera, H. López-Muñoz, J. M. V. Hernández-Vázquez, M. López-Dávila, M. L. Escobar-Sánchez, L. Sánchez-Sánchez, B. M. Pinto, J. Sandoval-Ramírez, "Synthesis of 26-hydroxy-22-oxocholestanic frameworks from diosgenin and hecogenin and their in vitro antiproliferative and apoptotic activity on human cervical cancer CaSki cells" *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 18, pp. 2474-2484, 2010.
- [22] M. L. Andrade-Rosales, "Efecto de un análogo de brasinoesteroide en la inclinación de la lámina de arroz y en los cultivos de frijol". Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Tesis de Licenciatura, 2013.
- [23] Unión Puebla, «Jardín Botánico de la BUAP busca preservar plantas nativas,» *Unión*, 04 Marzo 2017.
- [24] C. D. Valle-Expósito, J. Álvarez-López, J. Liu, N. Bao, J. Liang, J. Zhang, "Development of a cold-active microbial compound biofertilizer on the improvement for rice (*Oryza sativa* L.) tolerance at low-temperature", *Rhizosphere*, vol. 24, pp. 100586, 2022.

- [25] M. de Oliveira-Gonçalves, T.G. Carpanez, J.B.G. Silva, M. H. Otenio, V. Romario de Paula, H. Vieira de Mendonça, “Biomass Production of the Tropical Forage Grass *Pennisetum purpureum* (BRS Capiacu) Following Biofertilizer Application”, *Waste Biomass Valor.* vol. 13, pp. 2137–2147, 2022.
- [26] H. González, N. Fuentes, “Mecanismo de acción de cinco microorganismos promotores de crecimiento vegetal” *Rev. Mexicana Cienc. Agríc.* vol. XXXIV, no. 1, pp. 17-31, 2015.
- [27] H. P. Gutierrez, R. S. de la Vara. Análisis y Diseño de Experimentos. México: McGraw-Hill, 2008.
- [28] P. N. Benjumea-Hernández, J. R. Agudelo-Santamaría, G. J. Cano, “Estudio experimental de las variables que afectan la reacción de transesterificación del aceite crudo de palma para la producción de biodiesel” *Sci. Tech.* vol. 1, no. 24, pp. 169-174, 2004.
- [29] D. C. Chavez-Angulo, “Punto óptimo de cosecha para el proceso de deshidratado de la piña "Ananas comosus L." (var. Negra Ucayalina)” Universidad Nacional de Ucayali, Perú. Tesis de licenciatura, 2016.
- [30] O. Melo, L. A. López, S. E. Melo. Diseño de experimentos Métodos y aplicaciones. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia, 2020.
- [31] M. F. Briones-Baez, L. Aguilera-Vazquez, N. Rangel-Valdez, A. L. Martinez-Salazar, C. Zuñiga, “Multi-Objective Optimization of Microalgae Metabolism: An Evolutionary Algorithm Based on FBA” *Metabolites* vol. 12, pp. 603, 2022.
- [32] G. F. Pauli, D. C. Lankin, B. U. Jaki, “Quantitative ^1H NMR: development and potential of a method for natural products analysis” *J. Nat. Prod.* vol. 68, pp. 133-149, 2005.
- [33] S. K. Bharti, R. Roy, “Quantitative ^1H NMR spectroscopy” *Trends Anal. Chem.* vol. 35, pp. 5–26, 2012.
- [34] Instituto de Química, UNAM, "Laboratorio de RMN", [En línea]. Disponible en: <https://iquimica.unam.mx>. [Último acceso: 5 de Octubre de 2022].
- [35] D. P. Hollis, “Quantitative Analysis of Aspirin, Phenacetin, and Caffeine Mixtures by Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry” *Analytical Chemistry*, vol. 35, no. 1, pp. 1682-1684, 1963.
- [36] E. Avella, S. Gómez, R. Fierro, “Determinación rápida y precisa del contenido de hidrógeno en mezclas de hidrocarburos por RMN ^1H ” *Rev. Colomb. Quim.* vol. 41 no. 1, 2012

- [37] E. Yara-Varon, J. Eras, R. Canela, "1H RMN: Una herramienta rápida para la cuantificación de la etanolisis sin solvente del aceite de coco mediante resting cells fúngicas" *Rev. Tumbaga* vol. 1, no. 9, pp. 99-108, 2014.
- [38] K. M. Bower, "Analysis of variance (ANOVA) using MINITAB," *Sci. Comput. Instrum.* vol. 17, no. 3, 2000.
- [39] A. Carrasco-Carballo, "Síntesis de nuevos derivados esteroidales por condensación aldólica para la obtención de nuevos materiales, a partir de saponinas extraídas de barbasco del Istmo de Tehuantepec, Oaxaca". Universidad del Istmo, México, Tesis de licenciatura, 2015.
- [40] A. Rodríguez-Martínez, "Evaluación de la capacidad anticancerígena del compuesto triacetato de (25*R*)-22-oxocolest-5-eno-3 β -16 β ,26-triilo, análogo de la aglicona de la saponina osw-1, en líneas celulares de cáncer de mama". Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México, Tesis de licenciatura, 2018.

ANEXO

Tabla A. Resultados obtenidos a partir del diseño de experimentos.

Tiempo (min)	Temperatura (K)	AcOEt (mmol)	BF3 (mmol)	Diosgenina (mmol)	Rmolar AcOEt/D	Rmolar BF3/D	Rendimiento
25	273	2.253	1.136	0.241	9.349	4.714	40
20	273	2.253	1.136	0.241	9.349	4.714	50
10	273	2.253	1.136	0.241	9.349	4.714	31
5	273	2.253	1.136	0.241	9.349	4.714	31
15	273	2.253	1.894	0.241	9.349	7.859	23
15	273	2.253	1.894	0.241	9.349	7.859	9
15	273	2.253	1.515	0.241	9.349	6.286	18
15	273	2.253	0.568	0.241	9.349	2.357	39
15	273	2.253	0.189	0.241	9.349	0.784	24
15	273	5.191	1.136	0.241	21.539	4.714	15
15	273	4.212	1.136	0.241	17.477	4.714	24
15	273	3.232	1.136	0.241	13.411	4.714	33
15	273	1.273	1.136	0.241	5.282	4.714	30
15	273	2.253	1.515	0.241	9.349	6.286	6
15	273	2.253	1.894	0.241	9.349	7.859	17
15	273	2.253	0.568	0.241	9.349	2.357	44
15	273	2.253	0.568	0.241	9.349	2.357	31
15	273	2.253	1.515	0.241	9.349	6.286	20
15	273	2.253	0.189	0.241	9.349	0.784	46
15	273	2.253	0.189	0.241	9.349	0.784	40
15	273	2.253	0.189	0.241	9.349	0.784	43
15	273	4.212	1.136	0.241	17.477	4.714	17
15	273	5.191	1.136	0.241	21.539	4.714	22
15	273	5.191	1.136	0.241	21.539	4.714	16
15	273	3.232	1.136	0.241	13.411	4.714	33
15	273	4.212	1.136	0.241	17.477	4.714	20
15	273	3.232	1.136	0.241	13.411	4.714	29
25	273	2.253	1.136	0.241	9.349	4.714	21
15	273	1.273	1.136	0.241	5.282	4.714	34
15	273	1.273	1.136	0.241	5.282	4.714	31
10	273	2.253	1.136	0.241	9.349	4.714	28
10	273	2.253	1.136	0.241	9.349	4.714	40
25	273	2.253	1.136	0.241	9.349	4.714	36
5	273	2.253	1.136	0.241	9.349	4.714	33
15	275	2.253	1.136	0.241	9.349	4.714	34
15	268	2.253	1.136	0.241	9.349	4.714	26

Continuación. Resultados obtenidos a partir del diseño de experimentos.

Tiempo (min)	Temperatura (K)	AcOEt (mmol)	BF3 (mmol)	Diosgenina (mmol)	Rmolar AcOEt/D	Rmolar BF3/D	Rendimiento
15	268	2.253	1.136	0.241	9.349	4.714	15
15	268	2.253	1.136	0.241	9.349	4.714	27
20	273	2.253	1.136	0.241	9.349	4.714	31
20	273	2.253	1.136	0.241	9.349	4.714	24
15	271	2.253	1.136	0.241	9.349	4.714	29
15	271	2.253	1.136	0.241	9.349	4.714	28
15	271	2.253	1.136	0.241	9.349	4.714	28
15	275	2.253	1.136	0.241	9.349	4.714	32
15	275	2.253	1.136	0.241	9.349	4.714	24
15	278	2.253	1.136	0.241	9.349	4.714	30
5	273	2.253	1.136	0.241	9.349	4.714	44
15	278	2.253	1.136	0.241	9.349	4.714	29
15	278	2.253	1.136	0.241	9.349	4.714	30