



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**DESARROLLO DE UNA PRÁCTICA
INSTRUMENTAL INTEGRAL. ANÁLISIS DE
ISONIAZIDA POR CROMATOGRFÍA DE
LÍQUIDOS DE ALTA EFICIENCIA,
ESPECTROSCOPIA UV-VIS Y
ESPECTROSCOPIA INFRARROJA**

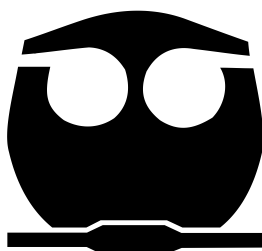
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERA QUÍMICA

PRESENTA

ELVIRA GONZÁLEZ TEPALE



MÉXICO, D. F.

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado

Presidente	IQ. Francisco Rojo Callejas
Vocal	Q. Adolfo García Osuna
Secretario	Q. Georgina Artemisa Duarte Lisci
1^{er.} Suplente	QFB. Lilia del Carmen López Serrano
2^{o.} Suplente	QFB. Adriana Ramírez Hernández

Sitio en el que se desarrolló el tema:

Departamento de Química Analítica
Laboratorio 3B y 3F. Edificio A
Facultad de Química, Ciudad Universitaria.

Asesor del tema

Q. Adolfo García Osuna

Supervisor técnico

Q.F.B. Silvia de Jesús Mendoza Arellano

Sustentante

Elvira González Tepale

Jurado asignado

Presidente M. en C. Francisco Rojo Callejas
Vocal Q. Adolfo García Osuna
Secretario Q. Georgina Artemisa Duarte Lisci
1^{er}. Suplente Q.F.B. Lilia del Carmen López Serrano
2^o. Suplente Q.F.B. Adriana Ramírez Hernández

Sitio en el que se desarrolló el tema:


Departamento de Química Analítica
Laboratorio 3B y 3F. Edificio A
Facultad de Química, Ciudad Universitaria.

Asesor del tema



Q. Adolfo García Osuna

Supervisor técnico



Q.F.B. Silvia de Jesús Mendoza Arellano

Sustentante



Elvira González Tepale

ÍNDICE

	Páginas
Capítulo I: Introducción y Objetivos	1
Introducción.....	2
Objetivos.....	3
Capítulo II: Antecedentes teóricos	4
Isoniazida.....	5
Espectroscopia.....	9
Espectroscopia IR.....	11
Espectroscopia UV-Vis.....	15
Cromatografía.....	20
Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAE).....	20
Validación.....	29
Capítulo III: Desarrollo experimental	34
Espectroscopia IR.....	35
Materia, aparatos, reactivos y sustancias.....	35
Instrumento.....	36
Validación.....	36
Condiciones óptimas de trabajo del Espectrofotómetro de FTIR.....	36
Procedimiento para obtener el espectro de isoniazida mediante la técnica de pastilla.....	36
Procedimiento para obtener el espectro de isoniazida mediante la técnica de suspensión.....	37
Diagrama de trabajo.....	38
Espectroscopia UV-Vis.....	39
Materia, aparatos, reactivos y sustancias.....	39
Instrumento.....	39
Validación.....	40
Condiciones óptimas de trabajo del Espectrofotómetro de UV-Vis.....	40

Linealidad de sistema.....	40
Repetibilidad y reproducibilidad.....	41
Precisión de sistema.....	41
Diagrama de trabajo.....	42
CLAE.....	43
Material y Reactivos.....	43
Instrumento.....	43
Validación.....	44
Condiciones óptimas de trabajo.....	44
Linealidad de sistema.....	44
Precisión de sistema.....	45
Diagrama de trabajo.....	46
Capítulo IV: Resultados y análisis de resultados.....	47
Espectroscopia IR.....	49
Espectroscopia UV-Vis.....	54
Linealidad de sistema.....	54
Repetibilidad.....	61
Precisión de sistema.....	63
CLAE.....	65
Linealidad de sistema.....	65
Precisión de sistema.....	67
Capítulo VI: Conclusiones.....	70
Bibliografía.....	73
Anexo I:.....	76

CAPÍTULO I

Introducción y Objetivos

INTRODUCCIÓN

En la formación de los alumnos en el área de la Química Analítica Instrumental de la Facultad de Química es muy importante que lleguen a visualizar la importancia de que se tengan varias técnicas que pueden analizar al mismo compuesto y que a veces, más que competir entre ellas, estas técnicas pueden ser complementarias.

En este trabajo se plantea una práctica integral con experiencias de cátedra para los alumnos que llevan la materia de Analítica Experimental II, en la que un compuesto orgánico (isoniazida) es analizado por medio de 3 diferentes técnicas instrumentales. Con esta práctica integral los alumnos además de confirmar las bases teóricas y el manejo experimental de las respectivas técnicas, entenderán y aplicarán éstas en el ámbito en que sean mejores (análisis cualitativo y/o cuantitativo) con una idea de la validación que se le realiza a cada sistema.

La isoniazida o isoniácida es un antibiótico activo frente a *Mycobacterium tuberculosis*. Se trata de un fármaco de primera línea en el tratamiento de la tuberculosis, siendo el fármaco más importante a nivel mundial para tratar todos los tipos de tuberculosis. Sus principales efectos secundarios son la toxicidad hepática y la neuropatía periférica, sin embargo en el esquema del tratamiento anti tuberculosis se incluían tres fármacos rifampicina, isoniazida y pirazinamida con una eficacia del 90% pero, debido a cepas resistentes a la isoniazida, en países en vías de desarrollo se incluye un cuarto fármaco (myambutol o estreptomina) en la fase intensiva del tratamiento anti tuberculosis con la finalidad de disminuir su resistencia a la rifampicina (NOM-006 SSA2-1993 modificada en 2005, actualmente denominada como PPROY-NOM-006-SAA2-2010 publicada en DOF el 13/09/2012). La isoniazida la podemos encontrar en presentaciones de tabletas, inyección y solución oral. Las tabletas de isoniazida contienen no menos de 90.0 por ciento y no más de 110.0 por ciento de la cantidad de isoniazida ($C_6H_7N_3O$) declarada en la etiqueta. Para identificar y confirmar dicha cantidad de compuesto en sus presentaciones se utilizan las técnicas analíticas como Espectroscopia Infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) por sus siglas en inglés, Espectroscopia Ultravioleta-Visible (UV-Vis) y la Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAE y HPLC por sus siglas en español e inglés).

La espectroscopia **IR** permite realizar un análisis cualitativo (el fuerte de la técnica) y con ellos checar la pureza de materia prima en muchas ocasiones, a través de un gráfico conocido como espectro de infrarrojo (% Transmitancia vs valores de número de onda). El espectro de IR es único para cada compuesto puro por lo que se puede identificar un compuesto por Espectroscopia IR si contamos con una base de datos para comparar o estándares certificados lo cual se puede realizar sin mayores dificultades.

La espectroscopia **UV-Vis** proporciona un gráfico conocido como espectro UV-Vis (absorbancia vs longitud. de onda) que al ser leídos e interpretados directamente permiten realizar un análisis cuantitativo (es su fuerte de la técnica) y algo de información cualitativa permitiendo identificar nuestro compuesto (isoniazida) en un universo controlado de productos.

La **CLAE** es una de las mejores técnicas para analizar (y llevar el control de calidad de productos farmacéuticos) tanto cuantitativamente como cualitativamente compuestos no volátiles o térmicamente inestables o susceptibles al calor, por ejemplo: fármacos, sales, proteínas, etc. Además de ser una excelente técnica de separación por lo que tiene el poder de separar a los compuestos de interés de otros compuestos en caso de que con el tratamiento de la muestra no se los pudiera quitar. Lo que le da versatilidad de estudiar al analito en la presentación que sea.

En esta práctica se les planteará a los alumnos parte del trabajo de laboratorio y estadístico que se realiza para validar las técnicas y realizar buenas prácticas de laboratorio en el análisis del analito a estudiar. En parte de esta práctica se mostrará el uso de algunas pruebas estadísticas que deben de cumplir los métodos realizados por alguna institución para fines de validación (término que se emplea para definir o demostrar la capacidad de una técnica o método para satisfacer los requisitos para la aplicación analítica deseada mediante documentación) que pone como criterios:

- Condiciones de trabajo del instrumento.
- Linealidad del sistema.
- Precisión del sistema.
- Precisión del método (repetibilidad y reproducibilidad).
- Estabilidad de estándares y/o muestras.
- Exactitud del sistema y/o método.
- Recobro.
- Sesgo.
- Robustez.
- Etc.

De las cuales en este trabajo sólo se abarcan las condiciones óptimas de trabajo, linealidad del sistema y precisión del sistema para fines prácticos y de entendimiento para los alumnos.

Objetivos

- Realizar la validación de los sistemas FTIR, UV-Vis y CLAE que se tienen en los laboratorios 3E y 3F para el análisis de isoniazida.
- Obtener los datos, ordenarlos y procesarlos al realizar esta validación para que los profesores hagan uso de dicha información para enseñarla y entregarla a los alumnos.
- Plantear el proceso a realizar por parte del profesor con sus alumnos, para que entiendan cada una de las partes de la validación del sistema indicada así como el proceso matemático estadístico para realizar la validación. Y con todo ello discutir con los alumnos, las ventajas y desventajas de cada una de las técnicas aplicadas para el estudio del fármaco en estudio.

CAPÍTULO II

Antecedentes teóricos

ISONIAZIDA^{1,2,3,4}

Los fármacos de primera línea que se utilizan en el tratamiento primario de la tuberculosis son: Isoniazida (H), Rifampicina (R), Pirazinamida (Z), Estreptomina (S) y Etambutol (E), cuyas presentaciones, dosis y reacciones adversas se señalan en la tabla 1:

TABLA 1.- Fármacos antituberculosis de primera línea

Fármacos	Presentación	Dosis diaria:			Dosis intermitentes (a)		Reacciones adversas
		Niños mg/kg peso	Adultos mg/kg peso	Dosis máxima/día	Niños mg/kg	Adultos dosis total máxima	
Isoniazida (H)	Comprimido 100 mg	5-10	5-10	300 mg	15-20	600-800 mg	Neuropatía periférica Hepatitis
Rifampicina (R)	Cápsulas 300 mg Jarabe 100 mg x 5 ml	15	10	600 mg	15-20	600 mg	Hepatitis Hipersensibilidad Interacciones medicamentosas
Pirazinamida (Z)	Comprimido. 500 mg	25-30	20-30	1,5-2 g	50	2,5 g	Gota Hepatitis
Estreptomina (S) (b) (c)	Frasco, ampola 1 g	20-30	15	1 g	18	1 g	Vértigo Hipoacusia Dermatitis
Etambutol (E) (d)	Comprimido 400 mg	20-30	15-25	1 200 mg	50	2 400 mg	Alteración de la visión

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa crónica, causada por un grupo de bacterias del orden *Actinomycetales* de la familia *Mycobacteriaceae*; el complejo *M. tuberculosis* se compone por: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, y *M. canettii*, se adquiere por la vía aérea principalmente. Es una enfermedad sistémica que afecta mayoritariamente al sistema respiratorio que de no ser tratada oportuna y eficientemente, puede causar la muerte a quien la padece.²

Actualmente la epidemia de VIH/sida, la diabetes Mellitus (DM), la desnutrición, las adicciones y la multiresistencia a fármacos antituberculosis (TB-MFR) agravan el panorama epidemiológico de la tuberculosis en México y el mundo. Las personas que viven con VIH/sida tienen hasta 50% más posibilidades de desarrollar tuberculosis en el transcurso de 5 años en comparación con las personas con VIH negativos. En el año 2011 se registró un 14.6% de casos diagnosticados con TB/VIH-SIDA de 8,163 casos de TB tamizados con VIH. Las personas que tienen TB/DM requieren de esquemas oportunos de tratamiento aunados a un control metabólico estricto. Para su pronta recuperación e interrupción de su propagación. En el año 2011 se registró un 22% de casos diagnosticados con TB/DM de un total de casos de TB en todas sus formas de 19,289. En el 2008 se realizó una encuesta Nacional, con una muestra representativa de 9 estados la cual permitió estimar la prevalencia de resistencia a medicamentos antituberculosis en casos nuevos siendo 2.2% de FR y 13.2% de MFR. Lo que permitió dar cursos clínicos de alta especialidad para el manejo de la tuberculosis con resistencia a fármacos en el 2011, a profesionales de la salud con el apoyo del INER (Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias), UNICTER (Unión Internacional Contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias) y USAID (Agencia de Estados Unidos para el Desarrollo Internacional). Las prisiones representan un terreno fértil para la propagación de la tuberculosis a partir de un caso, de ahí la importancia de diagnosticar casos a fin de interrumpir la cadena de transmisión. De 382 prisiones trabajadas, 221 casos nuevos fueron diagnosticados con TB, con 135,892 internos de los cuales 9,613 presentaron sistemas respiratorios en el 2011. La tuberculosis pulmonar en municipios indígenas se ha registrado en un rango que va de

27 casos registrados en municipios de Querétaro en el año 2011 hasta 1,483 para los de Oaxaca.⁴

Mycobacterium tuberculosis perfringes o bacilo de Koch. Es una bacteria alcohol-acido resistente frecuentemente incolora, aeróbica estricta. Su crecimiento está subordinado a la presencia de oxígeno y al valor del pH circundante. Es muy resistente al frío, la congelación, la desecación y por el contrario muy sensible al calor, la luz solar y la luz ultravioleta. Su multiplicación es muy lenta (se divide cada 16 a 20 horas) y ante circunstancias adversas puede entrar en estado latente, pudiendo retrasar su multiplicación desde algunos días hasta varios años. Es responsable de la mayor cantidad de casos de tuberculosis en el mundo. Fue descrito por primera vez el 24 de marzo de 1882 por Robert Koch.³



Figura 2.1: *Mycobacterium tuberculosis* perfringes.

Cuando la isoniazida se utilizó como agente terapéutico en la tuberculosis, se observó que mejoraba notablemente el estado de ánimo de los pacientes, quienes manifestaban una condición de euforia y optimismo, en desacuerdo con su estado físico general y sus perspectivas. Fue el psiquiatra Jean Delay (hoy conocido por haber utilizado la clorpromazina en el tratamiento de los trastornos psicóticos) quien describió por primera vez los efectos antidepresivos de la isoniazida en 1952.

Posteriormente se diseñaron modelos teóricos de orden neuroquímico para explicar la depresión. Uno de ellos fue la hipótesis serotoninérgica, que vinculó este tipo de fenómenos con niveles deficitarios del neurotransmisor serotonina en las sinapsis neuronales. Fue esta hipótesis la que sirvió de premisa a los científicos de la firma *Ely-Lilly* para avanzar en la síntesis de la fluoxetina, en 1986: el primer fármaco antidepresivo que actuaba como inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina.

Propiedades de isoniazida^{5,6,7,8,9}

Propiedades físicas.⁵

Color: blanco

Olor: inodoro.

Estado físico: polvo cristalino blanco o cristales incoloros o blancos.

Punto de fusión: 171-173°C.

Presentaciones farmacéutica: solución oral, inyecciones y tabletas.

Estructura y propiedades químicas.⁶

No. CAS: 54-85-3

PM: 137.1g/mol

La isoniazida es la hidracida del ácido isonicotínico.

Solubilidad: en agua a 25°C 14g/100mL, agua a 40°C 26g/100mL, etanol a 25°C 2g/100mL, etanol hirviendo 10g/100mL, cloroformo 0.1g/mL, ligeramente soluble en éter etílico e insoluble en benceno.

pKa's: 1.8, 3.5 y 10.8 a 20°C.

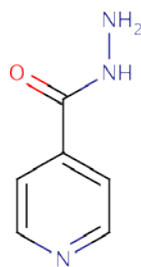


Figura 2.2: Isoniazida ($C_6H_7N_3O$).

Potenciales de oxidación determinados por Vulterrin⁷:

HCl (0.1N)	0.78
$Na_2B_4O_7$ (0.025M)	0.25
NaOH (3N)	-0.22

Forma complejos con muchos iones divalentes que pueden ser usados en la determinación de dicho compuesto como Cd(II), Cu(II), Co(II) y Mn(II).

Estabilidad y reactividad: Producto de descomposición peligrosos formados en condiciones de incendio; óxidos de carbono y óxidos de nitrógeno.

Nombres comerciales.⁸

Valifol, Cemidon 300 B₆® comp. (50mg ISN + 25mg Vit. B₆), Isoniazida B₆ Medical® sol. (50mg ISN + 25mg Vit. B₆)/5mL, Cemidon intravenoso® amp. 300mg/5mL, Hidrazida (Portugal); NH (EU); Isoniazida N.T.(Ecuador); Laniazid o Niazid (EU); Nicetal (Ecuador); Nydrazyd (Colombia); etc.

Farmacodinámica.

La isoniazida interfiere con la síntesis de lípidos y del DNA, inhibiendo por tanto la síntesis de la pared celular. Su acción bacteriostática o bactericida, dependiendo de la susceptibilidad del microorganismo y de la concentración del fármaco en el sitio de la infección.

Farmacocinética.

La isoniazida se absorbe completa y rápidamente. La concentración máxima en el suero ocurre de 1 a 2 horas después de la ingestión. Se inactiva principalmente el hígado mediante acetilación controlada genéticamente, aunque varía dependiendo del metabolismo de cada individuo. Un 75% de una dosis de isoniazida se excreta por orina como fármaco sin cambios y metabolitos en 24 horas. Algo de medicamento se excreta por saliva, esputo, heces y leche materna.

Contraindicaciones y precauciones.

Está contraindicada en pacientes con hipersensibilidad conocida al fármaco, con antecedentes de hepatopatía por isoniazida, etc. Se usará con precaución en pacientes que ingieren alcohol a diario o en pacientes con enfermedad hepática o renal crónica o antecedentes de convulsiones.

Seguridad.⁹

En caso de incendio, se utiliza polvo, agua pulverizada, espuma o dióxido de carbono para apagarlo. Aunque la evaporación a 20°C es despreciable se puede alcanzar rápidamente una concentración nociva, por ello es importante si se va almacenar que sea en un lugar fresco y bien cerrado.

Toxicidad.⁹

Toxicología DL₅₀: Oral-rata 1,250mg/kg. Piel-conejo-irritación de la piel 24h.

Puede aparecer hepatotoxicidad, manifestada por elevación de las transaminasas hasta en un 10% de los pacientes, aunque suele descender espontáneamente. Sólo ocasionalmente hay que suspender el tratamiento. La aparición de hepatitis aumenta con la edad del paciente, en los alcohólicos, metabolizadores lentos y si se asocia con rifampicina o pirazinamida. Frecuentemente se asocia con neurotoxicidad por depleción de piridoxina, por lo que suele asociarse al tratamiento con isoniazida la administración de fosfato de piridoxal. Se manifiesta por neuritis periférica, neuritis óptica, ataxia, mareo, convulsiones o manifestaciones psicóticas.

Ocasionalmente, aparecen erupciones cutáneas, fiebre, alteraciones hematológicas, vasculitis, síndromes artríticos y síndromes lupus-like. Interactúa con fenitoína inhibiendo su metabolismo. Sus principales efectos secundarios son la toxicidad hepática y la neuropatía periférica.

ESPECTROSCOPIA^{10,11,13}

Como en este trabajo se utilizaron 2 técnicas espectroscópicas antes de empezar a hablar de dichas técnicas se deben comprender algunas generalidades de la espectroscopia.

La Espectroscopia es un área de la Química Analítica que permite estudiar las interacciones de la materia con la radiación electromagnética y obtener información cualitativa y cuantitativa de las muestras.

La radiación electromagnética es un tipo de energía que se desplaza en el vacío, es decir no requiere un medio para transportarse. Las teorías que permiten explicar el comportamiento y los fenómenos que puede presentar la radiación electromagnética son:

Teoría ondulatoria

Describe a la energía electromagnética como una onda senoidal que se comporta y viaja como tal y por lo tanto presentará propiedades de onda como longitud de onda (λ), número de onda ($\tilde{\nu}$), frecuencia (ν), velocidad ($c = \nu \lambda$), etc.. Además de explicar los fenómenos de reflexión, refracción, difracción y dispersión que presenta esta energía.

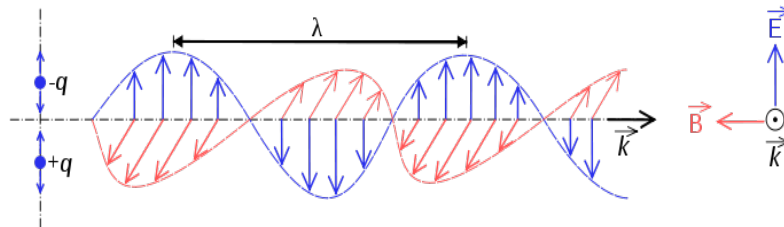


Figura 2.3: Onda electromagnética de color rojo representa el componente magnético y de azul el eléctrico.

Teoría corpuscular

Esta teoría explica que la energía electromagnética es, se comporta, o viaja, como paquetes de energía cuantificados, a los que se les conoce como cuantos o fotones.

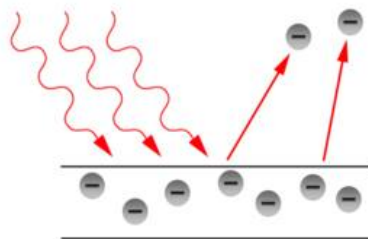


Figura 2.4: La energía esta constituida por cuantos o fotones.

Esta teoría explica la Absorción, que es pasar de un estado basal a un estado excitado tomando energía electromagnética, y la emisión que es pasar de un estado excitado a un estado basal mediante la liberación de energía electromagnética.

Einstein relacionó dichas teorías, evidenciando que la longitud de onda es inversamente proporcional a la energía y la energía es directamente proporcional al número de onda.

$$E = h\nu = h\frac{c}{\lambda}$$

Donde:

E=energía.

h=constante de Planck.

c= velocidad de la luz.

El ser humano realizó una clasificación de la energía electromagnética dividiéndola en las siguientes regiones de acuerdo a intervalos de energía y el fenómeno que producen en las moléculas o átomos al incidir este tipo de energía en ellos, a esta clasificación se le conoce como Espectro Electromagnético.

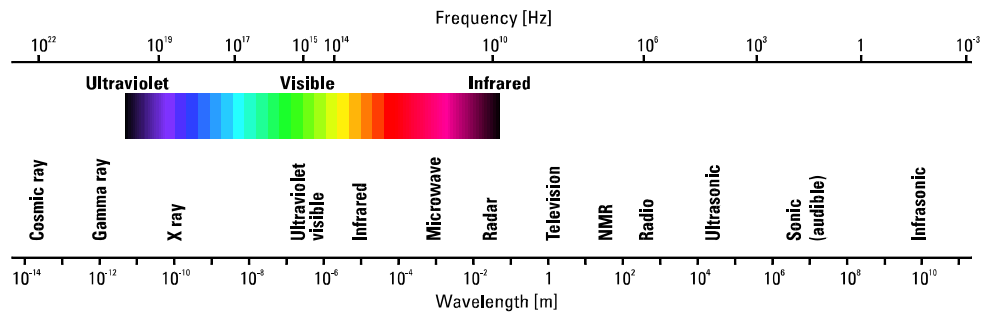


Figura 2.5: Espectro electromagnético.

Siendo las regiones UV-Visible y la Infrarroja las de interés ya que son las que se estudian en este trabajo.

Espectroscopia Infrarroja (IR)^{10,11,12,14}

Se basa en la medición de la absorción de la radiación electromagnética producida por la interacción de los enlaces entre los átomos de una molécula con energía radiante en la zona del infrarrojo del espectro electromagnético. Por lo tanto se tendrá el paso de un estado vibracional basal a un estado vibracional excitado de los enlaces tomando radiación electromagnética, modificando además el momento dipolar del enlace.

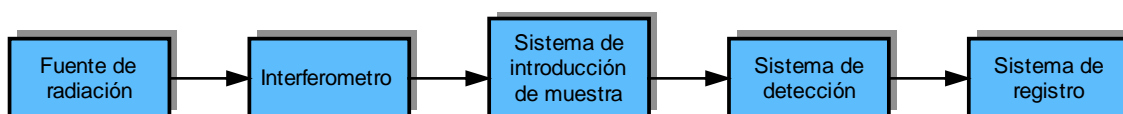
La cantidad de energía que contiene una molécula no es una variable continua, sino cuantizada, esto es, una molécula sólo se puede estirar o flexionar en determinadas frecuencias. Aunque se suele hablar de las longitudes de los enlaces como si fueran fijas, los valores que se manejan son promedios. Los enlaces modifican constantemente de longitud. Así un enlace C-H característico, con número de onda promedio de 3,000 a 2,800 cm^{-1} , en realidad vibra con cierta frecuencia, se estira y se contrae de manera alternada como si fuera un resorte que uniera a los dos átomos. Cuando una molécula absorbe radiación infrarroja, está lo hará cuando la frecuencia de la radiación coincida con la del movimiento vibratorio de sus enlaces y ésta aumente la amplitud de la vibración y modifique el momento dipolo de éste. Como cada frecuencia que absorbe una molécula corresponde a cierto movimiento vibracional de sus enlaces, se puede ver qué tipos de enlaces tiene una molécula obteniéndolos de las señales obtenidas en su espectro infrarrojo y así deducir sus grupos funcionales.

Para lograr generar un espectro de infrarrojo se hace pasar un haz de radiación infrarroja a través de la materia, el haz después de interactuar con la muestra llega a un detector que registra la cantidad de energía infrarroja que permite pasar la muestra y da una idea de la energía absorbida por ésta. Esta interacción puede lograrse enviando esta energía en forma de un haz monocromático, lo que permite variar la longitud de onda de la radiación (y por lo tanto la energía) a través del tiempo, o usando equipos con interferómetros y transformada de Fourier para medir todos los números de onda a la vez, esta última opción es la más utilizada actualmente. En cualquiera de estos casos, se obtiene un gráfico conocido como espectro de infrarrojo, el cual muestra los valores de la absorción (en unidades de transmitancia) contra el número de onda (cm^{-1}) de las bandas de absorción que presenta la muestra y permite a través de éstas una interpretación de los enlaces presentes en el compuesto estudiado y relacionar éstos con los grupos funcionales que contiene.

En el espectro electromagnético la zona de infrarrojo se divide en tres regiones: infrarrojo cercano (14,000-4,000 cm^{-1}), infrarrojo medio (4,000-400 cm^{-1}) e infrarrojo lejano (400-10 cm^{-1}) en este trabajo la región utilizada es la del infrarrojo medio debido a que el compuesto isoniazida absorbe en dicha región debido a los grupos funcionales que presenta.

Instrumentación

El diseño instrumental de un Espectrofotómetro FTIR es el siguiente:



Fuente de radiación

Su función es emitir radiación electromagnética en la zona de interés del espectro electromagnético, en este caso en el IR medio. Existen diversas fuentes de radiación continuas entre las cuales encontramos:

- Bobina de Nicromo: Consiste en una espiral muy apretada de alambre de níquel y cromo, calentada por el paso de una corriente eléctrica hasta una temperatura de $1,100^{\circ}\text{C}$ produciendo una radiación entre $4,000$ a 200cm^{-1}
- Fuente global: Se calienta eléctricamente a $1,300^{\circ}\text{C}$, una varilla de carburo de silicio de 5 por 50mm. Logrando emitir radiación en una región de $1,000$ a 25cm^{-1} .
- Emisor incandescente de Nernst: se compone de óxidos de tierras raras ($\text{ZrO}_2 + \text{Y}_2\text{O}_3$) formadas en un cilindro de un diámetro de 2mm y una longitud de 20mm, en los extremos hay alambres de platino para el paso de corriente y llevar a una temperatura de $1,500^{\circ}\text{C}$.

Interferómetro

La función de un interferograma es crear interferencias de la radiación electromagnética para producir un interferograma, dichas interferencias se producen cuando viajan ondas con propiedades similares las cuales se suman o restan y crean el interferograma, el instrumento lo realiza mediante el diseño de Michelson.

El interferómetro de Michelson está constituido principalmente por un divisor de haz y dos espejos, uno móvil y el otro fijo. El divisor de haz está constituido por dos ventanas que pueden ser bromuro de potasio (KBr), yoduro de cesio (CsI), o de bromuro de cesio (CsBr) con un ligero recubrimiento de germanio (Ge) o silicio (Si) colocado entre ellas. Este divisor se coloca a una posición de 45° con respecto a la fuente de radiación, así el divisor permite el paso del 50% de la radiación emitida de la fuente que ira hacia el espejo móvil en una trayectoria lineal, y el otro 50% de la radiación emitida por la fuente es reflejada hacia un espejo fijo (90° con respecto a la lineal que deja pasar) para que a cada movimiento de este espejo se refleje la radiación divisor de haz. La función del espejo fijo es de volver a reflejar el haz luminoso hacia el divisor de haz para posteriormente recombinar la radiación con la que es reflejada por el espejo móvil. La función del espejo móvil además de reflejar la radiación que le es transmitida recorrerá una distancia y luego retornará hacia su posición original lo que provocará un retardo en tiempos con respecto a los haces reflejados por el espejo fijo antes de pasarlas al compartimiento de la muestra, lo que provoca el fenómeno de interferencias y estas señales pasan a la muestra y lo que no absorbe la muestra se enfoca al detector y la señal resultante se llama interferograma, la cual contiene toda la información para obtener un espectro normal de IR por medio de un procedimiento matemático llamado transformada de Fourier.⁹

Sistema de introducción de muestra

Como una principal utilización del IR ha sido la identificación estructural de compuestos orgánicos e inorgánicos, es necesaria la manipulación de muestras dependiendo de su estado físico (líquido, sólido o gas). Existen diversas técnicas para preparar las muestras entre las cuales contamos con las técnicas de preparación clásicas:

-Película y disolución para muestras líquidas.

-Pastilla, suspensión y disolución para muestras sólidas.

Aunque también se pueden utilizar sistemas de Reflectancia atenuada, como el aparato con punta de diamante, microscopio, etc.

Sistema de detección

La función del sistema de detección es convertir el fenómeno físico generado (absorción) y pasarlo a algo manejable que será alguna propiedad eléctrica. Para la zona IR media se tienen diversos detectores que pueden utilizarse como los termopares, el de Goley y los piroeléctricos. Estos últimos formados de material ferro eléctrico tienen una polarización eléctrica permanente, porque sus moléculas están alineadas en un cristal, una cara del cristal está cargada positivamente y la otra negativamente. La polarización depende de la temperatura y esta variación con ella se llama efecto piroeléctrico, cuando el cristal absorbe radiación IR, varía su temperatura y polarización, esta variación es la señal que da un detector piroeléctrico. El detector de sulfato de triglicina deuterada es el de material más representativo de este tipo de detectores, y por su respuesta tan rápida se utiliza con espectrómetros con transformada de Fourier.⁹

Sistema de registro

Se encarga de pasar las señales electrónicas (en forma de un interferograma) a algo entendible, que en este caso es un gráfico de transmitancia o % de éste contra número de onda (cm^{-1}) llamado espectro de IR; para poder transformar el interferograma al gráfico mencionado se requiere aplicarle la transformada de Fourier por lo que para que esto se pueda realizar se requiere forzosamente que el sistema de registro sea una computadora.

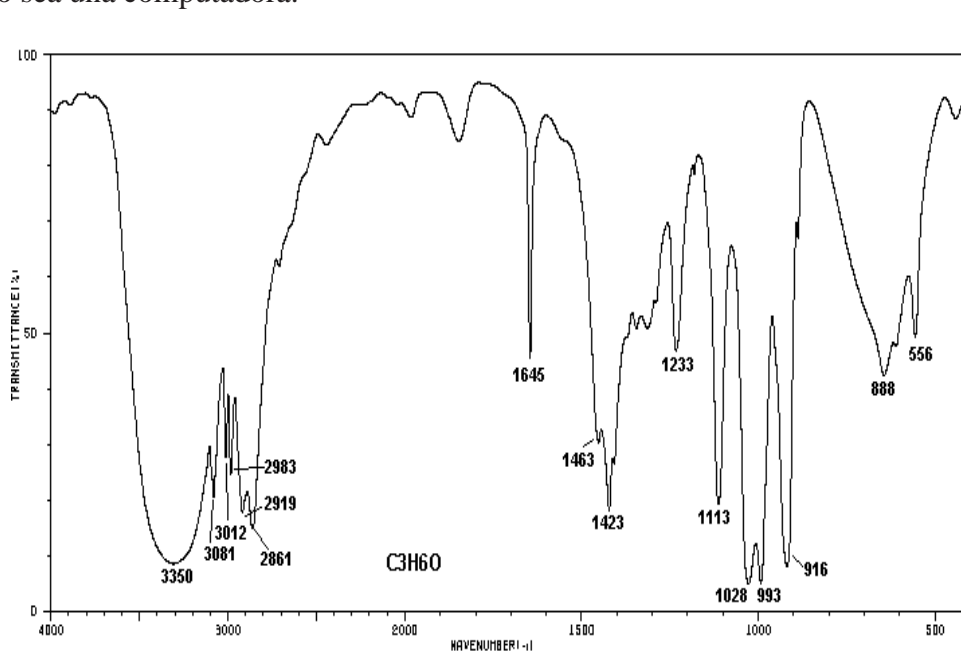


Figura 2.6: Espectro Infrarrojo de un compuesto orgánico.

Análisis cualitativo

Este tipo de análisis es el fuerte de la absorción infrarroja ya que se utiliza para la identificación y determinación de grupos funcionales de especies orgánicas, inorgánicas y bioquímicas por los químicos y con ello en su probable elucidación estructural.

En el caso de que el espectro de un compuesto a estudiar se comparara con el espectro de un estándar y éstos fueran idénticos, entonces se puede confirmar que el compuesto es el estándar mencionado, lo anterior siempre que dichos espectros hayan sido obtenidos bajo la misma técnica de preparación de muestra y las mismas condiciones instrumentales.

Análisis cuantitativo

En el IR medio y lejano este tipo de análisis es muy limitado en la parte cuantitativa, debido a lo angosto de los picos infrarrojos y las dificultades instrumentales en la medición de transmitancia con exactitud, por lo que la Ley de Lambert y Beer no presenta un amplio intervalo lineal como en el caso de la Espectroscopia UV-Vis. Pero en caso de hacer un análisis cuantitativo esta será la ley que se aplicaría así como la ecuación planteada conocida con el mismo nombre.

$$A=alc$$

Dónde:

A=absorbancia.

a=coeficiente de absortividad.

l=longitud de la celda.

c=concentración.

Espectroscopia de UV-Vis^{10,11,12,13,15}

El principio en el que se basa la espectroscopia de UV-Vis que se trabaja en el área de la química es normalmente en la absorción de la radiación electromagnética de dicha región por la materia, esto es, que cuando un fotón de esta zona energética interacciona con una molécula y la lleva a su estado excitado, esto es producido por lo general como consecuencia de la excitación de los electrones (de valencia o externos) de enlace de las moléculas, aunque esta energía puede bajo ciertas condiciones también hacerlo a nivel atómico. Hay que indicar que la región UV utilizada por esta técnica es la del UV cercano y no la del lejano, recordando que éstas son las 2 regiones en que se subdivide la región UV.

La técnica conocida como Espectroscopia UV-Vis es la que se desarrolla como absorción molecular. En este caso una especie molecular absorbe radiación sólo en regiones específicas del espectro, en donde la radiación tiene la energía requerida para llevar las moléculas a su estado excitado. Algunos autores clasifican las especies absorbentes según las transiciones electrónicas en que participan:

- 1) Los electrones de los orbitales moleculares π y n , que comprenden moléculas e iones orgánicos, así como varios aniones inorgánicos con enlaces tipo orgánicos que cuentan con electrones libres como nitratos, nitritos y carbonatos.
- 2) Los electrones externos d y f , que comprenden la mayoría de los iones de metales de transición.
- 3) Y los electrones de transferencia de carga (complejos organometálicos).

Los compuestos orgánicos para que den señal dentro de la región UV-Vis deben de cumplir con tener: Dobles ligaduras conjugadas, aromaticidad o ambas. Siendo las transiciones $n \rightarrow \pi^*$ y $\pi \rightarrow \pi^*$ las que se llevan a cabo. Pasando de un orbital molecular de enlace basal a un orbital molecular de enlace excitado tomando radiación electromagnética de esta región.

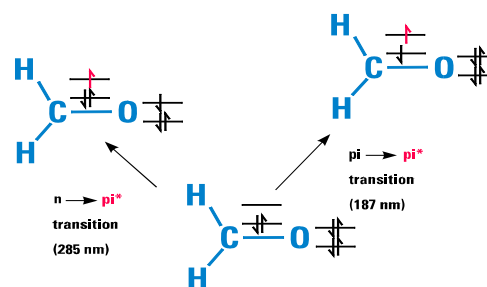


Figura 2.7: electrones de enlace externos en compuestos orgánicos.

Las partes estructurales mencionadas en el párrafo anterior que producen la señal de absorción son conocidas con el término de grupos cromóforos. La sustitución, los cambios estructurales de dichos grupos en los compuestos orgánicos y la solvatación producen cambios ya sea en la intensidad de la señal y/o en la longitud de máxima absorción de las bandas obtenidas originalmente por los grupos cromóforos.

Cuando sucede alguno de los efectos mencionados y los valores cambian hacia longitudes de onda mayores se indica que se tuvo un efecto batocrómico, mientras que cuando son menores se tiene un efecto hipsocrómico. Cuando se tiene un incremento en la intensidad de la señal de la banda se tiene un efecto hipercrómico, mientras que la disminución se denomina hipocrómico. Aquellos sustituyentes que se le adicionen al grupo cromóforo y provoquen algún(os) de los efectos mencionados se conocen con el nombre de auxocromos (C-R, C-OH, C-NH₂ etc.).¹⁴

Los disolventes polares tienden a desviar la posición de las longitudes de absorción de las bandas y disminuir su estructura vibratoria, los disolventes hidroxílicos pueden desaparecer completamente la señal. Los disolventes apolares sólo producen pequeños cambios o ninguno en las bandas.¹⁴

Para los compuestos inorgánicos el fenómeno es el de pasar de un estado basal de sus orbitales (d y/o f) a un estado excitado de esos orbitales (d* y/o f*) tomando radiación electromagnética en sus diferentes niveles.

Además de las transiciones electrónicas, como energía es muy grande, esta produce también cambios vibracionales y rotacionales de las moléculas, lo que en conjunto son los causantes de los espectros con bandas anchas en la espectroscopia UV-Vis.

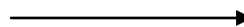
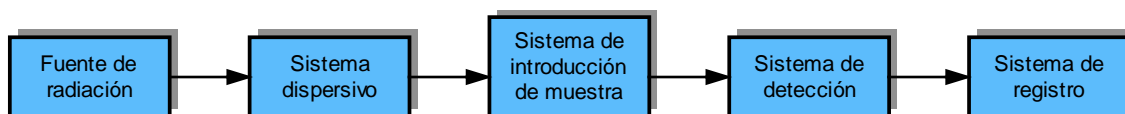


Figura 2.8: Saltos electrónicos generando además fenómenos vibracionales y rotacionales dando por resultado final bandas anchas.

El intervalo de trabajo práctico de la región UV-Vis se encuentra entre los 800 a los 200nm siendo normalmente el intervalo de 200-400nm la región del UV cercano y de 400-800nm la zona del Visible.

Instrumentación

El diseño instrumental de un Espectrofotómetro UV-Vis dispersivo (que fue el utilizado en este trabajo) es el siguiente:



Fuente de Radiación

Se encarga de emitir la radiación en la región de interés en este caso la zona del UV cercano y la visible. Para trabajar de manera óptima se utilizan dos fuentes de radiación, la lámpara de W (tungsteno o wolframio) para la zona de visible y lámpara D₂ (Deuterio) para la zona de UV.



Figura 2.9: Lámparas de Tungsteno y Deuterio.

Sistema Dispersivo (Monocromático)

Se encarga de monocromatizar o dispersar la radiación electromagnética de la zona mencionada en valores energéticos de longitud de onda lo más pequeña posible (por lo menos en el orden de los nm) haciendo uso de las siguientes partes que conforman esta parte instrumental:

*Rendijas: Su función es la de controlar la entrada y salida de la radiación electromagnética por medio de una abertura, a la cual hay que tener un control

óptimo del fenómeno de difracción de la radiación electromagnética que se produce a través de ellos.

*Espejos: Su función es la de guiar los haces de radiación a través del sistema, teniendo en éstos el fenómeno de reflexión para llevar a cabo esto.

*Lentes: Su función es la de concentrar toda la radiación electromagnética en una área pequeña (colimarla) para evitar la dispersión de ésta en el sistema, se aprovecha para ello es el fenómeno de refracción y se realiza por medio de cristales de cuarzo o sílica.

*Filtros: Su función es que por medio del fenómeno de absorción, mediante un vidrio coloreado o un colorante suspendido en gelatina colocado entre placas de vidrio, eliminar parte de la radiación electromagnética, que ayuda a determinar el ancho y la longitud de onda transmitida.

*Rejilla de difracción o reflexión: Su función es la monocromatización fina de la radiación electromagnética en el orden de los nm, realizado por medio de la reflexión o difracción sobre una superficie pulida y rayada finamente (300 000 surcos por mm aproximadamente).

Dependiendo del arreglo que se haga al sistema dispersivo para dividir los haces se pueden tener equipos conocidos como sistemas de doble o de un solo haz.

Figura 2.10: Esquema de un sistema dispersivo de doble haz.

Muestra

Las muestras pueden ser sólidas o líquidas, pero normalmente tienen que estar en disolución para ser analizadas por el instrumento, para ello se utilizan recipientes contenedores de líquidos conocidos como celdas y que pueden ser de cuarzo o sílice para la región ultravioleta-visible y de vidrio o plástico para la región visible, los materiales mencionados se utilizan respectivamente porque no absorben en dichas regiones. Para una mejor disolución de las muestras se deben ver las propiedades físicas y químicas así como las del disolvente a utilizar y que este último, de preferencia no absorba en la región de trabajo.

También se pueden trabajar muestras en fase gaseosa para la cual se necesitan celdas selladas.

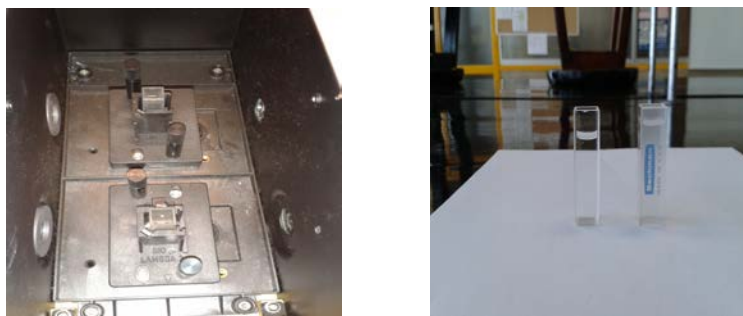


Figura 2.11: Celdas colocadas en la zona de muestra del equipo, así como celdas de cuarzo con muestra.

Sistema de Detección

Todos los detectores de fotones de esta región se basan en la interacción de la radiación, con una superficie reactiva que produce electrones (fotoemisión) o promueve electrones a estados energéticos en los que pueden conducir la electricidad (fotoconducción). La radiación UV-Vis posee suficiente energía para dar lugar a estos procesos. Existen varios detectores pero el más utilizado es el tubo fotomultiplicador, este detector contiene una superficie fotoemisora que libera electrones al interactuar con los fotones de la región UV-Vis, así como varias superficies adicionales que emiten más electrones en cascada (de manera binaria) cuando son alcanzados por electrones liberados de la región fotosensible provocando con ello un aumento de la señal eléctrica y aumentando la sensibilidad de este detector.

Sistema de Registro

Las propiedades eléctricas producidas por el detector se relacionan en una unidad de medición conocida como Absorbancia y con ello se busca obtener un gráfico de la Absorbancia contra longitud de onda (nm) conocido como espectro UV-Vis, pudiéndose obtener las lecturas por medio de escalas o sistemas digitales o graficadores o impresoras o computadoras.

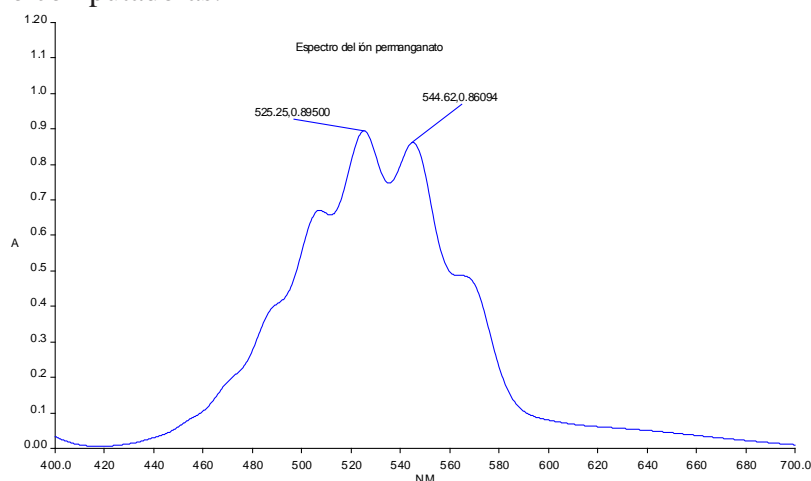


Figura 2.12: Espectro visible del ión permanganato.

Análisis Cualitativo

El análisis cualitativo no es el fuerte de la técnica como ya se explicó en la parte teórica de la técnica ya que no da mucha información estructural que pueda llevar a la dilucidación del compuesto, sin embargo permite plantear la presencia de ciertos grupos estructurales como grupos cromóforos también mencionados anteriormente.

Si hay que mencionar que en un universo cerrado de compuestos se puede utilizar la comparación de los espectros para poder deducir la presencia de compuestos o no en las muestras.

Análisis Cuantitativo

Ésta es la aplicación fuerte de la técnica, pero para realizar dicha aplicación es necesario comprender los siguientes conceptos de los que se plantean a continuación.

Primero hay que entender las unidades de trabajo y que son:

- La transmitancia: Es la fracción de radiación incidente que deja pasar la muestra.

$$T = \frac{P}{P_0}$$

donde:

P=Potencia del haz después de pasar la muestra.

P₀=Potencia del haz incidente antes de pasar la muestra.

- Absorbancia: Es una expresión matemática que permite relacionarla directamente a la trayectoria de la radiación a través de la solución y la concentración. Su definición es:

$$A = -\log_{10} T$$

por lo que

$$A = \log \frac{P_0}{P}$$

Y esta unidad se relaciona a la siguiente ecuación:

$$A = \epsilon l C \text{ o } A = abc$$

Conocida como la ecuación de Lambert y Beer y en dónde:

l o b=espesor de la celda en cm.

C o c=concentración.

ϵ =coeficiente de absorptividad molar (en caso de trabajar con la conc. en Molaridad).

a=coeficiente de absorptividad (en caso de utilizar cualquier otra concentración diferente a Molaridad).¹⁰

La relación entre A vs C es casi siempre proporcional de manera lineal a una longitud de onda fija, ver figura 2.13.

Esta técnica permite trabajar con una gran variedad de especies inorgánicas y orgánicas que absorben de manera directa en la región de UV-Vis, permitiendo cuantificarlas de manera directa, pero aquellos compuestos que no se puedan analizar de manera directa, se pueden analizar mediante tratamientos químicos que permiten que éstos absorban en la región de trabajo, aumentar la sensibilidad, lograr una selectividad moderada y una buena precisión.

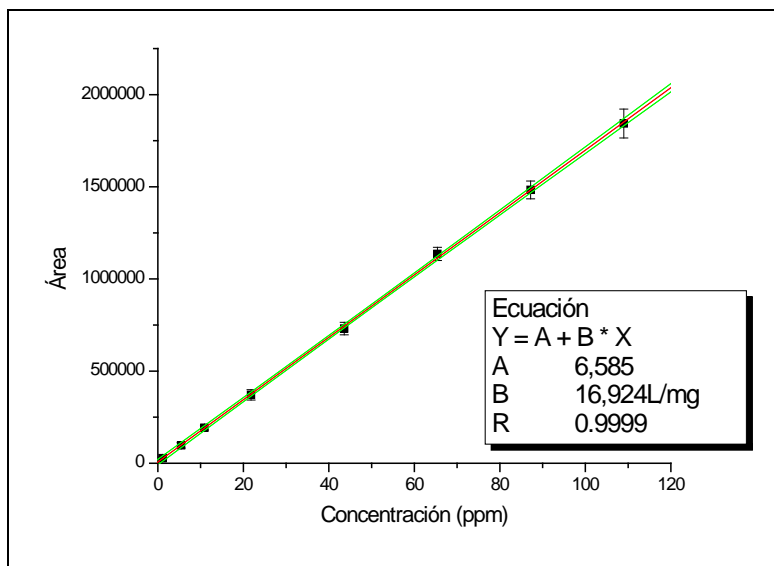


Figura 2.13: Gráfica buscando la relación lineal entre la Absorbancia y la Concentración.

CROMATOGRAFÍA^{10,11,12,16}

La cromatografía fue inventada y denominada así por el ruso Mijáil Tswett a principios del siglo XX. La cromatografía es un proceso de migración diferencial en la cual los componentes de una mezcla son transportados por una fase móvil (que se mueve a través de una columna) líquida o gas, siendo retenidos selectivamente por una fase estacionaria (la que se encuentra fija en la columna) que es frecuentemente un líquido que cubre el interior de un tubo capilar o la superficie de partículas sólidas empaquetadas dentro de una columna.

Se pueden realizar el análisis simultaneo de múltiples compuestos en la muestra en cuestión de minutos así como el análisis cualitativo y/o cuantitativo (hasta el orden de trazas), lo que la hace ser una de las mejores técnicas analíticas instrumentales para el análisis de mezclas y muestras muy complejas.

La cromatografía de acuerdo a su naturaleza de las fases involucradas y a los mecanismos de separación se puede clasificar de la siguiente manera:

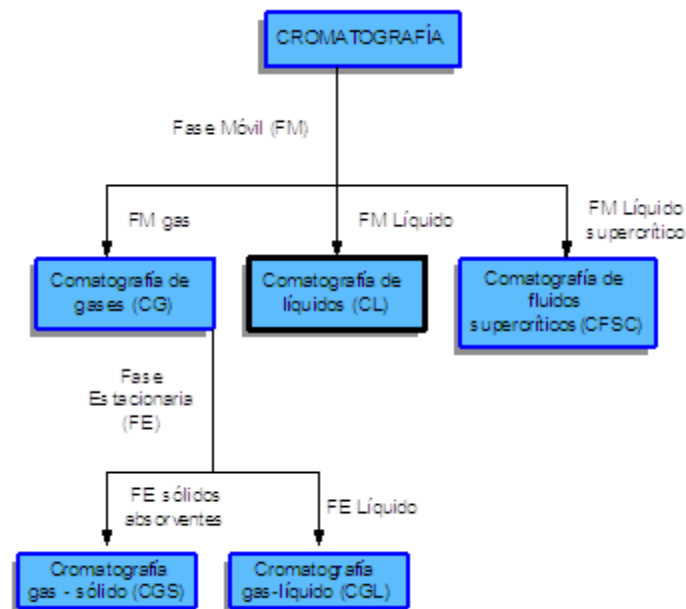


Diagrama 2.1: Clasificación de la cromatografía clásica.

Así como existe una clasificación de la cromatografía según la fase móvil que se tenga y una subdivisión de la Cromatografía de Gases según su fase estacionaria, la Cromatografía de Líquidos también se subdivide (ver diagrama 2.2) según su mecanismo de separación y su fase estacionaria como se verá más adelante.

CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS^{10,11,12,16}

La cromatografía de líquidos es una técnica física de separación que consta de una fase móvil líquida y una fase estacionaria sólida, líquida o geles. En cromatografía de líquidos se requiere que la muestra sea soluble en la fase móvil lo cual hace posible el análisis de compuestos de muy alto peso molecular tanto inorgánicos, orgánicos, iónicos o covalentes así como de productos naturales lábiles. Dicha separación depende de los equilibrios que se logren por lo cual podemos manipularlos modificando la constante de equilibrio (K_{eq}) modificando la fase

estacionaria, la móvil, la temperatura o la presión, la definición de la constante de equilibrio es:

$$K_{eq} = \frac{[]_{estacionaria}}{[]_{móvil}}$$

Para la selección de una de las subdivisiones de trabajo por cromatografía líquida, el conocimiento de la estructura molecular de los compuestos que forman a la muestra es de gran utilidad, ver diagrama 2.2.

La cromatografía de líquidos de alta eficiencia o resolución (HPLC por sus siglas en inglés) es muy utilizada por su versatilidad, por su gran poder para separar y/o determinar a los compuestos que forman muestras de materiales orgánicos, inorgánicos y biológicos.

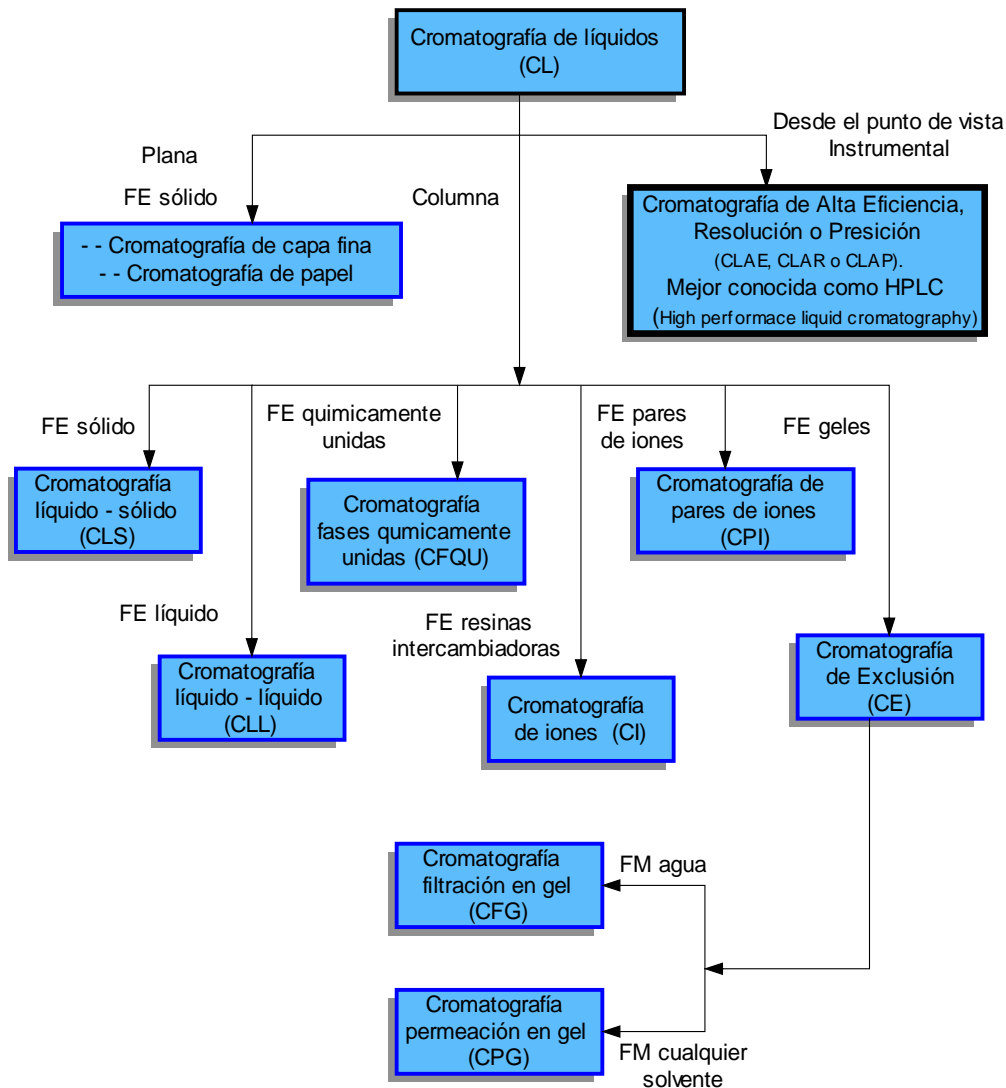
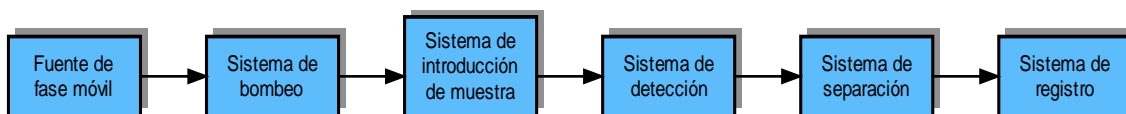


Diagrama 2.2: Clasificación de la cromatografía líquida.

Instrumentación

El diseño instrumental de un Cromatógrafo de Líquidos es el siguiente:



Fuente de fase móvil

Éste es un recipiente o contenedor para líquidos que contiene a la fase móvil, y esta fase móvil puede ser un disolvente sólo o una mezcla de disolventes (agua, metanol, isopropanol, acetonitrilo, tetrahidrofurano, cloroformo, cloruro de metileno, hexano, etc.). Estos disolventes deberán de tener como cualidades una baja viscosidad (baja resistencia a la transferencia de masa), de alta pureza, inertes, no tóxicos, no peligrosos, accesibles en cuanto a costos y ser compatible con el tipo de detector utilizado. El material de estos recipientes normalmente es de vidrio, aunque se puede utilizar acero inoxidable o plástico inerte. Además de utilizar filtros y conexiones herméticas en el sistema que succiona a la fase móvil, es recomendable filtrar la fase móvil para eliminar partículas además de eliminar la presencia de N_2 y O_2 desgasificando a dicha fase móvil.



Figura 2.14: Contenedores de vidrio para la fase móvil.

Sistema de bombeo

La función del sistema de bombeo es acarrear la fase móvil a través del sistema, por lo cual tiene que cumplir mínimo el manejar un intervalo amplio de presión (aprox. de 1500 a 6000psi), de flujos reproducibles, constantes dentro de un valor relativo de 0.5-2 mL/min y no pulsantes, así como ser resistentes a la corrosión por las fases móviles que se pueden utilizar. Actualmente las bombas de pistón recíproca son las de uso común en los Cromatógrafos de Líquidos, las cuales operan mediante el movimiento de pistones de manera recíproca, que tienen un sistema de válvulas que alternadamente se abren y se cierran, llenando y vaciando de modo alternativo, la pequeña cámara en donde se encuentran los pistones. El volumen que envía la bomba en cada pulso se ajusta variando la distancia a que se desplaza el pistón, y el flujo total se ajusta variando el número de desplazamientos por unidad de tiempo. Aún con la alternancia el flujo se obtiene con una baja pulsación, por lo que se utiliza un sistema de amortiguamiento para eliminar totalmente esta pulsación.¹⁴



Figura 2.15: Bombas reciprocantes de un equipo marca Shimadzu.

Sistema de introducción de muestra

Antes de introducir la muestra al instrumento, la muestra debe encontrarse disuelta en la fase móvil por lo que se pueden trabajar muestras sólidas o líquidas pero en disolución. En el instrumento se utiliza una válvula de inyección para inyectar la muestra al sistema, a ésta se le introduce la muestra por medio de una jeringa (si se trabaja de manera manual), llenando el volumen interno de un tubo capilar de acero en la válvula, realizando esto en la posición de carga de ésta. Posteriormente colocándola en la posición de inyección (por medio de un giro en esta válvula), introduciéndose la muestra dentro del sistema y hacia la columna.



Figura 2.16: Jeringa y Válvula de Inyección.

Sistema de separación

La fase estacionaria se encuentra empacada en tubería de acero inoxidable (las más comunes conocidas como empacadas) o de polímeros (conocidas como capilares), siendo conocidas ambas como columnas analíticas, y pueden variar en su longitud, diámetro interno y material de relleno.

Las longitudes de la mayoría de las columnas empacadas van de los 5 a 30cm, y de 4 a 10mm de diámetro interno, el empaque con un tamaño de partículas de 3 a 10 μ m, que pueden presentar entre 40,000 a 60,000 platos/metro. Para proteger a estas columnas se llegan a utilizar en la entrada de la columna piezas conocidas como precolumnas que contiene el mismo empaque o fase estacionaria que la columna analítica.¹⁰



Figura 2.17: Columna cromatográfica de tipo empacada con precolumna.

El empaque con se rellenan las columnas mencionadas dependerá de la aplicación que se realice como está marcado en el diagrama 2.2.

Sistema de Detección

En la técnica de cromatografía los detectores deben de generar o medir un fenómeno físico ya sea del analito o de la fase móvil y así poder transformar ese fenómeno físico a algún tipo de propiedad eléctrica para poder manejarla.

En HPLC se pueden dividir los detectores utilizados por esta técnica en 2 grandes grupos:

- ✓ Espectroscópicos: En los que se encuentran el Detector de UV-Vis, Detector de Fluorescencia, Detector de Refractometría y Detector de Espectrometría de Masas.
- ✓ Electroquímicos: En los que se encuentran el Detector Amperométrico y el Detector Conductimétrico.

De los mencionados anteriormente el más utilizado es el Detector de Ultravioleta-Visible (UV-Vis), y además es el utilizado en este trabajo por lo que se dará una explicación de éste. Actualmente se venden dos tipos de opción como detectores UV-Vis para los cromatógrafos de líquidos:



Figura 2.18: Detector UV-Vis de longitud de onda variable marca Shimadzu de longitud de onda variable utilizado en este trabajo.

- Detector de longitud de onda variable (el cuál se utilizó en el presente trabajo): Es un espectrofotómetro UV-Vis con paso de banda relativamente amplio y con un sistema dispersivo o monocromático automatizado que permite colocar la longitud de onda que se desee de la región UV-Vis, acoplado a un sistema cromatográfico uniendo la tubería de éste a una celda de flujo que tiene el detector, logrando así obtener la absorbancia de aquellos compuestos que absorban a esa longitud de onda colocada. En este detector en caso de querer obtener un espectro completo, el flujo de la fase móvil debe suspenderse para atrapar al componente de interés en la celda de flujo del detector, mientras se barre la región espectral UV-Vis.
- Detector de arreglo de diodos: Para poder obtener el espectro completo en un tiempo real de cada analito separado en el cromatógrafo conforme eluyen éstos se necesita utilizar los dispositivos de diodos de estado sólido como detector UV-Vis en lugar del fotomultiplicador utilizado en los dispersivos. Como los diodos de este detector responden cada uno a longitudes específicas permite tanto poder obtener espectros completos de los analitos, así como uno o varios cromatogramas leídos a longitudes de onda diferentes al mismo tiempo pudiendo volverlo universal y específico en la región UV-Vis. Es decir que los

detectores de arreglos de diodos pueden trabajar en paralelo, ya que pueden obtener el espectro del intervalo espectral que se quiera, así como ir generando uno o varios cromatogramas al mismo tiempo a las longitudes de onda que se deseen. Por ejemplo, se puede obtener un espectro completo en un tiempo hasta de 0.01 s barriendo desde 190 hasta 600nm y a la vez el tener el cromatograma a la longitud de 254nm¹⁵. Lo anterior le permite a este detector el poder realizar estudios en 3 dimensiones que permite trabajar con el sistema de HPLC de maneras que no lo permite el dispersivo.

Sistema de Registro

Su función es convertir la propiedad medida por el detector a algo entendible para el ser humano, y para ello se utilizan integradores o computadoras.



Figura 2.19: Integrador marca Shimadzu utilizado en este trabajo.

El resultado de una separación cromatográfica, es un gráfico de la señal obtenida por el detector contra el tiempo de elución en minutos, conocido como cromatograma.

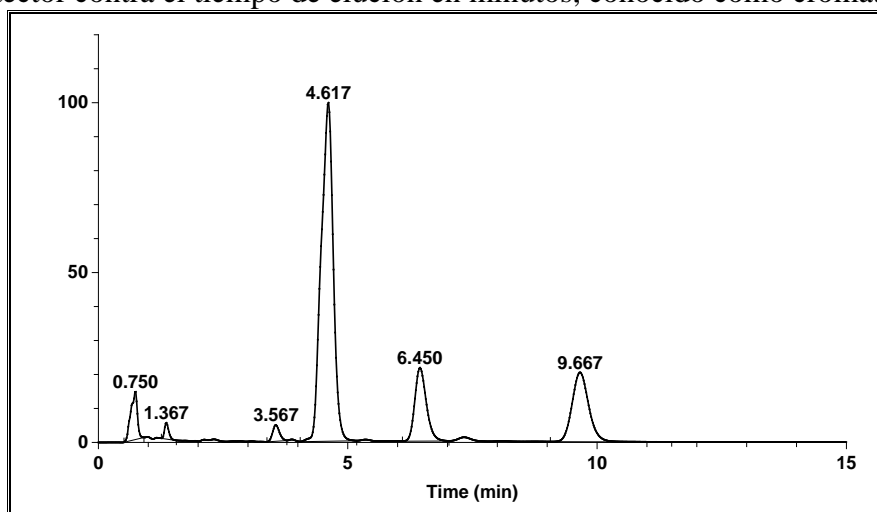


Figura 2.20: Ejemplo de un cromatograma.

De éste se obtienen señales llamados picos que representan los diferentes compuestos que forman la muestra.

Del cromatograma se pueden obtener diferentes parámetros como el tiempo de retención, anchura de la base, el área del pico y la altura del pico y con ello se pueden realizar el cálculo de parámetros cromatográficos como la eficiencia, selectividad, factor de capacidad y resolución, y también el realizar el análisis cualitativo y cuantitativo de las muestras por esta técnica.

Análisis Cualitativo

Para realizar el análisis cualitativo en cromatografía se utilizan los tiempos de retención de los compuestos de una muestra en el cromatograma obtenido de éste, y se buscan comparar estos tiempos de retención con los que se tienen al inyectar los estándares de dichos compuestos a las mismas condiciones cromatográficas a las que fue corrida la muestra.

Lo anterior plantea que hay que tener una idea de los compuestos que pueden estar presentes en la muestra así como de tener sus estándares, lo que no siempre es posible sobre todo en mezclas muy complejas en las que se podrían tener varios compuestos que eluyan a los mismos tiempos de retención, ni que decir cuando el compuesto es desconocido. Esto a limitado el análisis cualitativo en algunos casos, es por ello que se buscó eliminar o compensar esta limitación al utilizar detectores de técnicas espectroscópicas muy cualitativas como la Espectroscopia IR o la Espectrometría de Masas, siendo esta última la que más auge a tenido al acoplarse con las técnicas cromatográficas, dándole actualmente una fuerza cualitativa a la cromatografía al tener este acoplamiento, sobre todo para la identificación de analitos en muestras con mezclas complejas de éstos.

Análisis Cuantitativo

Para realizar el análisis cuantitativo en cromatografía se utiliza la altura o el área del pico cromatográfico, aunque se sigue usando más el área ya que sigue dando mejor precisión.

La técnica cromatográfica puede aplicar todos los métodos cuantitativos utilizados en el área instrumental, éstos son los siguientes:

1) Normalización

Consiste en dividir el área de cada compuesto entre el área total de todos los compuestos presentes en el cromatograma y posteriormente multiplicar dicho resultado por 100 para obtener el porcentaje de cada compuesto.

$$\% Ai = \frac{Ai}{\sum Ai} \times 100$$

2) Normalización con factor de corrección

En este método se utiliza un factor de corrección (f) que se calcula de cada compuesto, éste se multiplica o divide a cada área del compuesto correspondiente para compensar la respuesta que presenta cada compuesto en el detector, y una vez hecho esto, se aplica el proceso del método de normalización volviendo a dividir el área corregida de cada compuesto, entre el área total corregida de los compuestos y posteriormente se multiplica dicho resultado por 100 para obtener el porcentaje de cada compuesto.

$$\% Ai = \frac{Aifi}{\sum Aifi} \times 100$$

3) Estándar externo, patrón externo o calibración absoluta

Se basa en la aplicación de una constante de respuesta de los analitos con el respectivo detector, el cual es conocido como Factor de respuesta (Fr), y cuya definición es:

$$Fr = \text{área}/\text{concentración}$$

Al reordenar la ecuación que define el Fr de la siguiente manera:

$$A = FrC$$

Planteada así la ecuación indica que si se gráfica el área del compuesto contra su concentración (curva patrón), se debe obtener una tendencia lineal cuya pendiente será el Fr y que tiende al origen (ordenada 0). Una vez que se obtiene lo anterior y conociendo el área de la muestra, se obtiene la concentración de la muestra despejando ésta de la ecuación mencionada.

4) Estándar interno, patrón interno o calibración relativa

En este método se va a relacionar la concentración de los analitos a cuantificar con la concentración de un compuesto llamado estándar interno. El estándar interno es un compuesto que debe cumplir los siguientes requisitos para esperar poder cumplir que se pueda obtener los resultados adecuados:

- Que no se encuentre en la muestra a estudiar.
- Encontrarse a la misma concentración tanto en las disoluciones estándar como en la disolución de la muestra que se inyectan en el cromatógrafo.
- Ser una sustancia similar al analito.
- Salir a un tr cercano al analito o analitos a cuantificar.
- Estar bien resuelta su señal (o pico) con respecto a los demás picos presentes en el cromatograma.
- La concentración del estándar interno tiene que ser del mismo orden de magnitud que la concentración del analito a cuantificar y dar una respuesta semejante en el detector, a fin de minimizar el error al calcular los cocientes de respuesta.

El proceso de cuantificación se basa en la aplicación de una constante de respuesta de los analitos con el respectivo detector y el del estándar interno, el cual es conocido como Factor de respuesta relativo (Frr), y cuya definición es:

$$Frr = \frac{Frc}{Frei} = \frac{\frac{Ae}{Cc}}{\frac{Aei}{Cei}} = \frac{(Ac)(Cei)}{(Aei)(Cc)}$$

donde:

Frc=factor de respuesta del compuesto.

Frei=factor de respuesta del estándar interno.

Ac=área del compuesto.

Aei=área del estándar interno.

Cc=concentración del compuesto.

Cei=concentración del estándar interno.

Al reordenar la ecuación que define el Frr de la siguiente manera:

$$\frac{Ac}{Aei} = Frr \frac{Cc}{Cei}$$

Planteada así la ecuación indica que si se gráfica la relación de las área del compuesto y el del estándar interno contra la relación de la concentración del compuesto y el del estándar interno (curva patrón), se debe obtener una tendencia lineal cuya pendiente será el Frr y con tendencia al origen (ordenada 0). Una vez que se obtiene lo anterior y conociendo el área de la muestra y del estándar interno, se obtiene la concentración de la muestra despejando ésta de la ecuación mencionada.

$$Cc = \frac{(Ac)(Cei)}{(Aei)(Frr)}$$

5) *Adición patrón*

Este método se utiliza cuando se trabaja en el límite de sensibilidad del instrumento o si se tienen fenómenos de matriz. Este método se trabaja añadiendo una cantidad constante de muestra a las disoluciones incluido el blanco, aplicando el mecanismo ya sea en el método de estándar externo o interno, aprovechando la ecuación de una línea recta se obtendrá el valor de la concentración cuando el valor de la ordenada se considere 0.

Validación^{17,18,19,20}

La validación es un procedimiento que permite tener una evidencia documentada de diferentes requisitos que los laboratorios deben de cumplir para demostrar que:

- Operan un sistema de calidad.
- Son técnicamente competentes.
- Son capaces de generar resultados técnicamente validos.

La validación se define como el grado de validez de un proceso de medición. La validación de un método analítico se lleva a cabo según los fines para los cuales se aplicará éste. En general los parámetros que se evalúan normalmente en una validación analítica instrumental son: condiciones óptimas de trabajo, linealidad, precisión, reproducibilidad, repetibilidad, exactitud, cantidad mínima detectable, tolerancia del sistema, estabilidad de la muestra, etc. Se mencionaran a continuación aquellos que se determinaron en este trabajo.

Condiciones de óptimas de trabajo del sistema

Al realizar la validación de un método es necesario encontrar las condiciones adecuadas de trabajo tanto en las técnicas de medición como en las de preparación de la muestra. Como este trabajo realiza el planteamiento de una práctica para comparar el uso de varias técnicas instrumentales para analizar a un mismo compuesto se buscará enseñarles a los alumnos algunos de los puntos básicos que se requieren trabajar en cada técnica instrumental para encontrar las condiciones óptimas de trabajo en cada una de ellas.

Como un punto general se les indicará a los alumnos de la importancia de saber preparar correctamente las disoluciones necesarias en cada técnica, ya que el instrumento no arreglará los errores humanos que se realicen al preparar las disoluciones, por lo que se les deben recordar las buenas prácticas de laboratorio en el pesado de los compuestos y preparación de disoluciones.

Posteriormente se les explicará junto con el manejo del instrumento de cada una de las técnicas a trabajar, que parámetros son de importancia en controlar y ordenar en los instrumentos, para buscar obtener en dichos instrumentos los mejores resultados.

Linealidad del sistema

La linealidad del sistema es una medida que estudia la relación entre la respuesta obtenida por el instrumento y la concentración del analito en estudio y que se espera que esta tienda a ser una línea recta en el intervalo estudiado. La gráfica obtenida se le llama curva patrón o de calibración.

En este estudio se debe probar que la variable dependiente (señal) es directamente proporcional a la variable independiente (concentración), por lo cual se realizan el gráfico para observar la tendencia lineal y de ser así posteriormente su regresión lineal.

La curva de calibración se realiza con un reactivo de alta pureza o certificado del analito que se desea cuantificar, pero si esta herramienta de medición está mal calculada generará resultados erróneos por lo cual el control de calidad de la curva de calibración es un punto crítico en las buenas prácticas de laboratorio.

Para hacer una curva de calibración se requiere mínimo realizar los siguientes pasos:

- Preparar 7 (mínimo) o más disoluciones patrón de calibración.

- Deben espaciarse uniformemente sobre el intervalo de concentración de interés.
- Deben de leerse por lo menos por triplicado cada punto.
- Debe ser repetible.

El problema al hacer mediciones químicas es que se presenta incertidumbre tanto en la variable medida como en la concentración de las disoluciones, por lo cual la ecuación que representa más las curvas de calibración de las técnicas instrumentales de medición se expresa comúnmente con la ecuación de una recta **señal=cte.*C+b** o estadísticamente **y=mx+b**.

Al realizar la curva de calibración lo primero que se debe observar gráficamente es si los datos obtenidos de las disoluciones estándar presentan linealidad y si tiende a la ordenada al origen o a algún valor en particular. Si se define que se tiene una tendencia lineal y tiende hacia el origen, utilizaremos la ecuación base planteada por la técnica analítica instrumental que se aplica o la ecuación clásica de una línea recta.

De esta decisión se plantearán los datos a los que se les aplicará la regresión lineal, esto será:

-Tomando en cuenta todos los datos de los estándares así como la ordenada al origen (normalmente 0,0). Aquí se utiliza la ecuación base de la técnica.

-O tomando que si existe una tendencia lineal pero no tiende al origen (0,0), entonces se realiza la regresión lineal no incluyendo dicho valor. Aquí se utiliza la ecuación formal de la línea recta.

En caso de que se deseen eliminar puntos de los estándares en la gráfica se necesita realizar una prueba de datos aberrantes ya que no es posible eliminarlos sin una justificación.

Como la observación de la tendencia al origen puede plantear errores por parte del observador, se comprueba la decisión sobre el razonamiento planteado con la observación realizando un tratamiento estadístico a los datos planteados en la gráfica, este planteamiento estadístico es el conocido como pruebas de hipótesis y está se realiza sobre la ordenada, y así tomar la decisión adecuada a tomar sobre las ecuaciones a utilizar así como de la regresión. El proceso matemático estadístico planteado es el siguiente:

1.- Establecer las pruebas de hipótesis:

$$\begin{array}{ll} H_0: b = \beta, \text{ donde } \beta = 0 & \text{(Hipótesis nula)} \\ H_1: b \neq \beta & \text{(Hipótesis alterna)} \end{array}$$

donde:

b=ordenada al origen.

β =ordenada al origen poblacional.

2.- La prueba estadística a utilizar es la “t de student”.

3.- Se realiza el cálculo matemático para obtener la t_{cal} con los datos obtenidos con la siguiente ecuación:

$$t_{cal} = \left(\frac{(b) - \beta}{Se} \right) \sqrt{\frac{n(Sxx)}{Sxx + n(X)^2}}$$

donde:

n=número de observaciones experimentales independientes.

Error típico de la estimación:

$$Se = \sqrt{\frac{((Sxx)(Syy)) + (Sxy)^2}{(n-2)(n)(Sxx)}}$$

Media experimental de la variable independiente:

$$\bar{X} = \frac{\sum x_i}{n}$$

Suma de cuadrados de la variable independiente:

$$Sxx = n \sum_{i=1}^n x_i^2 - (\sum_{i=1}^n x_i)^2$$

Suma de cuadrados de la variable dependiente:

$$Syy = n \sum_{i=1}^n y_i^2 - (\sum_{i=1}^n y_i)^2$$

Suma de cuadrados de la variable independiente y dependiente:

$$Sxy = n \sum_{i=1}^n x_i y_i - (\sum_{i=1}^n x_i)(\sum_{i=1}^n y_i)$$

4.- Una vez obtenida la t_{cal} se procede a obtener la t de tablas de probabilidad ($t_{teórica}$) considerando que es una prueba a dos colas y con un nivel de significancia del 95% y tomando n-2 grados de libertad.

5.- Para rechazar la hipótesis nula se requiere que:

$$-t_{cal} < -t_{\alpha/2} \text{ o } t_{cal} > t_{\alpha/2}$$

6.- Se compara la t_{cal} con respecto a la $t_{teórica}$

7.- Concluir respecto a rechazar o no rechazar la hipótesis nula y así tomar la decisión de utilizar la ecuación lineal que tome o no en cuenta como ordenada al origen el 0 para cuantificar la muestra.

8.- Se calculan los intervalos de confianza para la ordenada y la pendiente.

Intervalo de confianza para la ordenada (IC_b).

$$IC_b = b \pm (t_{\alpha/2} * Se) \sqrt{\frac{Sxx + (n * \bar{X})^2}{(n)(Sxx)}}$$

Intervalo de confianza para la pendiente (IC_m).

$$IC_m = m \pm (t_{\alpha/2} * Se) \sqrt{\frac{n}{Sxx}}$$

Precisión del sistema

Esto permite conocer la concordancia entre resultados de ensayos mutuamente independientes cuyos valores de magnitud son obtenidos por mediciones repetidas de una magnitud bajo condiciones específicas. Como la precisión es generalmente dependiente de la concentración del analito debería determinarse a varias

concentraciones para documentar si existe o no proporcionalidad de la desviación estándar y la concentración del analito.

Con los datos obtenidos se realizan los siguientes pasos con el fin de conocer la precisión del sistema que se trabaja y compararla con alguna designada por alguna institución.

1.- Se establece la prueba de hipótesis sobre las varianzas.

$$\begin{aligned} H_0: s_{\text{exp}}^2 &= \sigma_0^2 && \text{(Hipótesis nula)} \\ H_1: s_{\text{exp}}^2 &> \sigma_0^2 && \text{(Hipótesis alterna)} \end{aligned}$$

donde:

σ_0^2 = Valor teórico de referencia y se obtiene del coeficiente de variación planteado, (en este trabajo mínimo del 5% del coeficiente de variación).

s_{exp}^2 = Varianza obtenida experimentalmente.

2.- Se aplica la prueba de hipótesis unilateral sobre las varianzas utilizando como estadístico de prueba la χ^2 (ji cuadrada), bajo las condiciones de grados de libertad n-1 y a un nivel de significancia del 95%.

$$CV = \frac{S}{X} * 100 = \frac{\sigma_0}{X} * 100$$

$$\sigma_0 = ((CV * X) / 100)$$

$$\sigma_0^2 = ((CV * X) / 100)$$

3.- Y con este valor se realiza el cálculo matemático para obtener la χ_{cal}^2 con los datos obtenidos con la siguiente ecuación:

$$\chi_{\text{cal}}^2 = \frac{(n-1)s^2}{\sigma_0^2}$$

4.- Revisar en tablas el valor de χ_{tablas}^2 tomando que es una prueba de una sola cola, a un nivel de significancia del 95% y con n-1 grados de libertad.

5.- Revisar las tablas de rechazo de la hipótesis nula para esta prueba:

$$\chi_{\text{cal}}^2 > \chi_{\text{tablas}}^2$$

6.- Se compara χ_{cal}^2 respecto a χ_{tablas}^2

7.- Se concluye respecto a rechazar o no rechazar la hipótesis nula y así tomar la decisión de si se cumple o no la precisión planteada por la institución que exija el estudio.

8.- Calcular el intervalo de confianza para s^2 tomando en cuenta un CV del 5% ya establecido.

$$\sqrt{\frac{(n-1)s^2}{\chi^2_{\alpha/2}}} < s < \sqrt{\frac{(n-1)s^2}{\chi^2_{(1-\alpha/2)}}$$

Normalmente el coeficiente de variación establecido para la técnicas espectroscópicas debe ser $CV \leq 3\%$ y para HPLC $CV \leq 2\%$ de acuerdo a la guía de validación de métodos analíticos para la industria farmacéutica²⁰.

CAPÍTULO III

Desarrollo experimental.

Como el planteamiento de este trabajo es una práctica integral en la que se busca que los alumnos aprendan el uso de 3 técnicas instrumentales y su aplicación al trabajar con un mismo fármaco. Por lo tanto este capítulo se plantea escribiendo la información experimental aplicada en cada una de las técnicas analíticas trabajadas.

ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO^{19,20,21,22}

Material y Aparatos

- Espátula cromo-níquel.
- Navecilla para pesar.
- 1 vaso de precipitados de 10mL.
- Pipeta Pasteur.
- Gendarme.
- Mortero de ágata.
- Ventanas de NaCl.
- Pastilladora.
- Prensa (Marca Osyma).
- Balanza analítica. (Marca Sartorius AG, modelo CP1245, con certificado ISO 9001 con una capacidad máxima de 120g y una sensibilidad de 0.1mg)

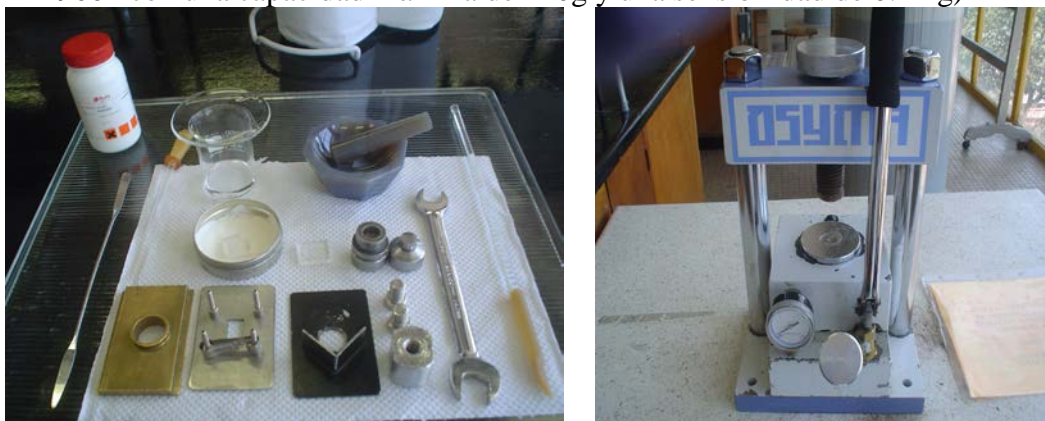


Figura 3.1: Material utilizado para el desarrollo de la practica análisis de isoniazida por técnica de IR.

Reactivos y Sustancias

- Estándar de Isoniazida (Pureza 99%, Marca Fluka, con referencia 13377, de la compañía Sigma–Aldrich Química, S.A. de C.V.)
- Nujol grado espectroscópico. Perkin Elmer.
- Bromuro de Potasio.
- Cloroformo de grado espectroscópico. J.T. Baker.
- Muestra proporcionada por el Centro de Salud Social (tableta de 500mg de isoniazida)

Instrumento

Espectrofotómetro FTIR, marca Perkin Elmer, modelo spectrum 2000 Explorer.



Figura 3.2: Diferentes tomas del espectrofotómetro utilizado.

Validación de la técnica de IR

Lo primero que se le enseñará a los alumnos y que se realizó, fue la calibración automática que realiza el instrumento, luego se registra el espectro del medio ambiente (conocido con el término “background” en inglés) y así realizar posteriormente la comprobación de su precisión espectral con la película de poliestireno obteniendo el espectro y comprobando las bandas características de éste.

Condiciones óptimas de trabajo del Espectrofotómetro FTIR

Para realizar lo mencionado anteriormente, así como la obtención de los espectros del compuesto en estudio (isoniazida), las condiciones de trabajo en el equipo FTIR (que se manipula con el programa “Spectrum for windows”) fueron:

- Número de barridos: 15
- Inicio del barrido: 4000cm^{-1}
- Terminación del barrido: 400cm^{-1}
- Resolución: 4cm^{-1}
- Apodización: Fuerte

De acuerdo a las características físicas de nuestro compuesto que es un sólido, las técnicas recomendadas en la literatura para el desarrollo de la práctica de isoniazida son la de pastilla y suspensión por lo que se procedieron a realizar éstas de la siguiente manera.

A continuación se explican las técnicas de preparación de muestra que se aplican en este trabajo, hay que indicar que dichas preparaciones se realizarán tanto para el estándar de isoniazida como para las tabletas que se utilizan como muestra, ya que se busca comparar los espectros de cada uno de ellos.

Procedimiento para obtener el espectro de isoniazida mediante la técnica de pastilla.

En un mortero de agata se colocaron aproximadamente 2mg de muestra problema (estándar de isoniazida o muestra) y 25mg de KBr previamente seco, se muelen hasta obtener un polvo fino.

Se coloca parte de la mezcla en la pastilladora (hacer que los alumnos observen la cantidad colocada), colocar la pastilladora a la prensa para ser sometida a una presión de 5 toneladas aproximadamente. Al liberar la presión se recomienda tomar la pastilladora y colocándola en posición horizontal girar las piezas de la pastilladora para quitarlas y asegurar que queda correctamente la pastilla, esperando que esta no éste rota y lo menos opaca posible (de preferencia transparente), y posteriormente montar la pastilla en el equipo de FTIR.

Si el grosor y concentración de la muestra es adecuada las bandas del espectro obtenido deberán ser delgadas, bien definidas, y con un % de transmitancia arriba del 20%, de lo contrario revisar las recomendaciones que se mencionan a continuación:

En este tipo de preparación es muy importante que cada que se realiza una pastilla, se debe limpiar la pastilladora con papel y un escobillón delgado para asegurar que no quede polvo de la muestra ya que de lo contrario además de poder contaminar la muestra, se puede ocasionar daño a la pastilladora al apretarse por la presión realizada por la prensa y quedar este polvo apretado entre los metales. Al final se limpia con cloroformo.

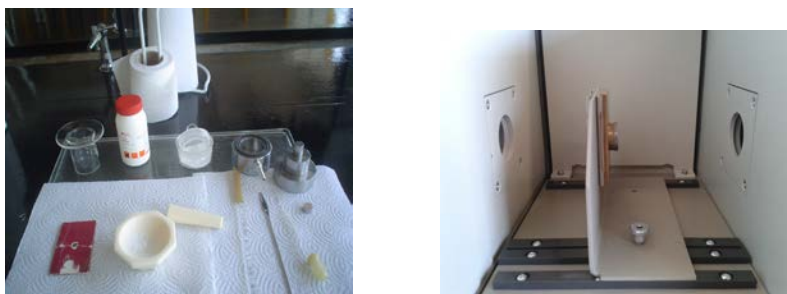


Figura 3.3: Material utilizado en la técnica de pastilla en el estándar y tableta de isoniazida así como su respectivo montaje.

Procedimiento para obtener el espectro de isoniazida mediante la técnica de suspensión.

Colocar aproximadamente 2mg de muestra problema (estándar de isoniazida o muestra) en un mortero de agata y moler para homogenizar, agregar una gota de Nujol a la muestra en el mortero de agata y mezclar hasta obtener una suspensión de consistencia parecida a una pasta de dientes. Colocar la suspensión con ayuda de un gendarme en forma de pulsos irregulares (no dar brochazos).



Figura 3.4: Montaje de las ventanas de NaCl con el estándar de isoniazida por técnica de suspensión.

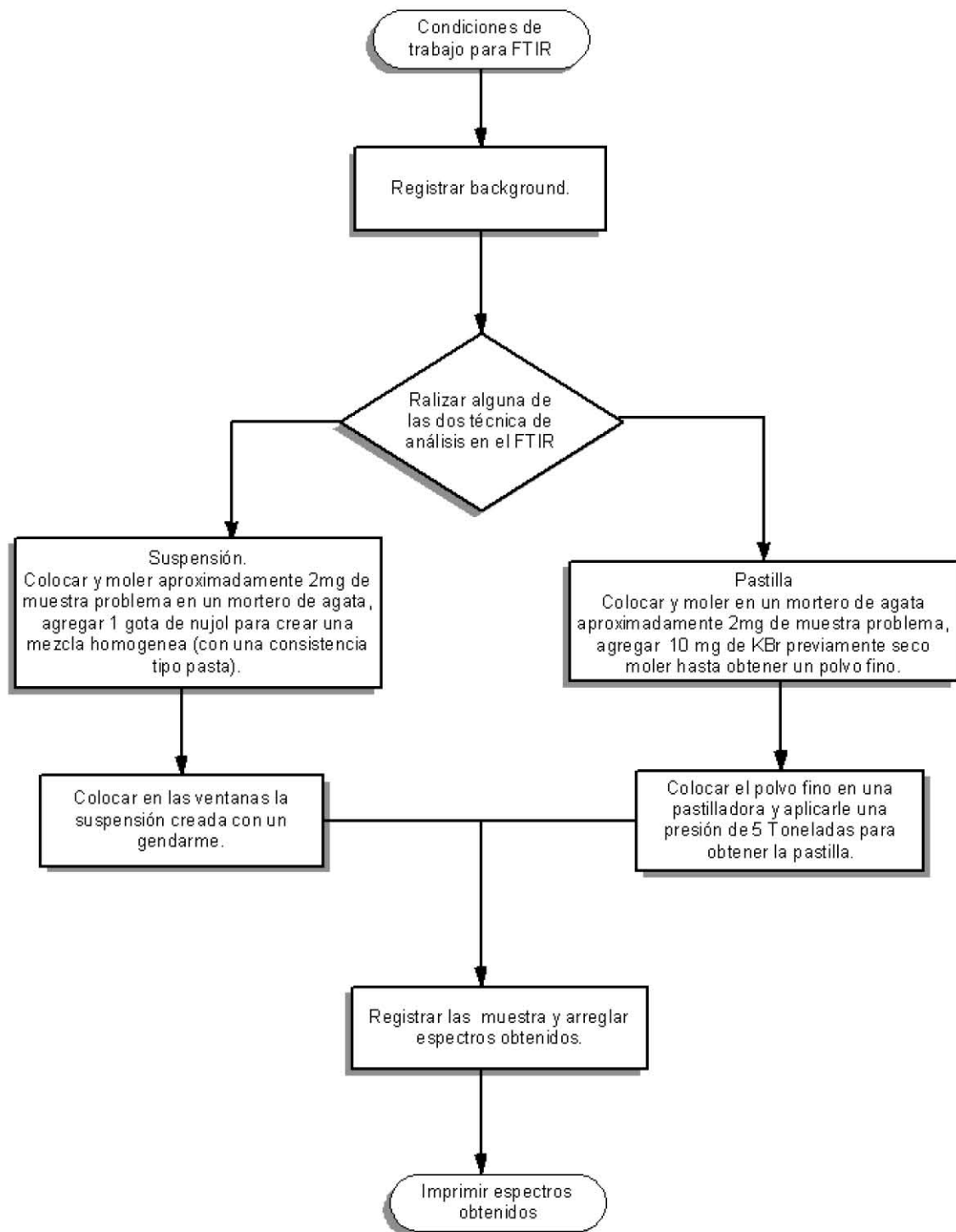


Diagrama de flujo del trabajo experimental en la parte de Espectroscopia IR

ESPECTROSCOPIA UV-Vis^{19,20,21,22,23}

Material y Aparatos

- Navecilla para pesar.
- 4 vasos de precipitados de 10mL.
- Pipeta Pasteur.
- 1 vaso de precipitados de 100mL.
- 8 matraces aforados de 10mL de tipo A.
- 1 matraz aforado de 100mL.
- Micropipetas de desplazamiento de aire:
 - 1 micropipeta de 0.5-5mL.
 - 1 micropipeta de 100-1,000 μ L.
- Espátula cromo-níquel.
- Pizeta.
- Material de vidrio general de uso en el laboratorio.
- 2 Celdas de cuarzo para el instrumento respectivo.
- Balanza analítica. (Marca Sartorius AG, modelo CP1245, con certificado ISO 9001 con una capacidad máxima de 120g y una sensibilidad de 0.1mg).

Reactivos y Sustancias

- Estándar de Isoniazida (Pureza 99%, Marca Fluka, con referencia 13377, de la compañía Sigma–Aldrich Química, S.A. de C.V.)
- Agua destilada.
- Disolución de HCl 0.1N

Instrumento

- Espectrofotómetro UV-Vis dispersivo de doble haz, marca Perkin-Elmer, modelo Lambda 25.

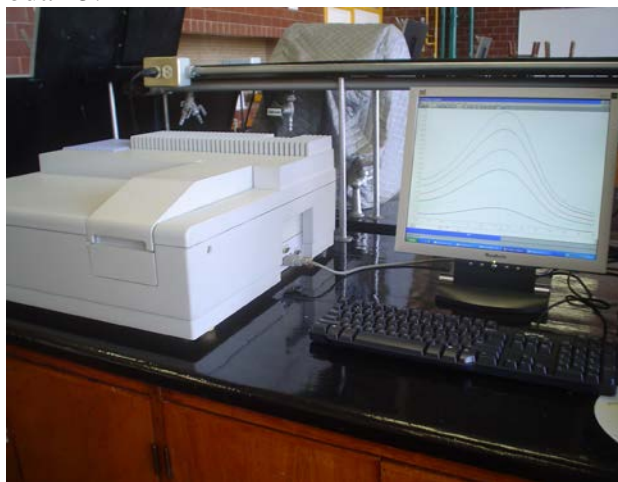


Figura 3.5: Espectrofotómetro de UV-Vis.

Validación de la técnica UV-Vis

Para realizar la validación del sistema para la técnica UV-Vis se procedió primero a encontrar las condiciones óptimas de trabajo al tener a la muestra en disoluciones con H₂O destilada y HCl 0.1N.

Condiciones óptimas de trabajo del Espectrofotómetro UV-Vis

Para realizar lo mencionado anteriormente, así como la obtención de los espectros del compuesto en estudio (estándar de isoniazida), las condiciones de trabajo en el equipo UV-Vis (que se manipula con el programa "Spectrum for windows") fueron:

Intervalo de barrido: 200-300nm
Eliminar ruido (Smooth): 2
Velocidad de barrido: 240nm/min
Unidades: Absorbancia (A)
Resolución: 1nm
Rendija (Slit): 1nm

Linealidad del sistema

Después de revisar en la literatura las características físicas, químicas de la isoniazida y conocer los métodos usados para la identificación de isoniazida en medicamentos se optó por realizar el siguiente procedimiento para la preparación de disoluciones de isoniazida.

Preparación y realización de la curva de calibración:

- Se pesaron 20.4mg del estándar de isoniazida y llevaron al aforo en un matraz volumétrico de 10mL con agua destilada, obteniéndose una concentración de 2,040ppm (disolución stock o madre).
- De la disolución madre se tomó una alícuota de 2.45mL y se llevaron al aforo en un matraz volumétrico de 10mL con una disolución de HCl 0.1N para obtener una concentración de 499.8ppm (disolución secundaria 1). Se realizó el mismo procedimiento mencionado anteriormente pero aforando con agua destilada (disolución secundaria 2) en lugar del HCl 0.1N.
- Para preparar las disoluciones estándar de isoniazida de 5, 10, 15, 20, 25 y 30ppm se tomaron alícuotas de 100, 200, 300, 400, 500 y 600μL respectivamente de las disoluciones 1 y 2, llevándose al aforo respectivamente con HCl 0.1N (para la curva de calibración 1) y H₂O (para la curva de calibración 2) respectivamente en matraces volumétricos de 10mL. Realizando por duplicado cada disolución estándar para cada disolvente (se llaman línea 1 y 2).
- Cada disolución estándar se introdujo y leyó por triplicado de manera independiente en orden ascendente de concentración en el espectrofotómetro de UV-Vis en celdas de cuarzo, con la finalidad de obtener sus espectros respectivos.

Repetibilidad y reproducibilidad de la linealidad del sistema

Para probar la repetibilidad y reproducibilidad de la curva de calibración del estándar de isoniazida aforada con HCl 0.1N (pH ácido) en otro espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 25 que se tiene en el laboratorio y que los alumnos pueden utilizar también para realizar la práctica. Además que serán alumnos diferentes lo que podrían trabajar con los instrumentos durante la realización de la práctica.

Para ello se registraron los mismas disoluciones estándares de isoniazida de la línea 2 a pH ácido mencionadas anteriormente en la parte de linealidad del sistema, bajo las mismas condiciones instrumentales en ambos equipos el mismo día (día diferente a cuando se realizó la linealidad del sistema). El analista que realiza esta tesis trabajó con el que se llamará instrumento 1, y otra compañera de laboratorio trabajó con el que se llamará instrumento 2.

Esto permitirá comprobar que se obtiene la misma información de la validación de la linealidad en los 2 sistemas, para así tener una idea general de la repetibilidad y reproducibilidad que se tendría en los 2 instrumentos manejados por personas diferentes, pero utilizando las mismas disoluciones.

Precisión del sistema

Para demostrar la precisión del sistema se prepararon 7 disoluciones estándar a una concentración de 15ppm que equivalen al centroide de las curvas patrón de isoniazida realizadas en la prueba de linealidad.

- Para esta parte experimental se volvieron a preparar las disoluciones madre y secundaria con HCl 0.1N. La disolución madre 1 quedó de 1,090ppm y la secundaria de 499.7ppm.
- De esta última disolución secundaria se tomaron 300μL para darnos las disoluciones estándar a 15ppm.
- Cada disolución estándar se introdujo y leyó por quintuplicado de manera independiente en el espectrofotómetro de UV-Vis.
- Nuevamente se volvieron a preparar las disoluciones madre y secundaria con H₂O destilada. La disolución madre 1 quedó de 1,130ppm y la secundaria de 499.5ppm.
- De esta última disolución secundaria se tomaron 300μL para darnos las disoluciones estándar a 15ppm en los matraces volumétricos de 10mL.
- Cada disolución estándar se introdujo y leyó por quintuplicado de manera independiente en el espectrofotómetro de UV-Vis.

Cabe destacar que la etapa de precisión se desarrollo de la misma manera con H₂O destilada, pero pesando 0.0113g del estándar de isoniazida obteniendo una concentración de 1,130ppm para la disolución madre 1 aforando con agua destilada y tomando una alícuota de 4.42mL de ella para preparar la disolución madre 2 de una concentración de 500ppm de la cual partimos para preparar la curva de calibración de los estándares a las concentraciones antes mencionadas.

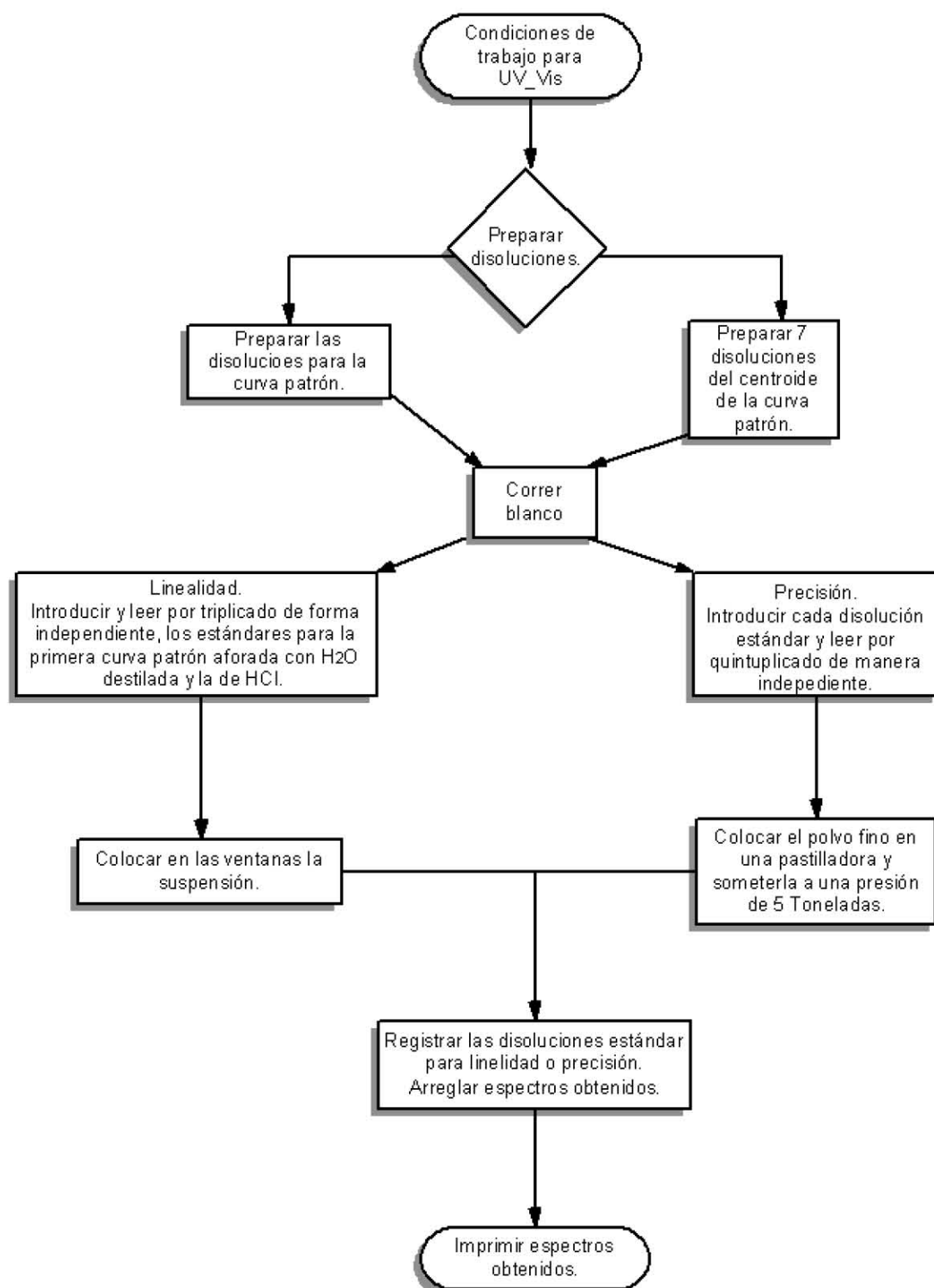


Diagrama de flujo del trabajo experimental en la parte de Espectroscopia UV-Vis

CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA EFICIENCIA^{19,20,21}

Material y Aparatos

- Navecilla o pesa muestra.
- 4 vasos de precipitados de 10mL.
- Pipeta Pasteur.
- 1 vaso de precipitados de 100mL.
- Espátula cromo-níquel.
- Pizeta.
- 16 matraces aforados de 10mL.
- Micro pipeta de embolo o desplazamiento de aire:
 - 1 micropipeta de 0.5 - 5mL.
 - 1 micropipeta de precisión de 100-1000 μ L.
- 1 jeringa para HPLC.
- Balanza analítica. (Marca Sartorius AG, modelo CP1245, con certificado ISO 9001 con una capacidad máxima de 120g y una sensibilidad de 0.1mg).

Reactivos y Sustancias

- Estándar de Isoniazida (Pureza 99%, Marca Fluka, con referencia 13377, de la compañía Sigma–Aldrich Química, S.A. de C.V.)
- Agua destilada.
- Metanol. Grado HPLC. J.T. Baker.

Instrumento

- Cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia modular marca Shimadzu equipado con:
 - Desgasificador HD-1.
 - Mezclador a baja presión, modelo FCV-10AL.
 - Sistema de bombeo, modelo LC-10AD.
 - Válvula de inyección 10 μ l de muestra marca “Rheodyne”.
 - Detector UV-Vis, modelo SPD- 10AV, de longitud de onda variable.
 - Integrador CR601.



Figura 3.6: Cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia modular marca Shimadzu.

Validación de la técnica de CLAE

Para mostrar las condiciones óptimas de trabajo se procedió a realizar la validación del sistema para la técnica HPLC con las disoluciones preparadas con H₂O destilada (pH neutro), desarrollando las siguientes etapas.

Hay que indicar que la linealidad se realizó sólo con disoluciones a pH neutro y con una fase móvil también a pH neutro para evitar posibles daños a la columna (C₁₈) ya que se utiliza el sistema principalmente para la enseñanza de la técnica, realizando prácticas de laboratorio, por lo cual se debe preservar lo mejor posible en cuanto a su vida útil.

Condiciones óptimas de trabajo del CLAE

Para establecer las condiciones cromatográficas se revisaron y compararon condiciones reportadas por catálogos y literatura⁹, llegándose a plantear las siguientes condiciones experimentales en el instrumento que se tiene en el laboratorio 3F marca Shimadzu:

- Columna HPLC: Marca Phenomenex Nucleosil C₁₈, de 5mm de longitud x 4mm de d.i., con tamaño de partícula de 5µm y porosidad de 100Å.
- Fase móvil: Agua/metanol (95:5).
- Detector: UV-Vis a una longitud de onda de 254nm.
- Flujo de la fase móvil: 1.5mL/min.
- Temperatura de la columna: Ambiente.

Linealidad del sistema

Preparación y realización de la curva de calibración:

- Se pesaron 0.0109g del estándar de isoniazida y se llevaron al aforo en un matraz volumétrico de 10mL con agua destilada, obteniéndose una concentración de 1,090ppm (disolución madre).
- Se tomó una alícuota de la disolución madre de 4.58mL y se llevó al aforo en un matraz volumétrico de 10mL con agua destilada para obtener una concentración de 499.2ppm (disolución secundaria).
- Para preparar las disoluciones estándar de isoniazida de 5, 10, 15, 20, 25 y 30ppm se tomaron alícuotas de 100, 200, 300, 400, 500 y 600µL respectivamente de la disolución secundaria y se llevaron al aforo con agua destilada a matraces volumétricos de 10mL respectivamente. Realizando por duplicado cada disolución estándar.
- Cada disolución estándar se introdujo por quintuplicado en orden ascendente de concentración en el cromatógrafo de líquidos obteniendo sus cromatogramas respectivos.

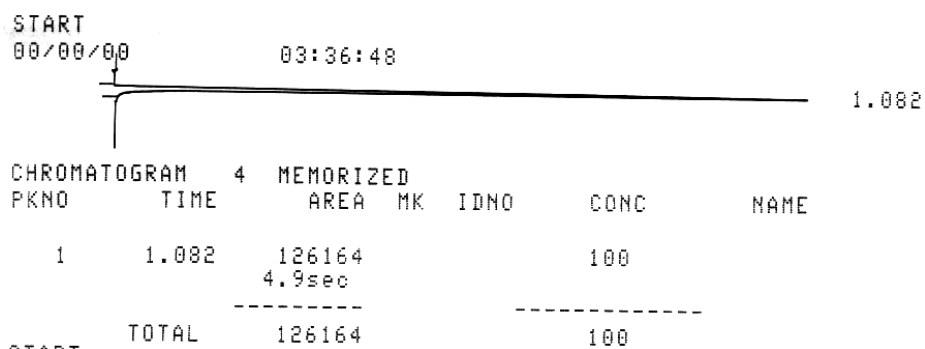


Figura 3.11: Cromatograma de la disolución estándar de isoniazida de concentración 15ppm.

Precisión del sistema

Para demostrar la precisión del sistema se prepararon 7 disoluciones con la concentración del centroide de la curva patrón del estándar de isoniazida que es de 15ppm.

- Las disoluciones se prepararon tomando una alícuota de 300 μ L de la disolución secundaria mencionada en la linealidad del sistema y llevándola al aforo con agua destilada en un matraz volumétrico de 10mL.
- Cada disolución estándar se introdujo y leyó por septuplicado de manera independiente en el cromatógrafo de líquidos.

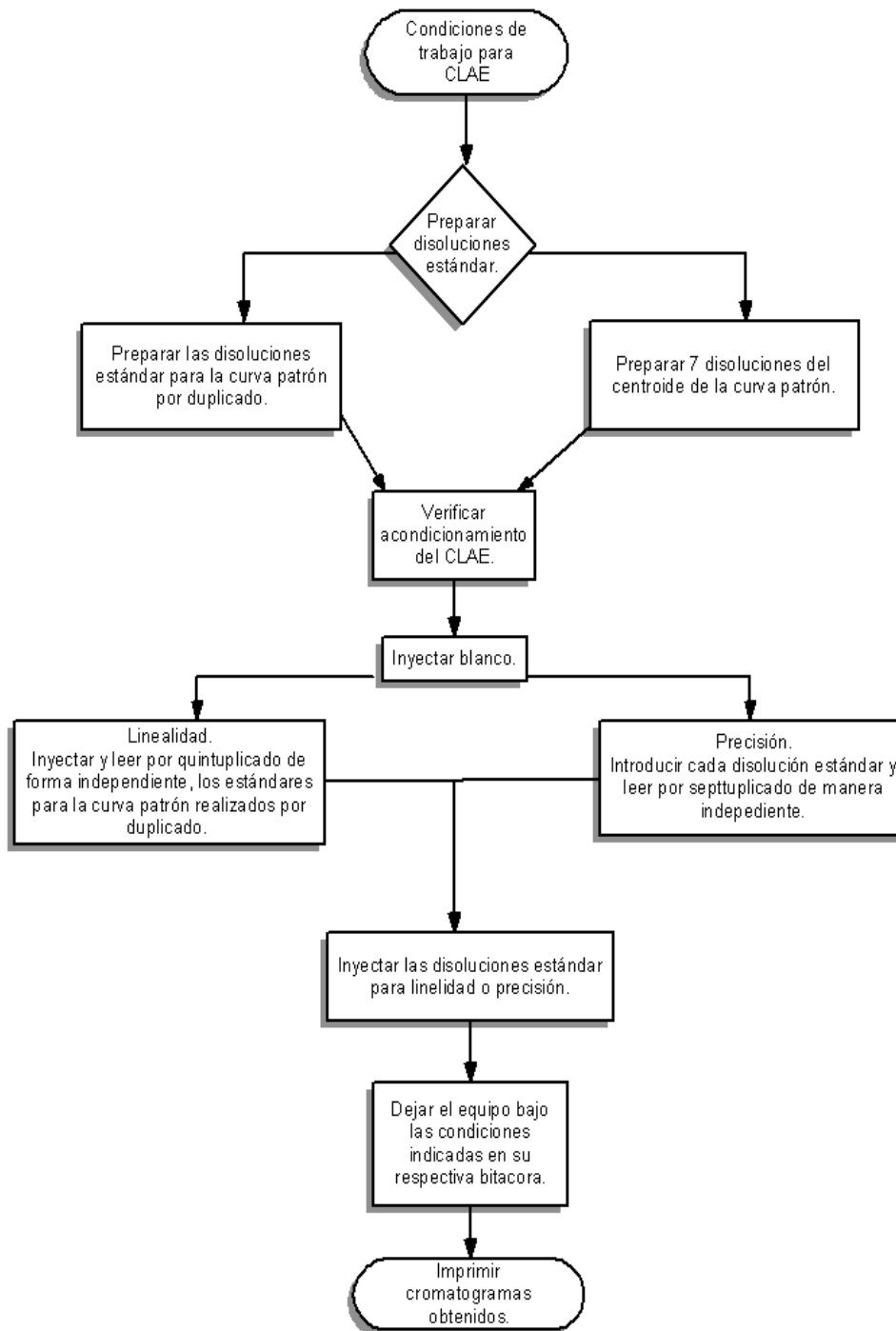


Diagrama de flujo del trabajo experimental en la parte de HPLC

CAPÍTULO IV

Resultados y análisis de resultados

Como el proyecto de esta tesis es el diseño de una práctica, se indicarán en este capítulo notas de lo que realizarán los alumnos así como que información recibirán por parte del profesor, ya que en algunas de las experiencias de cátedra planteadas en este trabajo no podrán desarrollarlos de manera completa los alumnos experimentalmente, esto por no alcanzar el tiempo de duración de las clases con respecto al tiempo real que necesitarían para obtener todo lo indicado en esa parte experimental.

La idea de aplicación de esta práctica es que en la materia en que se realizarán las experiencias de cátedra se imparten 4 módulos de Técnicas Instrumentales, en principio, lo planteado en este trabajo se aplicará en 3 de estos 4 módulos, éstos serían en el de Espectroscópicos Cuantitativos, Espectroscópicos Estructurales y de Separación.

ESPECTROSCOPIA INFRARROJA

Para esta parte el profesor ya debió haber visto con los alumnos en sesiones previas en el módulo donde se enseña la Espectroscopia IR, la familiarización del programa de cómputo así como del Espectrofotometría FTIR con este programa.

Así los alumnos deberán saber registrar el “background” y el porqué hacen eso, además de haber realizado los espectros de IR del nujol, de la pastilla de KBr y las ventanas de NaCl, que son parte del material utilizado en las técnicas de preparación que se realizarán en esta etapa.

El profesor hará que los alumnos realicen la técnica de suspensión y pastilla para el reactivo estándar de isoniazida y sólo la técnica de pastilla para la tableta de isoniazida. Lo anterior para que los alumnos reafirmen o aprendan a trabajar estas técnicas de preparación.

Posteriormente discutirá con ellos los espectros obtenidos que contienen isoniazida considerando que ya se conoce la fórmula de su compuesto y que lo que se plantea en estos casos en la industria farmacéutica es la de comprobación de la pureza de materia prima o confirmación del producto.

A continuación se plantea lo que el profesor deberá enseñar a sus alumnos en cuanto a la dilucidación de las bandas que contienen los espectros obtenidos y la confirmación de los grupos funcionales que presenta el espectro con la estructura de la isoniazida.

Primero se estudiará el espectro del reactivo estándar de la isoniazida por la técnica de pastilla que se muestra a continuación como la figura 4.1.

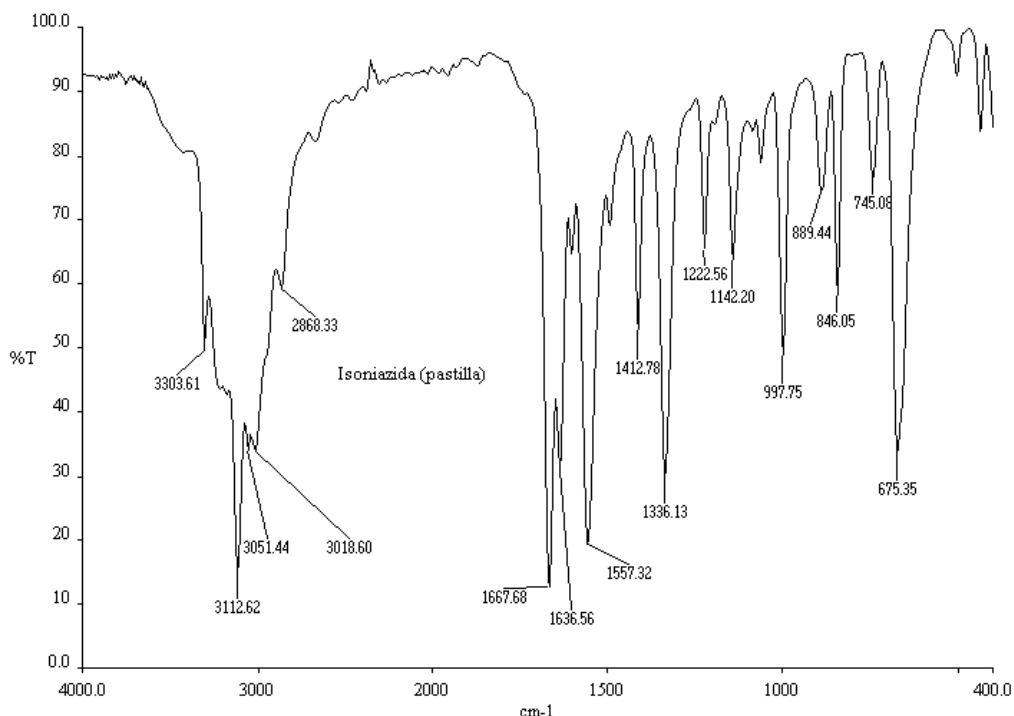


Figura 4.1: Espectro del estándar isoniazida obtenido por la técnica de pastilla utilizando KBr.

El profesor les planteará que se observan bandas generales de insaturación en el intervalo de $3,150-3,000\text{cm}^{-1}$ ($3,112.62\text{cm}^{-1}$, $3,051.44\text{cm}^{-1}$ y 3018.60cm^{-1}) características de las vibraciones longitudinales del enlace C-H del anillo aromático

piridínico. Se confirma que esta insaturación es de tipo aromático al tener presentes 4 bandas características por la zona de $1,600$ a $1,400\text{cm}^{-1}$ ($1,636.56\text{cm}^{-1}$, $1,600\text{cm}^{-1}$, $1,557.32\text{cm}^{-1}$ y $1,500\text{cm}^{-1}$) pertenecientes a las vibraciones longitudinales de los enlaces C=C y C=N del anillo aromático piridínico. Presentando además bandas en 997.75cm^{-1} y 889.44cm^{-1} que indican que el anillo piridínico está monosustituido.

También les indicará que se presenta a $1,636.56\text{cm}^{-1}$ la banda característica de la vibración longitudinal del enlace C=O de grupo carbonilo de amida, y al buscar a que grupo funcional pertenece éste les planteará para su aprendizaje que:

-No se trata de un grupo ácido carboxílico por qué no está presente la banda ancha característica de la vibración longitudinal del enlace O-H por la zona de $3,000\text{cm}^{-1}$.

-No se trata de un grupo aldehído debido a que no se encuentran presentes las bandas de vibración longitudinal C-H del carbono del carbonilo del aldehído conocido como resonancia de Fermí (bandas pequeñas en aprox. $2,820\text{cm}^{-1}$ y $2,720\text{cm}^{-1}$).

-No se trata de un grupo éster porque no se encuentra banda característica aproximadamente por $1,200\text{cm}^{-1}$.

-No se trata de un grupo anhídrido debido a que falta otra señal del otro grupo carbonilo en $1,820\text{cm}^{-1}$.

-Pero como se encuentran bandas en $3,303.61\text{cm}^{-1}$ y $3,112.62\text{cm}^{-1}$ esto indicará las vibraciones longitudinales de enlaces N-H de grupos amina, y que se relacionan con la amida secundaria que está enlazado con el carbonilo, y la amina primaria que también presenta la estructura de la isoniazida.

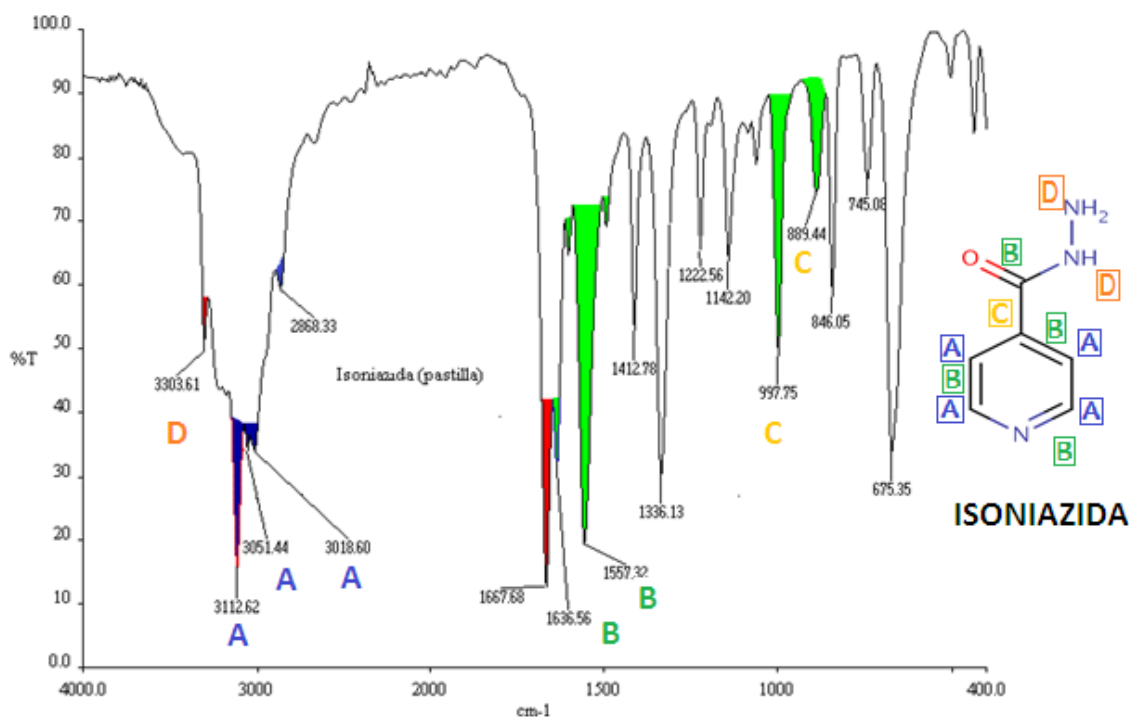


Figura 4.1.1: Espectro del estándar isoniazida por la técnica de pastilla con la indicación de las bandas características del estándar isoniazida.

Al procesar lo anterior el profesor les indicará a sus alumnos que al comparar un espectro IR de un compuesto con el de un reactivo estándar (obtenidos con la misma técnica de preparación) estos son iguales, entonces se puede confirmar que ese compuesto es el mismo que el del estándar.

Una vez realizado lo anterior el profesor discutirá con los alumnos las diferencias espectrales que se obtienen al realizar el espectro obtenido del reactivo estándar de isoniazida por la técnica de suspensión.

Como se puede observar en el espectro de infrarrojo obtenido por la técnica de suspensión, éste presenta casi todas las bandas características de la isoniazida que se obtuvieron con el reactivo estándar por pastilla (figura 4.2).

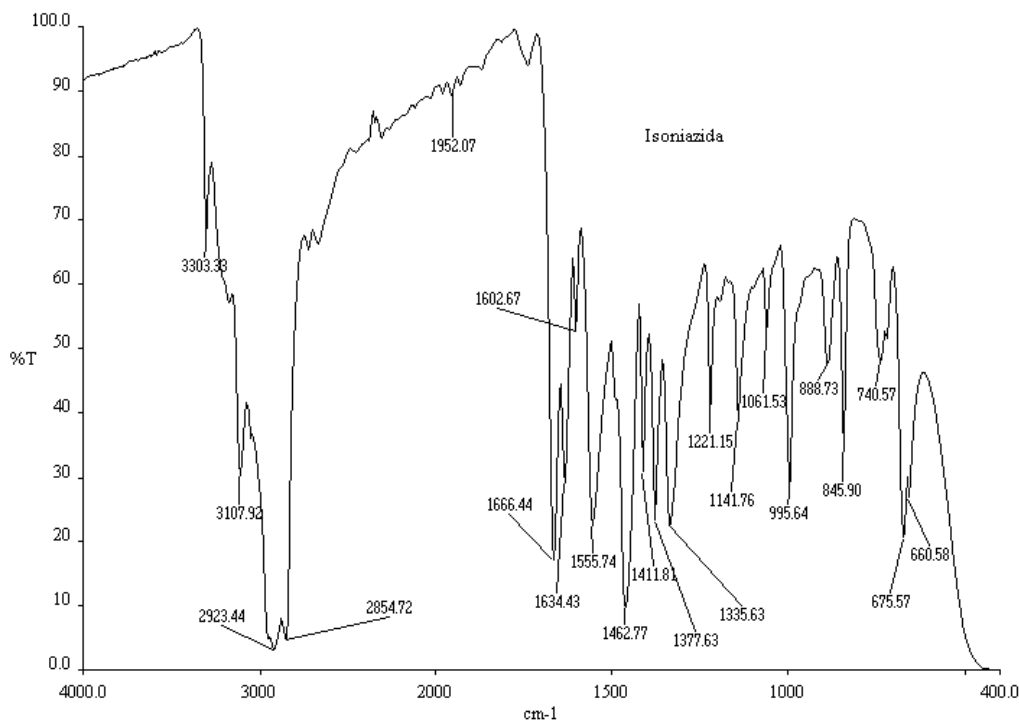


Figura 4.2: Espectro del reactivo estándar de isoniazida por la técnica de suspensión utilizando como líquido dispersante al Nujol.

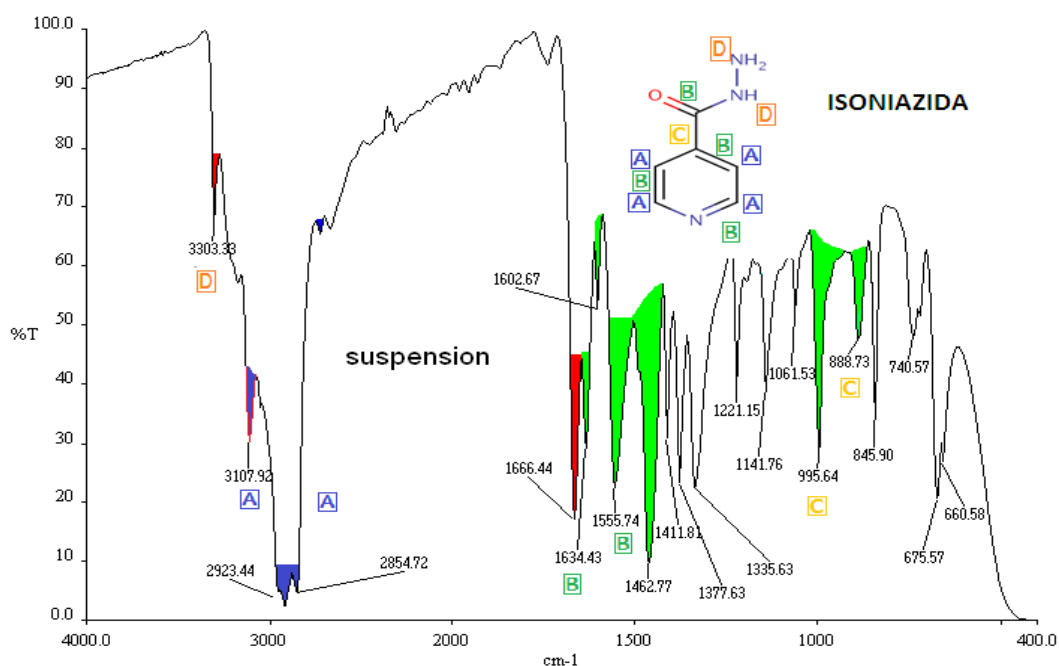


Figura 4.2.1: Espectro del reactivo estándar de isoniazida por la técnica de suspensión con la indicación de las bandas características de la isoniazida.

El profesor les indicará que al tenerse en el espectro las bandas características de los enlaces C-H del hidrocarburo conocido como Nujol, éstas bandas interfieren el visualizar de mejor manera las bandas que se encuentran en las zonas entre $3,100\text{cm}^{-1}$ a $2,800\text{cm}^{-1}$ y entre $1,500\text{cm}^{-1}$ a $1,350\text{cm}^{-1}$.

Las bandas características de la isoniazida se encuentran indicados en la figura 4.2.1

Por lo anterior los alumnos deberán concluir que la mejor técnica de preparación para obtener el espectro IR de isoniazida sería el de pastilla.

Basado en lo anterior los alumnos procederán a realizar por técnica de pastilla una tableta utilizada para la tuberculosis que contiene como principio activo a la isoniazida.

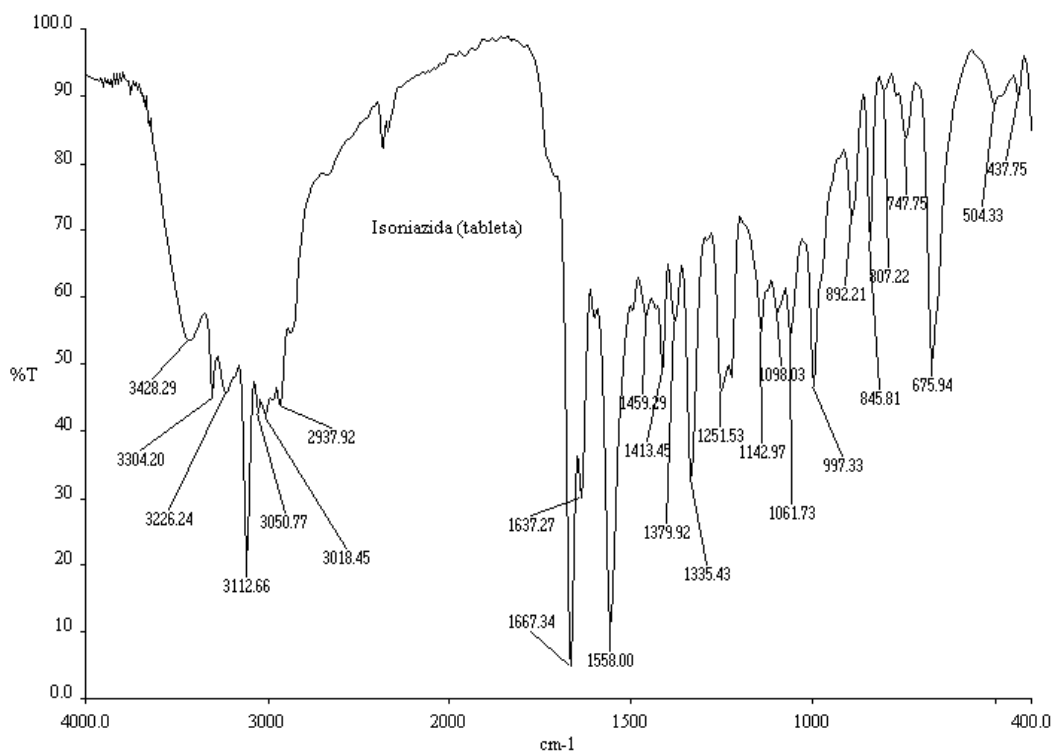


Figura 4.3: Espectro de la tableta para la tuberculosis realizado por la técnica de pastilla utilizando KBr.

El profesor discutirá con los alumnos que en el espectro obtenido se pueden observar las bandas características de la isoniazida, pero que aparecen otras bandas anchas en la región de aproximadamente los $3,500\text{cm}^{-1}$ a los $3,200\text{cm}^{-1}$ que indican la presencia de las vibraciones longitudinales del enlace O-H.

Las bandas características de la isoniazida se encuentran indicadas en la figura 4.3.1.

Lo anterior plantea grupos OH, que son debidas al excipiente que se utiliza para generar las tabletas y que indicarían que es muy probable el uso de almidón o sacarosa o lactosa como los excipientes utilizados, y que la literatura indica que se pueden utilizar.

Pero con este ejemplo el profesor podrá llegar a la conclusión con sus alumnos que se puede llevar un control de calidad para asegurar la presencia del principio activo conocido como isoniazida en las tabletas manejadas en la práctica.

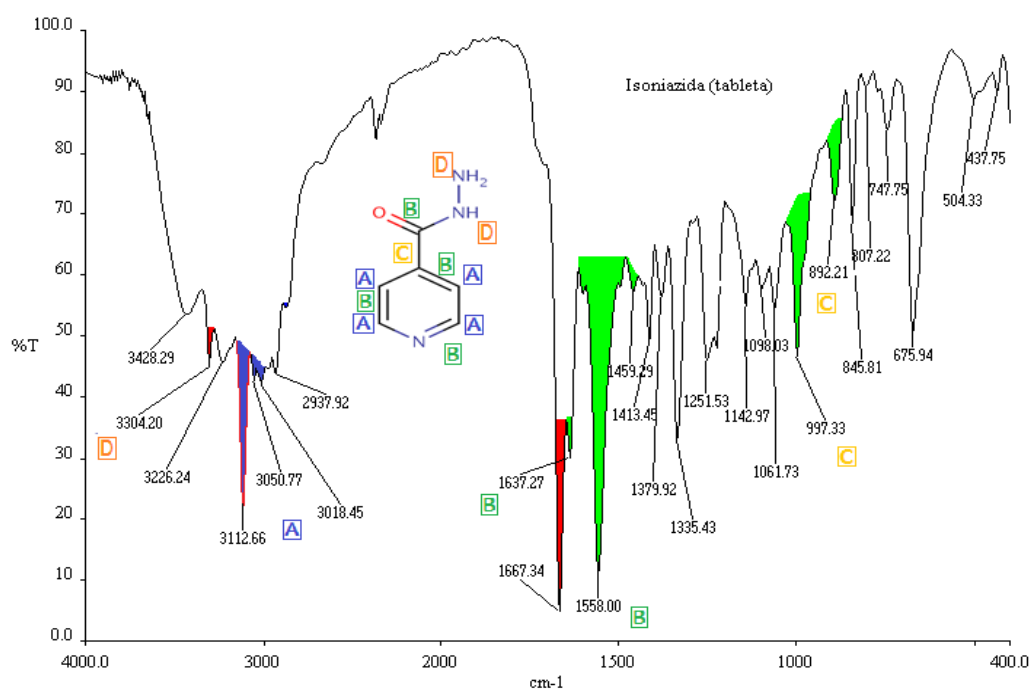


Figura 4.3.1: Bandas características del compuesto isoniazida en el espectro de la muestra de la tableta para la tuberculosis por la técnica de pastilla utilizando KBr.

Con toda la información anterior el profesor le pedirá a los alumnos que busquen en la literatura que bandas en el espectro IR se reportan para la isoniazida.

Con la información encontrada en la literatura y en los espectros trabajados tanto para el reactivo estándar como para la tableta para la tuberculosis, el profesor le pedirá a los alumnos que realicen una tabla comparando las bandas características más importantes mencionadas en la discusión de los espectros obtenidos, como se muestra en la tabla 4.1.

Bandas reportadas por la literatura para la isoniazida. ²⁶	Bandas reconocidas por la técnica de pastilla del estándar de isoniazida.	Bandas reconocidas por la técnica de suspensión del estándar de isoniazida.	Bandas reconocidas por la técnica de pastilla en tabletas para la tuberculosis.
1,667.5 cm ⁻¹	1,667.68 cm ⁻¹	1,666.44 cm ⁻¹	1,667.34 cm ⁻¹
1,557.3 cm ⁻¹	1,557.32 cm ⁻¹	1,555.74 cm ⁻¹	1,558.00 cm ⁻¹
1,412.6 cm ⁻¹	1,412.78 cm ⁻¹	1,411.81 cm ⁻¹	1,413.45 cm ⁻¹
1,336.2 cm ⁻¹	1,336.13 cm ⁻¹	1,377.36 cm ⁻¹	1,379.92 cm ⁻¹
1,222.3 cm ⁻¹	1,222.56 cm ⁻¹	1,221.15 cm ⁻¹	1,251.53 cm ⁻¹
995.9 cm ⁻¹	997.75 cm ⁻¹	995.64 cm ⁻¹	997.33 cm ⁻¹
845.7 cm ⁻¹	846.05 cm ⁻¹	845.90 cm ⁻¹	845.31 cm ⁻¹
676.8 cm ⁻¹	675.35 cm ⁻¹	675.57 cm ⁻¹	675.94 cm ⁻¹

Tabla 4.1: Comparativo de las bandas características obtenidas en la literatura y en la parte experimental de la isoniazida.

ESPECTROSCOPIA UV-Vis

En el caso de la validación de la espectroscopia UV-Vis se presentan todos los resultados obtenidos de linealidad del sistema, repetibilidad y reproducibilidad de linealidad y la precisión del sistema en el anexo 1.

En esta parte el profesor puede utilizar este trabajo experimental para enseñar también el manejo del instrumento y la parte de enseñanza práctica de la información obtenida por esta técnica.

A continuación se presenta el procedimiento que se realizó con los datos obtenidos en este trabajo, pero hay que indicar que esta parte en el desarrollo de la práctica, puede ser aplicada de 2 maneras por parte del profesor:

1) El profesor puede hacer que los alumnos realicen las lecturas de las disoluciones de los estándares indicados en la parte experimental (esto condiciona ya sea que los alumnos preparen los estándares o que el profesor ya se los lleve) y trabajen con los datos que ellos obtienen. El único problema de esto es que el tiempo es amplio y el profesor deberá valorar si eso le permitirá cumplir adecuadamente el trabajo que espera desarrollar durante la clase.

2) El profesor hará que los alumnos realicen las lecturas (llevándoles ya las disoluciones preparadas), pero esto, sólo para que los alumnos realicen experimentalmente la acción de introducir algunas de las disoluciones y vean como se realiza esto en los espectrofotómetros. Para procesar, a los alumnos se les entregarán los datos obtenidos en este trabajo para que el profesor los utilice para enseñar a analizar y procesar la información que se les entrega y que se obtiene con ese instrumento, de la manera que se menciona más adelante en este capítulo. Con esto se podría utilizar mejor el tiempo de la sesión práctica.

Para esta parte experimental cualquiera de las 2 opciones son viables, ya que al tener al menos 2 instrumentos se puede realizar tanto la linealidad como la precisión del sistema de manera rápida.

LINEALIDAD DEL SISTEMA

A continuación se presentan los espectros obtenidos para realizar las curvas patrón del sistema:

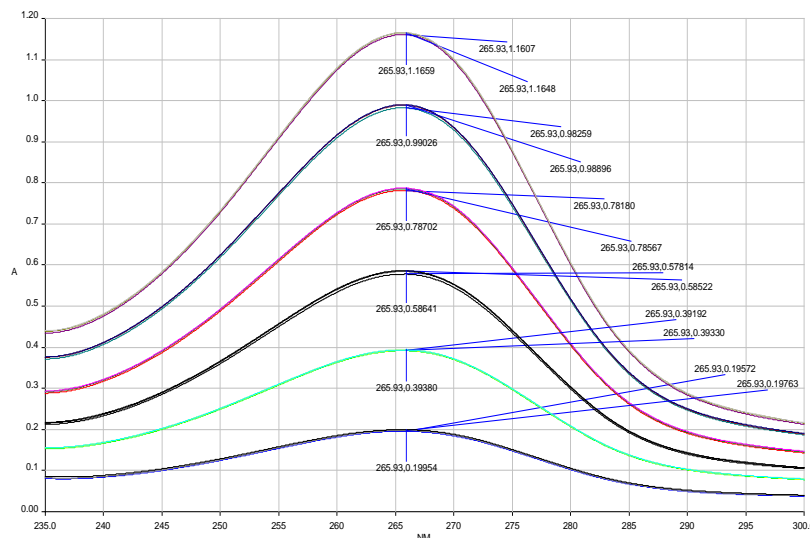


Figura 4.4: Espectros de disoluciones del estándar de isoniazida a concentraciones de 5, 10, 15, 20, 25 y 30ppm preparados con la disolución de HCl 0.1 N, es decir a pH ácido.

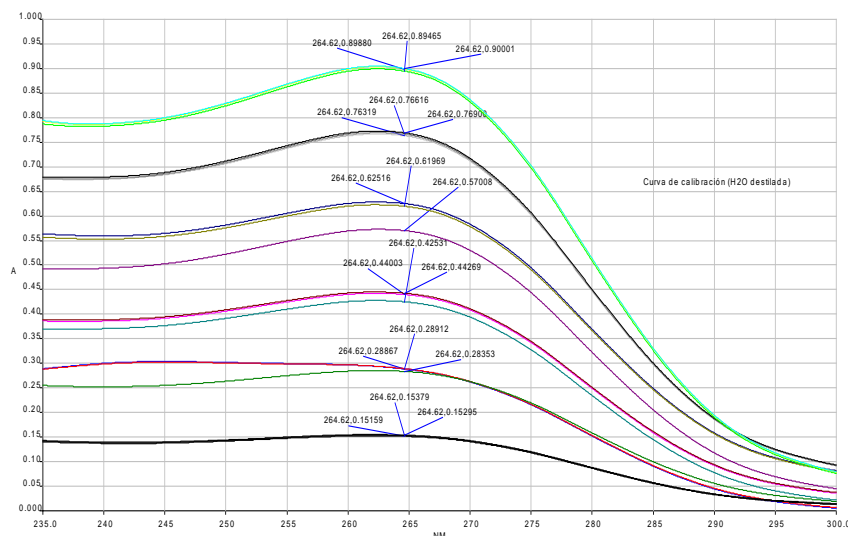


Figura 4.5: Espectros de disoluciones del estándar de isoniazida a concentraciones de 5, 10, 15, 20, 25 y 30ppm preparados con la disolución de agua destilada, es decir a pH neutro.

Como se puede observar, bajo las mismas condiciones instrumentales (descritas en el capítulo de desarrollo experimental), el hecho de trabajar las disoluciones tanto con agua destilada (pH neutro) como con la disolución de HCl 0.1N (pH ácido) se obtienen los siguientes resultados al estudiar los espectros:

- Al ser observados los espectros a simple vista se puede comprobar que el espectro obtenido en medio ácido (HCl 0.1N) muestra una banda bien definida que cuando se trabaja a pH neutro (agua destilada).
- Con las disoluciones preparadas en el medio ácido se obtiene una longitud de onda de máxima absorción a los 266nm en cada uno de sus espectros y en el caso del medio neutro es de 265nm. Como puede observarse la diferencia que se presenta es sólo de 1nm en cuanto al valor de la longitud de onda de máxima absorción, lo que indica que no hay una variación (batocrómica o hipsocrómica) importante en el grupo auxocrómico al variar el pH de la disolución.
- Para el caso de la variación sobre la absorbancia a una misma concentración (lo cual se comprueba posteriormente con las pendientes obtenidas en cada curva patrón) se tiene que al pasar del pH neutro al pH ácido se obtiene un efecto hipercrómico. Lo que indica una mayor sensibilidad al trabajar en medio ácido.

El profesor deberá hacer mención a sus alumnos los razonamientos mencionados anteriormente.

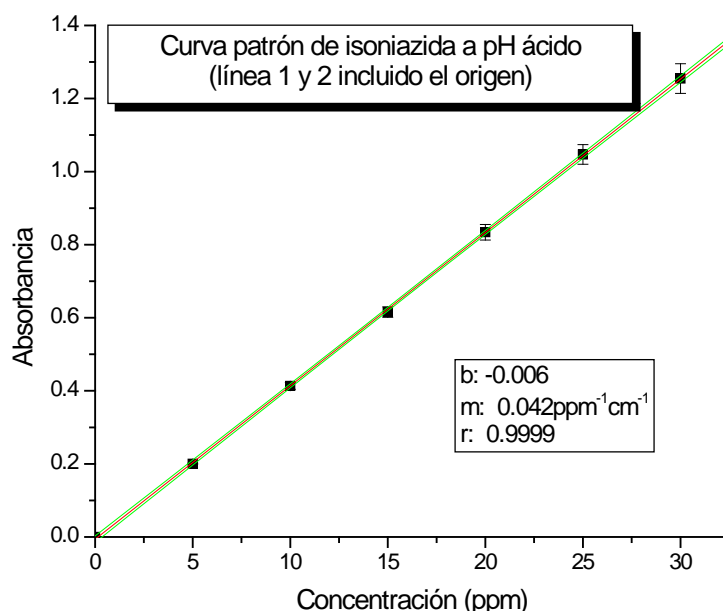
A continuación se presenta el estudio de linealidad del sistema con las disoluciones a los 2 pH's mencionados.

Linealidad del sistema con isoniazida en disolución a pH ácido (HCl 0.1N)

Al graficar los datos (Absorbancia vs Concentración) de la tabla 4.2 (que se obtuvieron de los espectros vistos en la fig. 4.4), se puede observar que el sistema presenta una tendencia lineal además de que parece que tiende al origen.

Disoluciones estándar de isoniazida. (ppm)	Absorbancia					
	Primera línea			Segunda línea		
	1ra. Réplica	2da. réplica	3ra. réplica	1ra. réplica	2da. réplica	3ra. réplica
0	0	0	0	0	0	0
5	0.196	0.198	0.200	0.203	0.204	0.203
10	0.391	0.393	0.394	0.433	0.436	0.434
15	0.578	0.585	0.586	0.648	0.648	0.647
20	0.786	0.786	0.787	0.883	0.882	0.880
25	0.983	0.989	0.990	1.108	1.107	1.105
30	1.161	1.165	1.166	1.340	1.353	1.343

Tabla 4.2: Datos obtenidos de la fig. 4.4 para realizar la curva de calibración de isoniazida a pH ácido.



Gráfica 4.1: Curva patrón de isoniazida a pH ácido en el intervalo de 5 a 30ppm.

Por lo tanto en principio se aplicaría la ecuación de Lambert-Beer ($A=a\ell C$), pero para confirmar el razonamiento de que pasa por el origen se realizó la prueba de hipótesis sobre la ordenada. Por lo tanto se planteó la prueba de hipótesis sobre la ordenada.

Se establecen las pruebas de hipótesis:

$$H_0: b = \beta, \text{ donde } \beta = 0 \quad (\text{Hipótesis nula})$$

$$H_1: b \neq \beta \quad (\text{Hipótesis alterna})$$

Se aplica la prueba estadística “t de student”, y se obtiene la t_{cal}

$$t_{cal} = \left(\frac{(b) - \beta}{Se} \right) \sqrt{\frac{n(Sxx)}{Sxx + (nX)^2}}$$

$$t_{cal} = \left(\frac{(-0.006) - 0}{0.05183} \right) \sqrt{\frac{37(108,150)}{108,150 + (37 * 17.0270)^2}} = -0.3258$$

Considerando un nivel de significancia del 95%, y siendo una prueba de dos colas para n-2 grados de libertad la t_{tablas} obtenida es de:

$$t_{tablas} = -2.3420$$

Considerando que para rechazar la hipótesis nula:

$$-t_{cal} < -t_{tablas} \text{ o } t_{cal} > t_{tablas}$$

Como la $-t_{calc}$ es mayor que la $-t_{cal}$ no se rechaza la hipótesis nula lo que indica que la curva patrón si tiende al origen (0,0) y por lo tanto se puede seguir la ecuación de Lambert-Beer ($A=alC$) para realizar el análisis cuantitativo.

Se procede a calcular los intervalos de confianza para la ordenada y la pendiente.

Intervalo de confianza para la ordenada (IC_b).

$$IC_b = b \pm (t_{\alpha/2} * Se) \sqrt{\frac{Sxx + (n * X)^2}{(n)(Sxx)}}$$

$$IC_b = -0.006 \pm (2.3420 * 0.05183) \sqrt{\frac{108,150 + (37 * 17.0270)^2}{(37)(108,150)}}$$

$$IC_b = -0.006 \pm 0.043$$

$$\mathbf{-0.049 < -0.006 < 0.037}$$

Intervalo de confianza para la pendiente (IC_m).

$$IC_m = m \pm (t_{\alpha/2} * Se) \sqrt{\frac{n}{Sxx}}$$

$$IC_m = 0.042 \pm (2.3420 * 0.05183) \sqrt{\frac{37}{108,150}}$$

$$IC_m = 0.042 \pm 0.002$$

$$\mathbf{0.040 < 0.042 < 0.044}$$

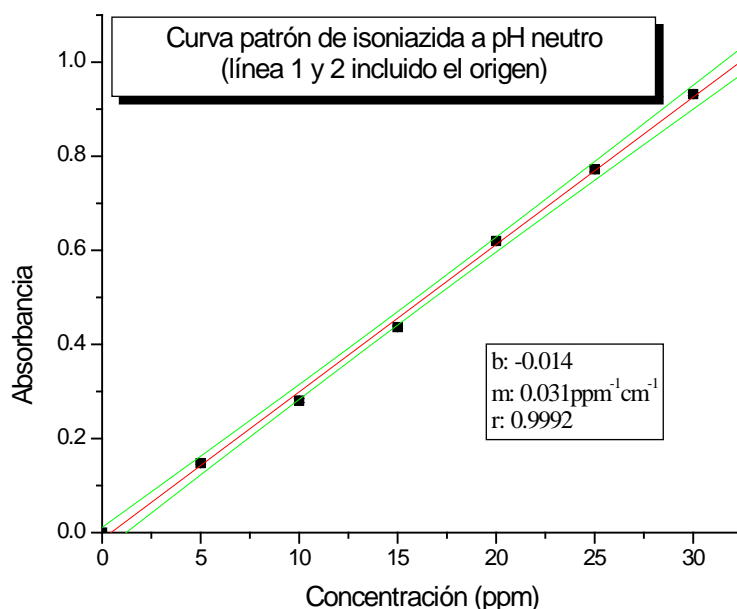
Toda esta parte la realizará el profesor con los alumnos para que entiendan el procedimiento y el proceso de trabajo de la linealidad del sistema trabajado con las disoluciones estándar de isoniazida a pH neutro les quedará de tarea a los alumnos para comprobar que entendieron el procedimiento siendo revisado posteriormente por el profesor.

Linealidad del sistema con isoniazida en disolución a pH neutro (Agua destilada)

Al graficar los datos (Absorbancia vs Concentración) de la tabla 4.3 (que se obtuvieron de los espectros vistos en la fig. 4.5), se puede observar que el sistema presenta una tendencia lineal además de que parece que tiende al origen.

Disoluciones estándar de isoniazida (ppm).	Absorbancia					
	Primera línea			Segunda línea		
	1ra. réplica	2da. réplica	3ra. réplica	1ra. Réplica	2da. réplica	3ra. réplica
0	0	0	0	0	0	0
5	0.152	0.153	0.154	0.141	0.145	0.142
10	0.284	0.289	0.289	0.285	0.266	0.271
15	0.443	0.425	0.440	0.436	0.441	0.435
20	0.620	0.625	0.622	0.617	0.617	0.618
25	0.786	0.784	0.783	0.759	0.762	0.760
30	0.931	0.933	0.948	0.929	0.928	0.924

Tabla 4.3: Datos obtenidos de la fig. 4.5 para realizar la curva de calibración de isoniazida a pH neutro (agua destilada).



Gráfica 4.2: Curva patrón de isoniazida a pH neutro en el intervalo de 5 a 30ppm.

Por lo tanto en principio se aplicaría la ecuación de Lambert-Beer ($A=aIc$), pero para confirmar esto se realizó la prueba de hipótesis sobre la ordenada al origen para comprobar que pasaba por el origen. Por lo tanto se planteó la prueba de hipótesis sobre la ordenada.

Se establecen las pruebas de hipótesis:

$$H_0: b = \beta, \text{ donde } \beta = 0 \quad (\text{Hipótesis nula})$$

$$H_1: b \neq \beta \quad (\text{Hipótesis alterna})$$

Se aplica la prueba estadística “t de student”, y se obtiene la t_{cal}

$$t_{cal} = \left(\frac{(b) - \beta}{Se} \right) \sqrt{\frac{n(S_{xx})}{S_{xx} + (nX)^2}}$$

$$t_{cal} = \left(\frac{(-0.014) - 0}{0.01389} \right) \sqrt{\frac{37(108,150)}{108,150 + (37 * 17.02700)^2}} = -2.8369$$

Considerando un nivel de significancia del 95%, y siendo una prueba de dos colas para n-2 grados de libertad la t_{tablas} obtenida es de:

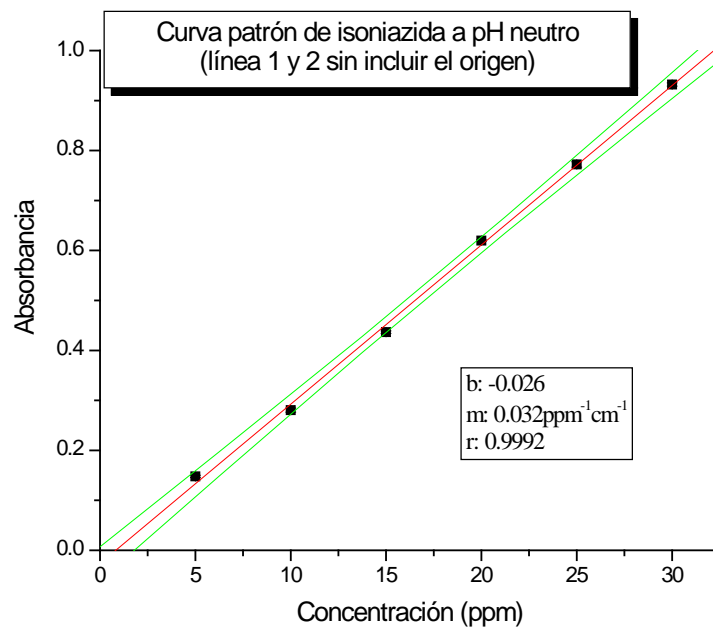
$$t_{tablas} = -2.3420$$

Considerando que para rechazar la hipótesis nula:

$$-t_{cal} < -t_{tablas} \text{ o } t_{cal} > t_{tablas}$$

Como la $-t_{cal}$ es menor que la $-t_{tablas}$ se rechaza la hipótesis nula lo que indica que la curva patrón tiende al origen (0,0) y por lo tanto se utilizará la ecuación de la línea recta ($y=mx+b$) para realizar el análisis cuantitativo.

Con lo obtenido anteriormente se vuelve a realizar la gráfica y regresión lineal sin poner la ordenada al origen (0,0).



Gráfica 4.3: Curva patrón de isoniazida a pH neutro en el intervalo de 5 a 30ppm sin incluir la ordenada al origen (0,0).

Se procede a calcular los intervalos de confianza para la ordenada y la pendiente.

Intervalo de confianza para la ordenada (IC_b).

$$IC_b = b \pm (t_{\alpha/2} * Se) \sqrt{\frac{Sxx + (n * X)^2}{(n)(Sxx)}}$$

$$IC_b = -0.026 \pm (2.3450 * 0.01159) \sqrt{\frac{62,100 + (36 * 17.50)^2}{(36)(62,100)}}$$

$$IC_b = -0.026 \pm 0.012$$

$$\mathbf{-0.038 < -0.026 < -0.014}$$

Intervalo de confianza para la pendiente (IC_m).

$$IC_m = m \pm (t_{\alpha/2} * Se) \sqrt{\frac{n}{Sxx}}$$
$$IC_m = 0.032 \pm (2.3450 * .01159) \sqrt{\frac{36}{62,100}}$$
$$IC_m = 0.0320 \pm 0.0007$$

$$0.0313 < 0.0320 < 0.0327$$

Una vez que el profesor haya revisado el procedimiento realizado por los alumnos, podrá volver a discutir todo el procedimiento con los alumnos de las pruebas de hipótesis y las conclusiones que se obtuvieron para resolver dudas y confirmar que los alumnos asimilaron el conocimiento y así podrá además hacer hincapié en el que las pendientes obtenidas para cada una de las condiciones de pH, vuelven a indicar que el trabajar con el pH ácido permitiría una mayor sensibilidad que con pH neutro.

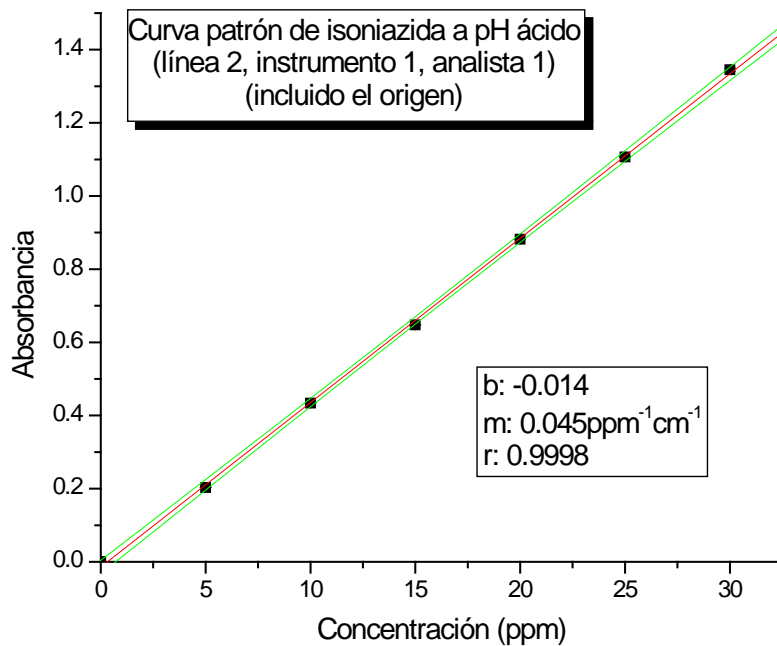
REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD DE LA LINEALIDAD DEL SISTEMA

Esta parte no será realizada por los alumnos ya que no forma parte de la práctica planteada, pero se realiza para poder comprobar que se puede utilizar cualquiera de los instrumentos presentes en el laboratorio para cubrir los objetivos planteados.

A continuación se presentan los datos y gráficos de los resultados obtenidos al correr las disoluciones estándar de la isoniazida de la línea 2 a pH ácido, realizados en los dos instrumentos de UV-Vis lambda que se tienen en el laboratorio y una analista diferente.

Disoluciones estándar de isoniazida (ppm).	Absorbancia					
	1ra. réplica	2da. réplica	3ra. réplica	s	x	CV
0	0	0	0			
5	0.203	0.204	0.203	4.8×10^{-4}	0.203	0.24%
10	0.433	0.436	0.434	1.3×10^{-3}	0.434	0.31%
15	0.648	0.648	0.647	6.6×10^{-4}	0.648	0.10%
20	0.883	0.882	0.880	1.8×10^{-3}	0.882	0.20%
25	1.108	1.107	1.105	1.59×10^{-3}	1.107	0.14%
30	1.340	1.353	1.343	7.1×10^{-3}	1.345	0.53%

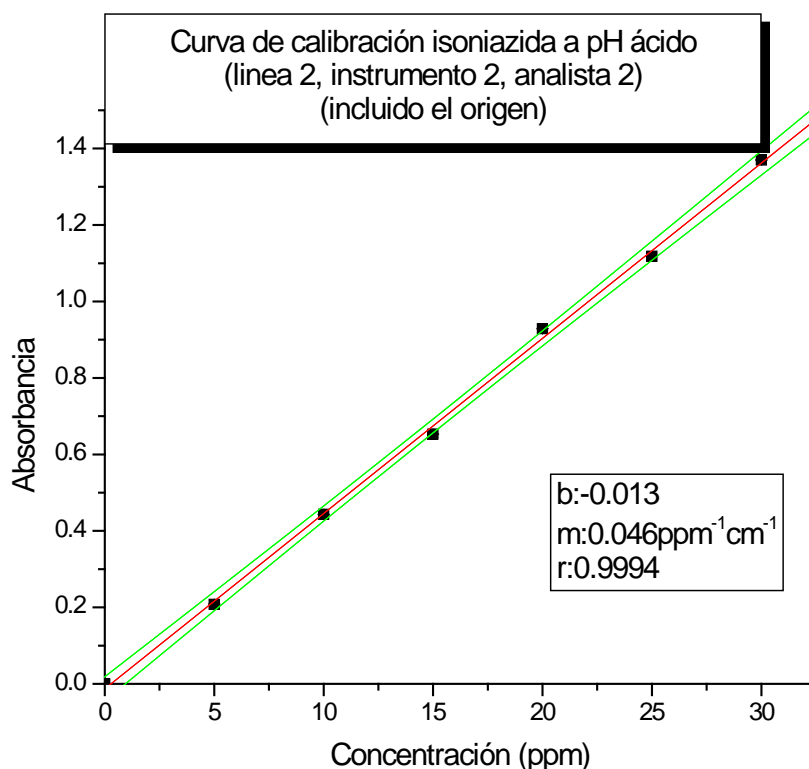
Tabla 4.4: Datos para realizar la curva de calibración de isoniazida a pH ácido (HCl 0.1N) en el instrumento 1 con la misma analista.



Gráfica 4.4: Curva patrón de isoniazida a pH ácido en el intervalo de 5 a 30ppm en el instrumento 1 con la misma analista.

Disoluciones estándar de isoniazida (ppm).	Absorbancia					
	1ra. réplica	2da. réplica	3ra. réplica	s	x	CV
0	0	0	0			
5	0.210	0.208	0.206	2.3×10^{-3}	0.208	1.13%
10	0.444	0.444	0.442	1.2×10^{-3}	0.443	0.29%
15	0.654	0.654	0.652	7.7×10^{-4}	0.653	0.12%
20	0.929	0.928	0.930	8.7×10^{-4}	0.929	0.09%
25	1.119	1.118	1.117	1.1×10^{-3}	1.118	0.10%
30	1.372	1.367	1.371	2.5×10^{-3}	1.370	0.18%

Tabla 4.5: Datos para realizar la curva de calibración de isoniazida a pH ácido (HCl 0.1N) en el instrumento 2 con analista diferente.



Gráfica 4.5: Curva patrón de isoniazida a pH ácido en el intervalo de 5 a 30ppm en el instrumento 2 con analista diferente.

Como puede observarse al analizar ambas curvas de calibración de la isoniazida a pH ácido obtenidas en los 2 instrumentos que se tienen en el laboratorio, se puede decir que presentan linealidad y tienden al origen en los 2 casos, y sus datos de regresión lineal son muy semejantes, por lo que se considera que en ambos equipos o sistemas se tiene una respuesta repetible y reproducible en términos generales no importando el analista que lo trabaje y/o instrumento que se utilice.

No se realizan pruebas estadísticas para checar esto ya que ese no es uno de los objetivos de la práctica ni de los objetivos que se plantean en este trabajo sino que cada equipo de trabajo obtendrá sus resultados en cada espectrofotómetro y hará sus estudios de linealidad del sistema. Pero era necesario visualizar esto.

PRECISIÓN DEL SISTEMA

A continuación se presentan los espectros obtenidos para realizar los cálculos matemático-estadísticos para el estudio de la precisión del sistema, y los datos obtenidos de los espectros de las disoluciones estándar de isoniazida a 15ppm a pH ácido.

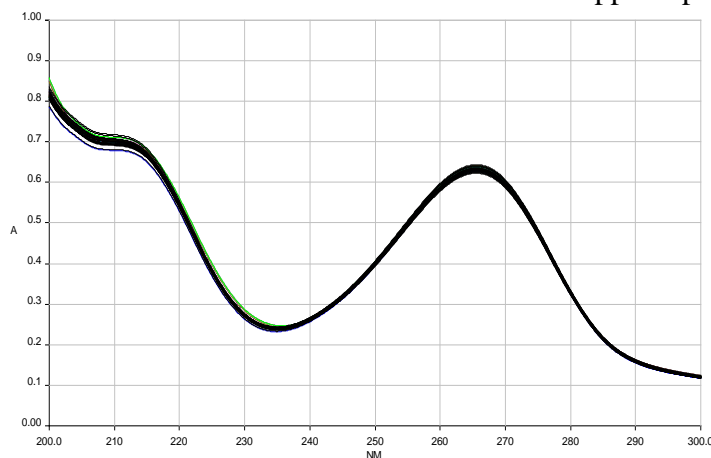


Figura 4.6: Espectros de las disoluciones estándar de isoniazida a una concentración de 15ppm a pH ácido.

Disoluciones estándar de isoniazida a 15ppm a pH ácido						
Absorbancia						
1ra. corrida	2da. corrida	3ra. corrida	4ta. corrida	5ta. corrida	6ta. corrida	7ma. corrida
0.62765	0.63536	0.62429	0.62567	0.62649	0.64085	0.63127
0.63393	0.623	0.63771	0.63499	0.62872	0.6436	0.63946
0.63531	0.63641	0.63893	0.63947	0.64129	0.63113	0.63404
0.63647	0.63714	0.64047	0.64022	0.62928	0.63243	0.63405
0.63055	0.63717	0.63954	0.62608	0.63045	0.63828	0.63459

n	X	s	CV
35	0.634	0.0054	0.85%

Tabla 4.6: Datos de absorbancia y estadísticos de las disoluciones estándar de isoniazida a pH ácido.

A continuación se presentan los espectros obtenidos para realizar los cálculos matemático-estadísticos para el estudio de la precisión del sistema, y los datos obtenidos de los espectros de las disoluciones estándar de isoniazida a 15ppm a pH neutro.

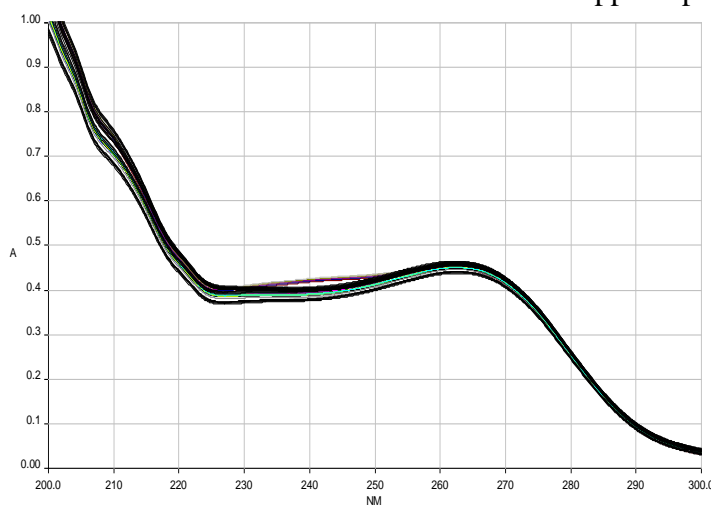


Figura 4.7: Espectros de las disoluciones estándar de isoniazida a una concentración de 15ppm a pH neutro.

Disoluciones estándar de isoniazida a 15ppm a pH neutro						
Absorbancia						
1° corrida	2° corrida	3° corrida	4° corrida	5° corrida	6° corrida	7° corrida
0.43968	0.46229	0.44849	0.44844	0.44763	0.45425	0.46025
0.43849	0.43806	0.45784	0.44664	0.44623	0.45343	0.46131
0.43857	0.43562	0.44896	0.44395	0.44416	0.45647	0.45673
0.45408	0.45161	0.45702	0.44999	0.45409	0.45606	0.4596
0.45322	0.45334	0.45598	0.44928	0.45629	0.4589	0.45456

n	X	s	CV
35	0.453	0.0072	1.58%

Tabla 4.7: Datos de absorbancia y estadísticos de las disoluciones estándar de isoniazida a pH neutro.

El coeficiente de variación que se obtuvo con los dos tipos de disoluciones pH ácido (0.85%) y pH neutro (1.58%) indican que existe una buena precisión del sistema, en la industria farmacéutica se pide para la técnica UV-Vis un valor menor del 3% del coeficiente de variación.

El profesor deberá explicar a los alumnos que la prueba de hipótesis sobre las varianzas para comprobar que se cumplen los valores de precisión del sistema estipulados para esta técnica por alguna autoridad tiene una razón de realizarse cuando los CV están muy cercanas a los límites que establezca dicha autoridad correspondiente, que normalmente en el caso del desarrollo de una metodología inicialmente sería del 5% y como ya se mencionó para la industria farmacéutica es del 3%. Como los resultados obtenidos (y que los alumnos deben obtener en su práctica si trabajan correctamente) de CV son tan bajos el profesor les explicará que no tiene sentido que la realicen por lo que el profesor les explicaría a los alumnos esto, pero indicándoles que el mecanismo de trabajo para realizar esta prueba será vista en la parte de trabajo con la técnica de HPLC en dónde por el proceso de introducción de muestra la precisión si será menor, es decir con CV mayores.

El profesor les deberá indicar a los alumnos que en el caso de la Espectroscopia UV-Vis los valores de CV son bajos y por lo tanto la precisión del sistema es alto debido a que la introducción de la muestra si se hace cumpliendo los requisitos mínimos de que la disolución que se trabaja sea homogénea sin partículas flotantes, que las celdas utilizadas no se encuentren rayadas, ni sucias o manchadas, además de que el instrumento se encuentra correctamente calibrado, y por último que el analista prepare correctamente las disoluciones no se debe tener ningún problema de cumplir precisiones de sistema altos y por lo tanto CV muy bajos.

CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA EFICIENCIA (HPLC)

Todos los resultados obtenidos en la validación de la Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia para la linealidad del sistema y la precisión del sistema se encuentran en el anexo 1.

En esta parte el profesor puede utilizar este trabajo experimental para enseñar también el manejo del instrumento y la parte de enseñanza práctica de la información obtenida por esta técnica.

Hay que indicar que esta parte en el desarrollo de la práctica, puede ser aplicada de 2 maneras por parte del profesor:

1) El profesor puede hacer que los alumnos realicen las inyecciones de los estándares indicados en la parte experimental (esto condiciona ya sea que los alumnos preparen los estándares o que el profesor ya se los lleve) y trabajen con los datos que ellos obtienen. El único problema de esto es que el tiempo sería demasiado para cumplir adecuadamente el trabajo.

2) El profesor hará que los alumnos inyecten por triplicado cada estándar (llevándoles ya las disoluciones preparadas) pero esto, sólo para que los alumnos realicen experimentalmente la acción de inyectar y vean la problemática que se presenta en CG al inyectar de manera manual. Para procesar, a los alumnos se les entregarán los datos obtenidos en este trabajo para que mientras uno de los alumnos inyecta un estándar (se estarán turnando los alumnos) los demás estén con el profesor aprendiendo a analizar y procesar la información que se les entrega, de la manera que se menciona más adelante en este capítulo. Con esto también se utiliza mejor el tiempo de la sesión práctica.

Obviamente la segunda opción es la que se considera en este trabajo como viable para el mejor aprendizaje de los alumnos y en un mejor rendimiento del tiempo que se tiene para dar las clases.

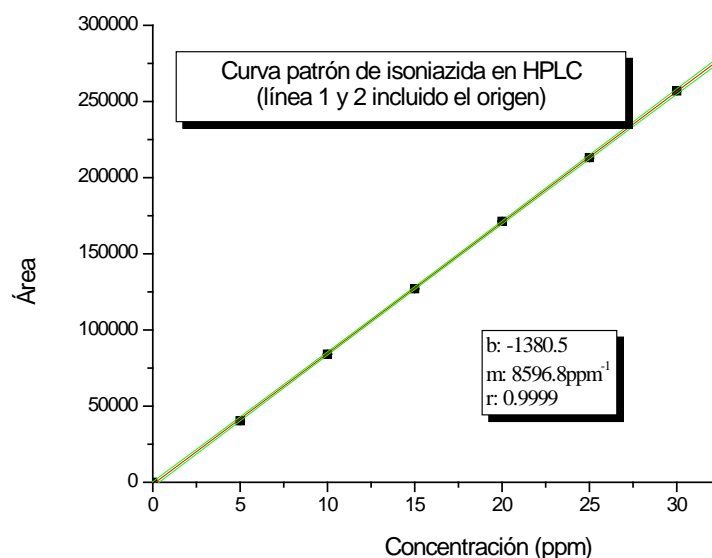
LINEALIDAD DEL SISTEMA

Al graficar los datos (Área vs Concentración) de las tablas 4.8 y 4.9 se puede observar que el sistema presenta una tendencia lineal además de que parece que tiende al origen.

Disoluciones estándar de isoniazida. (ppm)	Área				
	Primera línea				
	1ra. réplica	2da. réplica	3ra. Réplica	4ta. réplica	5ta. réplica
0	0	0	0	0	0
5	39,870	40,071	40,099	40,452	40,487
10	84,073	84,320	83,587	84,453	84,190
15	126,554	127,489	127,025	126,164	127,350
20	171,335	169,952	170,755	171,613	171,657
25	214,045	210,658	214,211	214,909	214,105
30	258,284	255,247	257,647	256,678	257,450

Disoluciones estándar de isoniazida. (ppm)	Área				
	Segunda línea				
	1ra. réplica	2da. réplica	3ra. réplica	4ta. réplica	5ta. réplica
0	0	0	0	0	0
5	40,950	40,907	40,772	40,881	39,512
10	84,120	83,777	83,947	84,033	84,559
15	128,785	124,660	126,810	127,883	127,780
20	171,368	171,817	172,220	172,682	170,325
25	212,785	214,174	210,101	213,639	212,601
30	257,772	258,818	253,592	257,518	256,440

Tablas 4.8 y 4.9: Áreas obtenidas de la curva de calibración de isoniazida.



Gráfica 4.6: Curva patrón de isoniazida en el intervalo de 5 a 30 ppm.

Por lo tanto en principio se aplicaría la ecuación del método de estándar externo ($A=FrC$), pero para confirmar el razonamiento de que pasa por el origen se realizó la prueba de hipótesis sobre la ordenada. Por lo tanto se planteó la prueba de hipótesis sobre la ordenada.

Se establece la prueba de hipótesis:

$$H_0: b = \beta, \text{ donde } \beta = 0 \quad (\text{Hipótesis nula})$$

$$H_1: b \neq \beta \quad (\text{Hipótesis alterna})$$

Se aplica la prueba estadística “t de student”, y se obtiene la t_{cal}

$$t_{cal} = \left(\frac{(b) - \beta}{Se} \right) \sqrt{\frac{n(S_{xx})}{S_{xx} + n(X)^2}}$$

$$t_{cal} = \left(\frac{(-1380.5) - 0}{1197.0978} \right) \sqrt{\frac{61(285,250)}{285,250 + (61 * 17.2131)^2}} = -4.010$$

Considerando un nivel de significancia del 95%, y siendo una prueba de dos colas para n-2 grados de libertad la t_{tablas} obtenida es de:

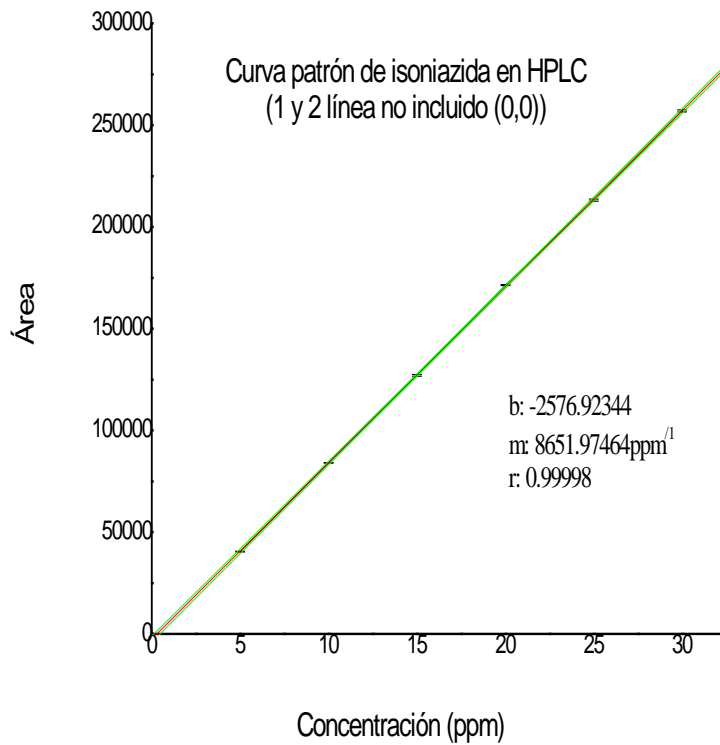
$$t_{tablas} = -2.30$$

Considerando que para rechazar la hipótesis nula:

$$-t_{cal} < -t_{tablas} \quad \text{o} \quad t_{cal} > t_{tablas}$$

Como la $-t_{cal}$ es menor que la $-t_{tablas}$ se rechaza la hipótesis nula lo que indica que la curva patrón tiende al origen (0,0) y por lo tanto se utilizará la ecuación de la línea recta ($y=mx+b$) para realizar el análisis cuantitativo.

Con lo obtenido anteriormente se vuelve a realizar la gráfica y regresión lineal sin poner la ordenada al origen (0,0).



Gráfica 4.7: Curva patrón de isoniazida en el intervalo de 5 a 30ppm sin incluir la ordenada al origen (0,0).

Se procede a calcular los intervalos de confianza para la ordenada y la pendiente.
Intervalo de confianza para la ordenada (IC_b).

$$IC_b = b \pm (t_{\alpha/2} * Se) \sqrt{\frac{Sxx + (n * X)^2}{(n)(Sxx)}}$$

$$IC_b = -2576.9234 \pm (2.3011 * 1162.9230) \sqrt{\frac{262,500 + (60 * 17.50)^2}{(60)(262,500)}}$$

$$IC_b = -2576.9234 \pm 784.7572$$

$$\mathbf{-3361.6804 < -2576.9234 < -1792.1662}$$

Intervalo de confianza para la pendiente (IC_m).

$$IC_m = m \pm (t_{\alpha/2} * Se) \sqrt{\frac{n}{S_{xx}}}$$

$$IC_m = 8651.9746 \pm (2.3011 * 1162.9230) \sqrt{\frac{60}{262,500}}$$

$$IC_m = 8651.9746 \pm 4045.7190$$

$$4606.2556 < 8651.9746 < 12697.6936$$

Como en el caso de la Espectroscopia UV-Vis el profesor discutirá de nuevo el procedimiento con los alumnos de las pruebas de hipótesis y las conclusiones que se obtuvieron.

PRECISIÓN DEL SISTEMA

Área (A)						
1ra. corrida	2da. corrida	3ra. corrida	4ta. corrida	5ta. corrida	6ta. corrida	7ma. corrida
127,282	123,289	127,780	114,028	127,350	117,487	127,777
113,007	127,883	113,486	122,296	127,342	127,313	118,320
113,189	113,324	127,327	114,301	115,243	127,606	127,710
126,554	127,009	126,694	124,660	115,790	117,671	127,025
127,489	128,785	113,617	126,810	126,221	126,345	126,164

n	X̄	s	CV
35	122,691	5,896	4.8%

Tabla 4.10: Datos de área y estadísticos de las disoluciones estándar de isoniazida a pH neutro.

El coeficiente de variación que se obtuvo de 4.8% indica que existe una buena precisión por parte del equipo utilizado, y en principio parece cumplir en no rebasar el máximo planteado que es del 5%. Pero por estar muy cercano al valor límite establecido se requiere realizar la prueba de hipótesis que nos compruebe que si se cumple la condición establecida para la precisión del sistema.

Lo anterior será discutido por parte del profesor con sus alumnos.

Se establece la prueba de hipótesis sobre las varianzas:

$$H_0: s^2_{\text{exp}} = \sigma_0^2 \quad (\text{Hipótesis nula})$$

$$H_1: s^2_{\text{exp}} > \sigma_0^2 \quad (\text{Hipótesis alterna})$$

Se aplica la prueba de hipótesis unilateral sobre las varianzas utilizando como estadístico de prueba la χ^2 , bajo las condiciones de grados de libertad n-1 y a un nivel de significancia del 95%. Y con este valor se realiza el cálculo matemático para obtener la χ^2_{cal} con los datos obtenidos con la siguiente ecuación:

$$\sigma^2 = ((CV * X) / 100)^2$$

$$\chi^2_{\text{cal}} = \frac{(n-1)s^2}{\sigma^2}$$

$$\chi_{cal}^2 = \frac{(35-1)(34761958)}{34761958.28} = 34$$

Considerando un nivel de significancia del 95%, y siendo una prueba de una sola cola para n-1 grados de libertad la χ_{tablas}^2 obtenida es de:

$$\chi_{tablas}^2_{0.05,34} = 48.6023$$

Considerando que para rechazar la hipótesis nula:

$$\chi_{cal}^2 > \chi_{tablas}^2$$

Como la χ_{cal}^2 fue menor que la χ_{tablas}^2 no se rechaza la hipótesis nula por lo que la precisión del sistema HPLC es menor al 5%, por lo que el sistema presenta una precisión de por lo menos el 95%.

Se calculó el intervalo de confianza para s^2 tomando en cuenta el CV del 5% establecido.

$$\sqrt{\frac{(n-1)s^2}{\chi^2_{\alpha/2}}} < s < \sqrt{\frac{(n-1)s^2}{\chi^2_{(1-\alpha/2)}}}$$

$$\sqrt{\frac{(35-1)34761958}{51.9659}} < 5896 < \sqrt{\frac{(35-1)34761958}{19.8062}}$$

$$\mathbf{4,769.1 < 5,896 < 7,724.9}$$

El profesor discutirá todo el procedimiento con los alumnos de la prueba de hipótesis y las conclusiones que se obtuvieron.

CAPÍTULO V

Conclusiones

En cuanto al trabajo analítico realizado en la validación del sistema cromatográfico se obtuvieron las siguientes conclusiones, cumpliendo con los 2 primeros objetivos planteados en este trabajo. Por ser 3 partes y técnicas las trabajadas en este trabajo y práctica planteada, las conclusiones se darán para cada una de esas partes:

Espectroscopia IR

- Se aplicaron 2 técnicas clásicas de preparación (pastilla y suspensión), obteniendo los espectros adecuados del reactivo de isoniazida y de una tableta que contiene a este fármaco.
- Al trabajar estos espectros se obtuvieron las bandas características de los enlaces de los grupos funcionales que presenta la estructura del compuesto de isoniazida.
- Se pudo plantear una tabla que contiene las bandas características de este compuesto y que son comparables entre los diferentes espectros obtenidos y los indicados en la literatura.

Espectroscopia UV-Vis

- El espectro obtenido en medio ácido (HCl 0.1N) muestra una banda bien definida que cuando se trabaja a pH neutro (agua destilada) a la isoniazida.
- Con las disoluciones preparadas en el medio ácido se obtiene una longitud de onda de máxima absorción a los 266nm en cada uno de sus espectros y en el caso del medio neutro es de 265nm. Lo que indica que no hay una variación (batocrómica o hipsocrómica) importante en el grupo cromóforo al variar el pH de la disolución.
- El sistema presenta una buena linealidad tanto para pH ácido como para pH neutro, para el intervalo de concentraciones trabajado (5-30ppm), y presentan un coeficiente de correlación para ambas condiciones mayor a 0.98, lo que indica que la variable dependiente (señal) es directamente proporcional a la variable independiente (concentración) para los 2 casos.
- Se observa en las curvas de calibración que se presenta una mejor linealidad (se presenta una menor variación en los datos de la línea recta) al trabajar con las disoluciones a pH ácido que a pH neutro
- Al realizar las pruebas de hipótesis a la ordenada al origen para las curvas de calibración, a pH ácido se obtiene que la ordenada al origen tiende a cero, y por lo tanto la ecuación para el análisis cuantitativo será la ecuación de Lambert y Beer ($A=alC$). Y para pH neutro se obtiene que la ordenada al origen no tiende a cero, y por lo tanto la ecuación para el análisis cuantitativo será la ecuación formal de una línea recta ($y=mx+b$).
- Se obtiene una pendiente mayor cuando se trabaja a pH ácido que a pH neutro por lo que se tiene una mayor sensibilidad en la técnica al trabajar a pH ácido.
- Se realizó el cálculo del intervalo de confianza a la ordenada y la pendiente de las curvas de la isoniazida, lo que permitirá llevar un adecuado control de calidad en los sistemas lineales que se obtengan periódicamente.
- El sistema demostró ser preciso con un error máximo del 5% (o una precisión mínima de 95%) para las disoluciones a los 2 pH's trabajados, por lo que se cumple perfectamente con la precisión mínima recomendada al desarrollar metodologías con las técnicas instrumentales que es del 5%. Y en el caso de esta técnica aún la planteada por la industria farmacéutica que es del 3%. Hay que

indicar que se obtuvo una mejor precisión a pH ácido (0.85%) que a pH neutro (1.58 %).

- Se comprobó que en cualquiera de los 2 instrumentos que se pueden utilizar se obtendrían los mismos resultados.

Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia

- El sistema presenta una buena linealidad para pH neutro, para el intervalo de concentraciones trabajado (5-30ppm), y presentan un coeficiente de correlación mayor a 0.98, lo que indica que la variable dependiente (señal) es directamente proporcional a la variable independiente (concentración).
- Al realizar la prueba de hipótesis a la ordenada al origen para la curva de calibración, se obtiene que la ordenada al origen no tiende a cero, y por lo tanto la ecuación para el análisis cuantitativo será la ecuación de forma de una línea recta ($y=mx+b$).
- Se realizó el cálculo del intervalo de confianza a la ordenada y la pendiente de las curvas de la isoniazida, lo que permitirá llevar un adecuado control de calidad en el sistema lineal que se obtenga periódicamente.
- El sistema demostró ser preciso con un error máximo del 5% (o una precisión mínima de 95%), por lo que se cumple perfectamente con la precisión mínima recomendada al desarrollar metodologías con las técnicas instrumentales que es del 5%. Y en el caso de esta técnica todavía no se cumple aún la planteada por la industria farmacéutica que es del 2% (se obtuvo 4.8%).

En cuanto a la parte educativa se cumplieron los objetivos planteados:

- Se tienen los datos obtenidos durante este trabajo para la validación de los sistemas de Espectroscopia UV-Vis y Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia. Con lo que el profesor podrá dar la información a los alumnos tanto para trabajar en clase con la explicación y guía de él, como el proceso que entregarán posteriormente los alumnos para confirmar que entendieron el proceso enseñado.

Todos los resultados obtenidos en este trabajo y que se acaban de mencionar permiten indicar y concluir que:

- Los Espectrofotómetros UV-Vis y el Cromatógrafo de Líquidos que se utilizaron para este estudio y que se tienen en los laboratorios 3E y 3F permiten realizar el análisis de la isoniazida y su cuantificación, con una buena linealidad y precisión.
- Por lo tanto se puede realizar el análisis de la isoniazida en matrices reales con confiabilidad en los resultados obtenidos por los sistemas instrumentales mencionados.
- Se puede trabajar con la información obtenida por parte de los alumnos con la guía del profesor para que éstos entiendan tanto el proceso cualitativo y cuantitativo, y las conclusiones que se obtienen al explotar la información de las 3 técnicas trabajadas en este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

1. PROY-NOM-006-SSA2-2012. PROYECTO DE NORMA OFICIAL MEXICANA PARA LA PREVENCIÓN Y CONTROL DE LA TUBERCULOSIS. 13/09/2012. Diario Oficial de la Federación. http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5267964&fecha=13/09/2012 Consultado 20/11/2012.
2. PROY-NOM-017-SSA2-2012. PROYECTO DE NORMA OFICIAL MEXICANA PARA LA VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA, 08/08/2012. Diario Oficial de la Federación. http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5262832&fecha=08/08/2012 Consultado 20/11/2012.
3. Farahnoosh Doustdar, Azar Dokht Khosravi and Parissa Farnia1. Epidemiology. MICROBIAL DRUG RESISTANCE. Volume 15, Number 4, 2009, pp 251-256.
4. <http://cenavece.salud.gob.mx/descargas/pdf/resumen-ejecutivo-acciones-resultados-cenavece.gob.pdf> Consultado: 11/11/2012.
5. The Merck Index. Merck Research Laboratories. División de Merck Col. Inc. 12ª edición, USA, 1996.
6. Drug Bank, Versión 3.0, David Wishart DS et al. Universidad de Alberta, Canadá. <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00951> Consultado 20/11/2012.
7. Florey, K., Analytical Profiles of Drug Substances, Vol. 1, Editorial Academy of Pharmaceutical Science. Nueva York, 1975.
8. Rosentein, S. E. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas (PLM). Ediciones PLM. México, 1990.
9. Hoja técnica de seguridad del reactivo Isoniazida, Sigma Aldrich.
10. Skoog, D. et al., Química Analítica. Editorial McGraw Hill. 7ª edición, México, 2001.
11. Harrys, Análisis Químico Cuantitativo. Editorial Reverté. 2ª edición, México, 2001.
12. Willard, M. y Dean, S., Métodos Instrumentales de Análisis. Editorial Iberoamérica. México, 1998.
13. Alonso Rubio Loza. Planteamiento de criterios para la elección de una técnica analítica instrumental. Trabajo escrito vía cursos de educación continua. Licenciatura. UNAM, 2007.
14. Colección de Espectros de Infrarrojo para Ejercicios de Interpretación. Química Analítica Instrumental II. Ernestina Cervera Flores-Alina Romo Guadarrama, Editado por la Fac. de Química, UNAM, 2003.

15. Espectroscopia Ultravioleta y Visible, Fernando Castaño Almendral, Editorial Alhambra. España, 1981.
16. Harold McNair. Cromatografía de líquidos. Editado por la Secretaría de la Organización de los Estados Americanos. Washington, D.C., 1981.
17. Miller, J.N. y Miller, J.C. Estadística para Química Analítica. 2ª Edición. Editorial Addison Wesley Iberoamericana. E.U.A., 1993.
18. Irwin Miller John E. Freund. Probabilidad y estadística para ingenieros. Editorial Reverté Mexicana. 1ª Edición. 1981
19. Angélica del Carmen Hernández Hernández. Validación de Metodologías Instrumentales. Trabajo escrito vía cursos de educación continua. Licenciatura. UNAM, 2005.
20. Guía de validación. Editada por el Colegio de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A.C., 2002.
21. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Secretaria de Salud. 2ª edición. Editorial Continental. México, 2006.
22. European Pharmacopea. 3ª edición. Editada por la convención de la Farmacopea de Strasburgo. 1997.
23. Manual de Prácticas de Química Analítica II (1656). Enseñanza Experimental. Editada por la Facultad de Química. UNAM, 1998.
24. Silverstein, R.M., Spectrometric identification of organic compounds. 5ª Edición. Vol. 1 y 2. Editorial John Wiley & Sons, INC. Nueva York, 1976.
25. Lilia del Carmen López Serrano. Validación de una metodología para la cuantificación de cefadroxilo en tabletas utilizando la técnica de Espectroscopia UV-Vis. Tesis de Licenciatura. UNAM, 2007.
26. The Sigma Library of FT-IR Spectra 1ª Edición Vol 1. Roger J. Keller, 1986.

ANEXO I

Validación de Espectroscopia UV-Vis para Isoniazida.

Datos y resultados obtenidos en la parte de linealidad del sistema.

Tabla A-1: Datos y resultados para la prueba de hipótesis sobre la ordenada al origen de la linealidad usando disoluciones de isoniazida a pH ácido (HCl 0.1N).

Concentración (ppm)	Absorbancia	XX	YY	XY		
0	0	0	0	0	n	37
5	0.196	25	0.03831	0.97865	x	17.0270
5	0.198	25	0.03906	0.98820	Sxx	108,150
5	0.200	25	0.03982	0.99775	Syy	195.7211
5	0.203	25	0.04121	1.01500	Sxy	4,559.72
5	0.204	25	0.04145	1.01800	Se	0.05183
5	0.203	25	0.04106	1.01320	Datos de regresión lineal y=mx+b	
10	0.391	100	0.15303	3.91190	b:	-0.006
10	0.393	100	0.15469	3.93310	m:	0.042
10	0.394	100	0.15509	3.93820	r:	0.9999
10	0.433	100	0.18747	4.32980	t_{cal}	-0.32
10	0.436	100	0.18973	4.35580	α/2	0.025
10	0.434	100	0.18807	4.33670	g.l.	35
15	0.578	225	0.33429	8.67270	t_{tab}	-2.3420
15	0.585	225	0.34252	8.77875	IC "b"	
15	0.586	225	0.34391	8.79660	+	0.037
15	0.648	225	0.41979	9.71865	-	-0.049
15	0.648	225	0.42040	9.72570	IC "m"	
15	0.647	225	0.41870	9.70605	+	0.044
20	0.786	400	0.61734	15.71420	-	0.040
20	0.786	400	0.61734	15.71420	Conclusión	
20	0.787	400	0.61946	15.74120	Se acepta la hipótesis nula, la linealidad tiende al origen.	
20	0.883	400	0.78040	17.66800		
20	0.882	400	0.77861	17.64780		
20	0.880	400	0.77421	17.59780		
25	0.983	625	0.96554	24.56550		
25	0.989	625	0.97812	24.72500		
25	0.990	625	0.98071	24.75775		
25	1.108	625	1.22744	27.69750		
25	1.107	625	1.22611	27.68250		
25	1.105	625	1.22080	27.62250		
30	1.161	900	1.34722	34.82100		
30	1.165	900	1.35676	34.94400		
30	1.166	900	1.35932	34.97700		
30	1.340	900	1.79506	40.19400		
30	1.353	900	1.83142	40.59900		
30	1.343	900	1.80231	40.27500		
Total:	630	26.189	13650	23.8268	569.1587	

Tabla A-2: Datos y resultados para la prueba de hipótesis sobre la ordenada al origen de la linealidad usando disoluciones de isoniazida a pH neutro (agua destilada), incluyendo el punto (0,0).

Concentración (ppm)	Absorbancia	XX	YY	XY		
0	0	0	0	0	n	37
5	0.152	25	0.02298	0.75795	x	17.0270
5	0.153	25	0.02339	0.76475	Sxx	108,150
5	0.154	25	0.02365	0.76895	Syy	109.1354
5	0.141	25	0.01986	0.70460	Sxy	3,431.612
5	0.145	25	0.02110	0.72625	Se	0.01389
5	0.142	25	0.02025	0.71145	Datos de regresión lineal y=mx+b	
10	0.284	100	0.08039	2.83530	b:	-0.014
10	0.289	100	0.08360	2.89140	m:	0.031
10	0.289	100	0.08334	2.88680	r:	0.9992
10	0.285	100	0.08148	2.85440	t_{cal}	-2.8369
10	0.266	100	0.07053	2.65570	a/2	0.025
10	0.271	100	0.07333	2.70800	g.l.	35
15	0.443	225	0.19598	6.64050	t_{tab}	-2.3420
20	0.625	400	0.39084	12.50340	Conclusión	
20	0.622	400	0.38742	12.44860	Se rechaza la hipótesis nula, la linealidad tiende al origen.	
20	0.617	400	0.38004	12.32940		
20	0.617	400	0.38029	12.33360		
20	0.618	400	0.38241	12.36780		
25	0.786	625	0.61693	19.63625		
25	0.784	625	0.61466	19.60000		
25	0.783	625	0.61300	19.57350		
25	0.759	625	0.57573	18.96925		
25	0.762	625	0.58090	19.05425		
25	0.760	625	0.57737	18.99625		
30	0.931	900	0.86728	27.93840		
30	0.933	900	0.87019	27.98520		
30	0.948	900	0.89791	28.42740		
30	0.929	900	0.86325	27.87330		
30	0.928	900	0.86024	27.82470		
30	0.924	900	0.85439	27.72990		
Total:	630	19.134	13650	12.84464	418.5443	

Datos y resultados obtenidos para la prueba de repetibilidad y reproducibilidad de la linealidad del sistema.

Tabla A-4: Datos y resultados para la prueba de linealidad realizada por el analista 1 con el instrumento 1 de la curva patrón de la isoniazida de la línea 2 a pH ácido. (HCl 0.1N).

	Absorbancia					
	5 ppm	10ppm	15ppm	20ppm	25ppm	30ppm
	0.203	0.433	0.648	0.883	1.108	1.340
	0.204	0.436	0.648	0.882	1.107	1.353
0.203	0.434	0.647	0.880	1.105	1.343	
Σxi	0.6092	1.3022	1.9434	2.6457	3.3201	4.0356
ΣXi^2	0.1237	0.5653	1.2589	2.3332	3.6744	5.4288
s^2	2.4×10^{-7}	1.8×10^{-6}	4.4×10^{-7}	3.3×10^{-6}	2.5×10^{-6}	5.1×10^{-5}
s	4.8×10^{-4}	1.3×10^{-3}	6.6×10^{-4}	1.8×10^{-3}	1.59×10^{-3}	7.1×10^{-3}
\bar{x}	0.203	0.434	0.648	0.882	1.107	1.345
CV	0.24%	0.31%	0.10%	0.20%	0.14%	0.53%

Tabla A-5: Datos y resultados para la prueba de linealidad realizada por el analista 2 con el instrumento 2 de la curva patrón de la isoniazida de la línea 2 a pH ácido. (HCl 0.1N).

	Absorbancia					
	5 ppm	10ppm	15ppm	20ppm	25ppm	30ppm
	0.210	0.444	0.654	0.929	1.119	1.372
	0.208	0.444	0.654	0.928	1.118	1.367
0.205	0.442	0.652	0.930	1.117	1.371	
Σxi	0.6239	1.3292	1.9595	2.7867	3.3543	4.11
ΣXi^2	0.1297	0.5889	1.2799	2.5886	3.7504	5.6307
s^2	5.5×10^{-6}	1.6×10^{-6}	5.9×10^{-7}	7.5×10^{-7}	1.3×10^{-6}	6.4×10^{-6}
S	2.3×10^{-3}	1.2×10^{-3}	7.7×10^{-4}	8.7×10^{-4}	1.1×10^{-3}	2.5×10^{-3}
\bar{x}	0.208	0.443	0.653	0.928	1.118	1.370
CV	1.13%	0.29%	0.12%	0.09%	0.10%	0.18%

Datos y resultados obtenidos en la parte de precisión del sistema.

Tabla A-6: Datos y resultados para la prueba de precisión a pH ácido (HCl 0.1N).

Concentración (15ppm)								
Absorbancia							N	35
1° corrida	2° corrida	3° corrida	4° corrida	5° corrida	6° corrida	7° corrida	Σxi	22.196
0.628	0.635	0.624	0.626	0.627	0.641	0.631	X	0.634
0.634	0.623	0.638	0.635	0.629	0.644	0.639	Σxi^2	14.077
0.635	0.636	0.639	0.639	0.641	0.631	0.634	S²	2.92×10^{-5}
0.637	0.637	0.641	0.640	0.629	0.632	0.634	S	0.0054
0.631	0.637	0.639	0.626	0.631	0.638	0.635	CV	0.85%

Tabla A-7: Datos y resultados para la prueba de precisión a pH neutro (agua destilada).

Concentración (15ppm)								
Absorbancia							N	35
1° corrida	2° corrida	3° corrida	4° corrida	5° corrida	6° corrida	7° corrida	Σxi	15.792
0.440	0.462	0.449	0.448	0.448	0.454	0.460	X	0.451
0.439	0.438	0.458	0.447	0.446	0.453	0.461	Σxi^2	7.127
0.439	0.436	0.449	0.444	0.444	0.457	0.457	S²	5.15×10^{-5}
0.454	0.452	0.457	0.450	0.454	0.456	0.460	S	0.0072
0.453	0.453	0.456	0.449	0.456	0.459	0.455	CV	1.59%

Validación de HPLC para Isoniazida.

Datos y resultados obtenidos en la parte de linealidad del sistema en CLAE

Tabla A-9: Datos y resultados para la prueba de hipótesis sobre la ordenada al origen de la linealidad incluyendo el punto (0,0).

Concentración (ppm)	Área	XX	YY	XY		
0	0	0	0	0	n	61
5	39,870	25	1,589,616,900	199,350	x	17.2131
5	40,071	25	1,605,685,041	200,355	Sxx	28,525
5	40,099	25	1,607,929,801	200,495	Syy	21,311
5	40,452	25	1,636,364,304	202,260	Sxy	24,652
5	40,487	25	1,639,197,169	202,435	Se	1197.0978
5	40,950	25	1,676,902,500	204,750	Datos de regresión lineal y=mx+b	
5	40,907	25	1,673,382,649	204,535	b:	-1380.5
5	40,772	25	1,662,355,984	203,860	m:	8596.8
5	40,881	25	1,671,256,161	204,405	r:	0.9999
5	39,512	25	1,561,198,144	197,560	t_{cal}	-4.10
10	84,073	100	7,068,269,329	840,730	a/2	0.025
10	84,320	100	7,109,862,400	843,200	g.l	59
10	83,587	100	6,986,786,569	835,870	t_{tab}	-2.30
10	84,559	100	7,150,224,481	845,590	Conclusión	
15	126,554	225	16,015,914,916	1,898,310	Se rechaza la hipótesis nula, la linealidad no tiende al origen.	
15	127,489	225	16,253,445,121	1,912,335		
15	127,025	225	16,135,350,625	1,905,375		
15	126,164	225	15,917,354,896	1,892,460		
15	127,350	225	16,218,022,500	1,910,250		
15	128,785	225	16,585,576,225	1,931,775		
15	124,660	225	15,540,115,600	1,869,900		
15	126,810	225	16,080,776,100	1,902,150		
15	127,883	225	16,354,061,689	1,918,245		
15	127,780	225	16,327,728,400	1,916,700		
20	171,335	400	29,355,682,225	3,426,700		
20	169,952	400	28,883,682,304	3,399,040		
20	170,755	400	29,157,270,025	3,415,100		
20	171,613	400	29,451,021,769	3,432,260		
20	171,657	400	29,466,125,649	3,433,140		
20	171,368	400	29,366,991,424	3,427,360		
20	171,817	400	29,521,081,489	3,436,340		
20	172,220	400	29,659,728,400	3,444,400		
20	172,682	400	29,819,073,124	3,453,640		
20	170,325	400	29,010,605,625	3,406,500		
25	214,045	625	45,815,262,025	5,351,125		
25	210,658	625	44,376,792,964	5,266,450		
25	214,211	625	45,886,352,521	5,355,275		
25	214,909	625	46,185,878,281	5,372,725		
25	214,105	625	45,840,951,025	5,352,625		
25	212,785	625	45,277,456,225	5,319,625		

25	214,174	625	45,870,502,276	5,354,350	
25	210,101	625	44,142,430,201	5,252,525	
25	213,639	625	45,641,622,321	5,340,975	
25	212,601	625	45,199,185,201	5,315,025	
30	258,284	900	66,710,624,656	7,748,520	
30	255,247	900	65,151,031,009	7,657,410	
30	257,647	900	66,381,976,609	7,729,410	
30	256,678	900	65,883,595,684	7,700,340	
30	257,450	900	66,280,502,500	7,723,500	
30	257,772	900	66,446,403,984	7,733,160	
30	258,818	900	66,986,757,124	7,764,540	
30	253,592	900	64,308,902,464	7,607,760	
30	257,518	900	66,315,520,324	7,725,540	
30	256,440	900	65,761,473,600	7,693,200	
Total:	1050	8,929,958	22,750	1.65665E+12	194126655

Tabla A-9: Datos y resultados para la prueba de hipótesis sobre la ordenada al origen de la linealidad sin incluir el punto (0,0).

Concentración (ppm)	Área	XX	YY	XY		
5	39,870	25	1,589,616,900	199,350	n	60
5	40,071	25	1,605,685,041	200,355	x	17.50
5	40,099	25	1,607,929,801	200,495	Sxx	262,500
5	40,452	25	1,636,364,304	202,260	Syy	19,654,581,910,316
5	40,487	25	1,639,197,169	202,435	Sxy	2,271,143,400
5	40,950	25	1,676,902,500	204,750	Se	1162.9230
5	40,907	25	1,673,382,649	204,535	Datos de regresión lineal y=mx+b	
5	40,772	25	1,662,355,984	203,860	b:	-2576.9344
5	40,881	25	1,671,256,161	204,405	m:	8651.97464
5	39,512	25	1,561,198,144	197,560	r:	0.99998
10	84,073	100	7,068,269,329	840,730		
10	84,320	100	7,109,862,400	843,200	a/2	0.025
10	83,587	100	6,986,786,569	835,870	g.l	58
10	84,453	100	7,132,309,209	844,530	t_{tab}	2.3011
10	84,190	100	7,087,956,100	841,900	IC "b"	
10	84,120	100	7,076,174,400	841,200	+	-1792.1662
10	83,777	100	7,018,585,729	837,770	-	-3361.6804
10	83,947	100	7,047,098,809	839,470	IC "m"	
10	84,033	100	7,061,545,089	840,330	+	12697.6936
10	84,559	100	7,150,224,481	845,590	-	4606.2556
15	127,025	225	16,135,350,625	1,905,375		
15	126,164	225	15,917,354,896	1,892,460		
15	127,350	225	16,218,022,500	1,910,250		
15	128,785	225	16,585,576,225	1,931,775		
15	124,660	225	15,540,115,600	1,869,900		
15	126,810	225	16,080,776,100	1,902,150		
15	127,883	225	16,354,061,689	1,918,245		
15	127,780	225	16,327,728,400	1,916,700		
20	171,335	400	29,355,682,225	3,426,700		
20	169,952	400	28,883,682,304	3,399,040		
20	170,755	400	29,157,270,025	3,415,100		
20	171,613	400	29,451,021,769	3,432,260		
20	171,657	400	29,466,125,649	3,433,140		
20	171,368	400	29,366,991,424	3,427,360		
20	171,817	400	29,521,081,489	3,436,340		
20	172,220	400	29,659,728,400	3,444,400		
20	172,682	400	29,819,073,124	3,453,640		
20	170,325	400	29,010,605,625	3,406,500		
25	214,045	625	45,815,262,025	5,351,125		
25	210,658	625	44,376,792,964	5,266,450		
25	214,211	625	45,886,352,521	5,355,275		
25	214,909	625	46,185,878,281	5,372,725		
25	214,105	625	45,840,951,025	5,352,625		
25	212,785	625	45,277,456,225	5,319,625		
25	214,174	625	45,870,502,276	5,354,350		
25	210,101	625	44,142,430,201	5,252,525		
25	213,639	625	45,641,622,321	5,340,975		
25	212,601	625	45,199,185,201	5,315,025		

30	258,284	900	66,710,624,656	7,748,520	
30	255,247	900	65,151,031,009	7,657,410	
30	257,647	900	66,381,976,609	7,729,410	
30	256,678	900	65,883,595,684	7,700,340	
30	257,450	900	66,280,502,500	7,723,500	
30	257,772	900	66,446,403,984	7,733,160	
30	258,818	900	66,986,757,124	7,764,540	
30	253,592	900	64,308,902,464	7,607,760	
30	257,518	900	66,315,520,324	7,725,540	
30	256,440	900	65,761,473,600	7,693,200	
Total:	1050	8,929,958	22,750	1.65665E+12	194,126,655

Datos y resultados obtenidos en la parte de precisión del sistema en la práctica de HPLC.

Tabla A-10: Datos y resultados para la prueba de precisión.

(Centroide de la curva de calibración 15 ppm) para HPLC							N	35
							Σxi	42,941
Área (A)							MEDIA	12,269
1° corrida	2° corrida	3° corrida	4° corrida	5° corrida	6° corrida	7° corrida	ΣXi^2	5.28E+11
127,282	123,289	127,780	114,028	127,350	117,487	127,777	S^2	3,4761
113,007	127,883	113,486	122,296	127,342	127,313	118,320	S	5,896
113,189	113,324	127,327	114,301	115,243	127,606	127,710	CV	4.81
126,554	127,009	126,694	124,660	115,790	117,671	127,025	σ	5,895.9272
127,489	128,785	113,617	126,810	126,221	126,345	126,164	σ^2	34,761,958.28
607,521	620,290	608,904	602,095	611,946	616,422	626,996	χ^2 cal	34
							A	0.05
							g.l	34
							χ^2 tab	48.60236
							$\chi^2 \alpha$	51.96599
							$\chi^2 1-\alpha/2$	19.80625
							IC de σ^2	
							+	4,769.0508
							+	7,724.8564