

870127  
D.  
2ej

---

# UNIVERSIDAD AUTONOMA DE GUADALAJARA

Incorporada a la Universidad Nacional Autónoma de México

---

ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

COMPARACION DE METODOS INSTRUMENTALES DE  
ANALISIS EN VITAMINA B1.

---

## TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A  
DANIEL ACEVES RODRIGUEZ

Asesor: Q.F.B. Beatriz García Vázquez  
GUADALAJARA, JALISCO 1987

---



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 está 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.

## CAPITULOS

I.-	INTRODUCCION .....	1
II.-	MONOGRAFIA .....	4
	2.1 VITAMINA B <sub>1</sub> ( CLORHIDRATO DE TIAMINA )	
III.-	GENERALIDADES .....	12
	3.1 ESPECTROFOTOMETRIA ( BASES TEORICAS )	
	a) ULTRAVIOLETA      b) VISIBLE	
	3.2 FLUOROMETRIA ( BASES TEORICAS )	
	3.3 INFRAROJO ( BASES TEORICAS )	
IV.-	ESTADISTICA.....	33
	4.1 MEDIDAS DE TENDENCIA CENTRAL	
	4.2 MEDIDAS DE DISPERSION	
	4.3 ANALISIS DE VARIANCIAS Y PRUEBA DE BARTLETT	
V.-	RESULTADOS EXPERIMENTALES.....	46
VI.-	ESTUDIOS ESTADISTICOS.....	50
VII.-	CONCLUSIONES.....	56
VIII.-	BIBLIOGRAFIA.....	59

I

**INTRODUCCION**

## PROYECTO DE INVESTIGACION

### I.- EL PROBLEMA

#### INTRODUCCION

Dado el progresivo avance de la tecnología en nuestra época se tienen en el mercado una gran cantidad de aparatos y equipos de laboratorio, de base y tipo muy variado para uso del químico o analista.

La tecnología ha logrado conjugar: la óptica, mecánica, computación, etc, resultando aparatos de una resolución y exactitud inapreciables, facilitando las determinaciones, y disminuyéndose a la vez el factor del tiempo.

Sin embargo, a pesar de que se conocen estos equipos, al profesor de la carrera de Químico Farmacéutico Biólogo, no cuenta con un recurso didáctico práctico para enseñar la utilidad de los mismos, o justificar la compra de algún equipo en un laboratorio o específicamente en el departamento de biofarmacia, por dar algunos ejemplos.

Así sería necesario ejemplificar con un estudio la necesidad de contar con un equipo disponible para realizar las prácticas de nuestras materias con el equipo apropiado.

En el presente trabajo se realizan determinaciones analíticas de una muestra de vitamina B<sub>1</sub> ( Clorhidrato de Tiamina ) 10 veces por los siguientes métodos:

- 1) Valoración Espectrofotométrica Directa.
  - 2) Valoración Fluorométrica ( reacción del Tiochromo )
  - 3) Valoración Colorimétrica ( Reineckate de amonio ).
- Además se identificara por infrarrojo (de manera cuantitativa).

Con los resultados obtenidos se hará un estudio estadístico correspondiente de cada instrumento para determinar su

- a) Precisión
- b) Exactitud

Con estos resultados se obtendrán las conclusiones en base a la comparación de dichos métodos.

En el presente estudio, se tiene por objeto aplicar la estadística a los resultados obtenidos en la valoración de una sustancia determinada, y así en base a estos resultados poder justificar la utilidad y por lo tanto la compra de algún equipo.

En este estudio se usaron 3 métodos indicados para la valoración de vitamina B<sub>1</sub> ( se eligió esta sustancia por su estabilidad y por la variabilidad de valoración ), los métodos: fluorométrico, espectrofotométrico y colorimétrico. De cada valoración se obtuvieron 10 lecturas utilizando primero un estándar de 3 microgramos y muestras preparadas a la misma concentración.

El tratamiento estadístico que se le dió a la muestra fue un análisis de variancia y prueba de Bartlett para poder determinar en base a dos hipótesis ( hipótesis de igualdad de medias y varianzas ) si los 3 métodos son igualmente exactos o igualmente precisos.

Así en base a este estudio estadístico podemos comprobar estas características de los tres métodos antes indicados.

Además no solo se podrá aplicar este estudio de la tesis de la vitamina, sino que se podrá utilizar para otras sustancias que se valoran por distintos métodos y poder concluir cual es más exacto y preciso para dicha sustancia en base a los resultados obtenidos.

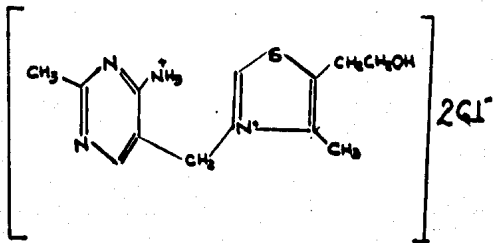
II

MONOGRAFIAS

# CLORHIDRATO DE TIAMINA

Thiazine Chlorhydras

Sin.: Vitamina B<sub>1</sub>. Clorhidrato de aneurina



$C_{12}H_{17}ClN_4OS.HCL$

P.N. 337.29

El clorhidrato de tiamina, desecado a 105° durante 2 horas, contiene no menos del 98 por ciento de:

$C_{12}H_{17}ClN_4OS.HCL$

DESCRIPCION: Cristales pequeños, blancos o polvo cristalino, de color característico, higroscópico (el producto anhidro expuesto al aire, rápidamente absorbe hasta 4% de agua). Soluble en agua 25° (1 en cerca de 1), en alcohol (1 en cerca de 100), en glicerina (1 en cerca de 78); insoluble en soluciones fuertemente ácidas, inestable en soluciones neutras e alcalinas. La solución acuosa (1:50) es ácida al tornasol.

Nota.- Una unidad internacional de clorhidrato de tiamina (vitamina B<sub>1</sub>) es la cantidad correspondiente a 0.005 mg de clorhidrato de tiamina patrón.



**ENSAYOS DE IDENTIDAD.**- Disuélvase una pequeña cantidad de clorhidrato de tiamina en un poco de agua y agréguense unas gotas de solución reactiva de cloruro mercurico se formara un precipitado color blanco. Si se agrega S. R. de yodo el precipitado es moreno rojizo; con la S. R. de trinitrofenol y con S. R. de yoduro de potasio mercurico también da precipitado.

Fézcase 1 ml de S. R. de acetato de plomo con 1 ml de solución acuosa de hidróxido de sodio ( 1:10 ). Disuélvase en la mezcla 5 mg de clorhidrato de tiamina; el líquido toma un color amarillo. Si se calienta en baño maría durante algunos minutos el color cambia a café. Por reposo se formará un precipitado negro de sulfuro de plomo.

El clorhidrato de tiamina con solución acuosa ( 1:50 ) responde a las reacciones para cloruros.

Disuélvase cerca de 5 mg de clorhidrato de tiamina en 5 ml de solución 0.5 de hidróxido de sodio; agréguense 0.5 ml de S. R. de ferricianuro de potasio y 5 ml de alcohol isobutílico; agítase la mezcla vigorosamente durante 2 minutos y déjese separar; iluminando el tubo con un rayo de luz que entre por la boca y observando el tubo en ángulo recto, con respecto al rayo de luz, el menisco superior muestra fluorescencia azul viva; la fluorescencia desaparece acidificando ligeramente la muestra pero reaparece alcalinizándola.

**ENSAYOS DE PUREZA.**- Deséquense alrededor de 500 mg de clorhidrato de tiamina, pesados con precisión a 105° durante 2 horas, la pérdida de peso no es superior a 5% (pérdida al secado).

Per incineración, el clorhidrato de tiamina no da residuo superior a 0.2% ( Residuo de la ignición ).

Disuélvase 1 gr de clorhidrato de tiamina en suficiente cantidad de agua para hacer 10 ml; por otra parte mézclese 1.5 ml de solución 0.1 N de dicromato de potasio con cantidad suficiente para hacer 1000 ml; compárense ambos tubos: el color de la solución de clorhidrato de tiamina no es más colorido que el de la solución de dicromato de potasio ( Límite de color ).

A 5 ml de una solución de clorhidrato de tiamina ( 1:100 ) agréguese 5 ml de ácido clorhídrico diluido y 0.5 ml de S.R. de cloruro de bario; dentro de 5 minutos la solución no debe enturbiarse. (Sol. factor).

Pésense con precisión 250 mg del clorhidrato de tiamina obtenido en el ensayo de pérdida al secado; disuélvase en 20 ml de agua recientemente hervida y fría; agréguese una gota de fenolftaleína y válórese con solución 0.1 N de hidróxido de sodio hasta color rosado: no se gastan menos de 28 ml ni más de 30.5 ml de solución 0.1 N de hidróxido de sodio por cada gramo de clorhidrato de tiamina ( Límite de ácido clorhídrico ).

VALORACION.- Pérense con precisión de 50 a 60 mg de clorhidrato de tiamina obtenido en el ensayo de pérdida en el secado; disuélvase en suficiente cantidad de sol. 0.1 N de ácido sulfúrico para hacer 1000 ml de sol. y mézclese bien. Dilúyase una porción alcuotada de esta solución equivalente a 500 mg de clorhidrato de tiamina con suficiente agua para hacer 500 ml y mézclese bien.

De esta solución utilícese para la valoración 2 ml medidos con precisión, y 2 ml también medidos con precisión de solución tipo de clorhidrato de tiamina, preparada como se indica en la Valoración por tiocromo, y procédase a la valoración como lo indica dicho método, comenzando por la oxidación, la fluorescencia de la solución por valorar corresponde a no menos del 98% de la fluorescencia de la cantidad equivalente de la solución tipo de clorhidrato de tiamina.

OBSERVACION.- In envases protegidos de la luz, bien cerrados y en sitio seco.

INDICACION Y EMPLEO TERAPEUTICO.- Vitaminoterapia ( antineurfti ca )

DOSIS USUAL.- Profiláctica: 1 mg. Curativa: 10 a 30 mg por via oral. Via parenteral dosis usual 50 a 100 mg.

## ACCIONES FARMACOLÓGICAS:

La tiamina está prácticamente desprovista de acciones farmacológicas cuando se administra en las dosis terapéuticas habituales. Incluso las dosis grandes no tienen efecto sobre la concentración sanguínea de glucosa, pese al papel fisiológico de la vitamina en el metabolismo intermedio de los hidratos de carbono. Los casos clínicos aislados publicados de reacciones tóxicas a la administración parenteral de tiamina representan probablemente ejemplos raros de hipersensibilidad.

## FUNCIONES FISIOLÓGICAS:

El pirofosfato de tiamina, la forma activa de la tiamina, funciona en el metabolismo de los hidratos de carbono como una coenzima en la descarboxilación de los alfa-ceto ácidos como piruvato y alfa-cetoglutarato y en la utilización de pentosa en el shunt de monofosfato de hexosa; esta última función involucra la enzima transcetolasa, dependiente del pirofosfato de tiamina. Varios cambios de metabolismo de importancia clínica pueden relacionarse con la acción bioquímica de la tiamina. En la deficiencia de esta última, la oxidación de alfa-ceto ácidos está deteriorada, y el aumento de concentración sanguínea de piruvato se ha usado como uno de los signos diagnósticos del estado carental. Una prueba diagnóstica más específica de la deficiencia de tiamina se basa en la medición de la actividad de transcetolasa en los eritrocitos. El requerimiento de tiamina tiene relación con el índice metabólico y es máximo cuando los hidratos de carbono son la fuente de energía. Esto tiene importancia -- prácticamente para los pacientes mantenidos con alimentación parenteral y que por ende reciben prácticamente todas sus calorías en forma de dextrosa.

## SÍNTOMAS DE DEFICIENCIA:

La deficiencia severa de tiamina lleva al estado llamado beriberi. En el Oriente el mismo se debe al consumo de dietas de arroz -descarburado, que son deficientes en la vitamina. En los países occidentales la deficiencia de tiamina se ve más común en alcohólicos, una forma severa de deficiencia de tiamina puede ocurrir también en lactantes.

Los síntomas principales de deficiencia de tiamina se relacionan con el sistema nervioso ( beriberi seco ) y con el sistema cardiovascular ( beriberi húmedo ).

Muchos de los signos y síntomas neurológicos son característicos de la neuritis periférica, con trastornos sensitivos en las extremidades, incluso áreas localizadas de hiperestesia o anestesia. - Trastornos de la personalidad, depresión, falta de iniciativa, e hipoprosxia pueden resultar también de la carencia de esta vitamina.

Síntomas del tracto gastrointestinal se observan también en casos de deficiencia severa. La pérdida del apetito aparece pronto y esta seguida de constipación.

## ABSORCIÓN, DESTINO Y EXCRECIÓN:

La absorción de las cantidades dietéticas habituales de la tiamina del tracto gastrointestinal se hace por transporte activo dependiente del sodio en mayores concentraciones la difusión pasiva también es importante. La absorción se limita generalmente a una cantidad diaria máxima de 8 a 15 mg, pero la misma puede excederse por administración oral en dosis divididas administradas junto con las comidas.

En los adultos aproximadamente 1 mg. de tiamina por día se degrada completamente en los tejidos, y este es más o menos el requerimiento mínimo diario. Cuando la ingesta se hace bajo este nivel, poca o ninguna tiamina se excreta por orina. Cuando la ingesta excede el requerimiento mínimo, las reservas de los tejidos se saturan primero y después del exceso aparecen cuantitativamente en la orina como tiamina intacta o pirimidina que surge de la degradación de la molécula de tiamina. Cuando la ingesta de tiamina aumenta más aún, una parte mayor del exceso se excreta sin cambios, indicando que la capacidad de los tejidos para dividir tiamina dando pirimidina es limitada.

#### USOS TERAPÉUTICOS:

El único uso terapéutico establecido de la tiamina es el tratamiento o la profilaxis de la deficiencia de la misma. Para corregir el trastorno lo más rápidamente posible, se justifican dosis parenterales de hasta 30 mg tres veces al día. Una vez corregida la deficiencia de tiamina, no hay necesidad de inyección parenteral ni de administración de cantidades mayores que los requerimientos diarios, excepto en casos donde los disturbios gastrointestinales impiden la ingestión o absorción de cantidades suficientes de vitamina.

Los síndromes de deficiencia de tiamina que se ven clínicamente pueden ir desde el beriberi a la encefalopatía de Wernicke, el síndrome de Korsakoff y la polineuropatía alcohólica. El tipo parece depender de la magnitud de la carencia. La encefalopatía y el síndrome de Korsakoff resultan de una privación severa, en la enfermedad cardíaca del beriberi aparece en sujetos con menor deficiencia; la polineuritis se observa en la privación más leve. Lo que sigue es una breve descripción de variedades de deficiencia de tiamina y su tratamiento.

III

GENERALIDADES

**Origen de los espectros de absorción.**

Todos los átomos y moléculas son capaces de absorber energía de acuerdo con ciertas limitaciones las cuales dependen de la estructura de la sustancia. La energía se puede proporcionar en forma de radiación electromagnética ( luz ). El tipo y la cantidad de radiación absorbida por una molécula guarda relación con la estructura de la molécula; la cantidad de radiación absorbida esta sujeta asimismo al número de moléculas que interaccionan con la radiación.

**Radiación electromagnética.**

Cabe considerar la radiación electromagnética, de la cual la luz visible constituye parte, como energía propagada en forma de onda. Se utilizan varios términos y relaciones para escribir la onda

La longitud de onda es la distancia lineal desde cualquier punto de la onda hasta el punto correspondiente de la onda adyacente, se expresa en centímetros ( cm ) e mas comúnmente en las siguientes unidades,  $\text{Å}^0$ , nanómetro ( nm ), en la actualidad el término nanómetro se prefiere más a la del antiguo milimicrón.

**Frecuencia:** Es el número de ondas que pasan por un punto dado en la unidad de tiempo. ( v )

**El número de ondas:** Es el inverso de la longitud de onda ( cuando la longitud de onda se expresa en cm ).

El medio a través del cual pasa la onda no afecta la frecuencia de la radiación electromagnética. Sin embargo la longitud de onda varia con el medio. Esto significa que la velocidad de la radiación depende del medio de propagación.



Toda la radiación electromagnética es, de modo fundamental, similar con interdependencia de su longitud de onda pero se han asignado distintos nombres a la radiación de diferentes márgenes de frecuencia.

REGIONES	INTERVALOS DE LONGITUD DE ONDA
Ultravioleta lejano	100 - 200 nm
Ultravioleta	200 - 400 nm
Visible	400 - 750 nm
Infrarrojo cercano	0.75 - 4 nm
Infrarrojo	4 - 25 nm

Absorción de radiación por las moléculas.

Todas las moléculas poseen energía, lo cual puede deberse a varios fenómenos.

- 1.- La molécula se mueve como un todo, esto se conoce como traslación, y la energía asociada es la energía translacional.
- 2.- Las partes de la molécula, es decir los átomos o grupos de átomos se mueven cada uno con respecto a los demás; y se comporta como energía de vibración.
- 3.- Las moléculas pueden rotar alrededor de un eje y tal rotación se caracteriza por energía de rotación.
- 4.- Además de estos modos de movimiento, la molécula posee una configuración electrónica, y la energía electrónica depende del estado electrónico de la molécula.

La energía de una molécula es la suma de sus componentes de energía:

de traslación, vibración, rotación y electrónica.

$$E = E_{\text{trans}} + E_{\text{vib}} + E_{\text{rot}} + E_{\text{elec}}$$

Si la molécula pasa desde uno de sus niveles de energía permitidos hasta otro más bajo, se ha de liberar cierta energía. Esta energía puede perderse como radiación y entonces se dice que se ha producido emisión de radiación. Si se permite que una molécula encuentre una radiación electromagnética de una frecuencia apropiada de manera que la energía de la molécula se eleve desde un nivel a otro superior, se dice entonces que ha ocurrido una absorción de radiación.

Para que se produzca absorción, la diferencia de energía entre los dos niveles energéticos debe ser igual a la energía del fotón absorbido, matemáticamente se expresa:

$$E_2 - E_1 = h\nu$$

$E_1$  = Energía del nivel más bajo.

$E_2$  = Energía del nivel superior.

$\nu$  = Frecuencia del fotón absorbido.

Este salto de energía desde un nivel a otro se conoce como transición. Y el componente energético que participa en el proceso de absorción se especifica como transiciones de rotación, de vibración, y de electrónicas.

Una consecuencia sencilla de esto es la medición experimental de la extensión de la absorción de radiación por una molécula como una función de la frecuencia de la radiación. Una gráfica de la -

extensión de la absorción de la luz en función de la frecuencia ( o longitud de onda ) de la luz, es un espectro de absorción. Debido a que las transiciones permitidas son diferentes para moléculas con distinta estructura. Por consiguiente, se utilizan los espectros - para identificar compuestos y esta aplicación se basa en la cantidad de luz absorbida con el número de moléculas que absorben, por lo que los espectros también se emplean como un medio de análisis - cuantitativo.

Por absorción de radiación infrarroja es posible que se produzcan transiciones de vibración. Asociado con cada transición de vibración hay cierto número de transiciones de vibración; de este modo, en lugar de un pico definido en el espectro de absorción correspondiente a la frecuencia de la transición de la vibración se observa una banda ancha, que se puede adscribir a las transiciones de rotación superpuestas sobre la transición de vibración.

La luz visible y la ultravioleta proporcionan suficiente energía para las transiciones electrónicas. Los espectros visible y ultravioleta se conocen como espectros electrónicos.

#### Aplicaciones cuantitativas de los espectros de absorción.

Ley de Beer: El análisis espectroscópico cuantitativo se basa entre la cantidad de luz absorbida y la cantidad de sustancia absorbente, la ley de Beer establece que la absorbancia, A de una solución es directamente proporcional a la concentración "c" del soluto absorbente. ( a menudo se asocian los nombres de Bouguer-Lambert - con la dependencia de la absorbancia sobre el paso de luz, "b" a través de la solución y entonces a la ecuación se le denomina de Beer-Lambert )

$$A = abc$$

**Significados:**

- A = absorbancia
- c = concentración del solute
- a = absortividad
- b = longitud del paso de luz

Otra terminología: Las cantidades espectroscópicas que se miden son:

Transmitancia T ( donde  $T = I/I_0$  )

$I_0$  = intensidad de la luz incidente

I = intensidad de la luz después de pasar a través del espesor "b" de solución.

Absortividad "a" ( es una constante de proporcionalidad que es independiente de la concentración, - paso de la luz e intensidad. Depende de la temperatura, estructura molecular y longitud de onda de la radiación incidente. Si "c" es una concentración molar recibe el nombre de absortividad molar representada por "a". )

Cuando "c" se expresa en porcentaje peso/volumen ( g/100 ml, la absortividad se escribe:

$$A \frac{1\%}{1 \text{ cm}}$$

**Espectrofotómetros:**

Se denomina espectroscopio o espectrómetro a todo instrumento utilizado en la medida de un espectro. Si la luz que ha atravesado la muestra se detecta con una película o placa fotográfica, se trata de un espectrógrafo; si la intensidad de luz se mide con una célula fotoeléctrica el instrumento es un espectrofotómetro. La mayoría de los instrumentos actualmente en uso son espectrofotómetros. Un espectrómetro diseñado para realizar medidas de absorción únicamente en la región visible suele recibir el nombre de colorímetro.

Todos los espectrofotómetros se componen de los elementos siguientes ( el orden en que estas partes se disponen puede variar ligeramente de lo ofrecido en este esquema. Los materiales y los detalles de construcción dependen del margen de longitud de onda que se va a estudiar y se necesitan dos tipos generales de instrumentos los espectros electrónicos se miden con un espectrofotómetro de ultravioleta que sirve tanto para la región ultravioleta como para visible.

Para la región espectral más allá de al rededor de un micrómetro se requiere un espectrofotómetro de infrarrojo. El infrarrojo próximo es accesible para algunos espectrofotómetros de ultravioleta especialmente diseñados para medir espectros en el infrarrojo próximo.

**Partes de que consta un espectrofotómetro:**

1) Fuente de luz.- Puede ser:

- a) Una lámpara de tungsteno para la región visible,
- b) en la región uv una lámpara de descarga de hidrógeno,
- c) en el espectro infrarrojo una fuente de ir ampliamente utilizada consiste en una varilla de carburo de silicio calentada eléctricamente a 1200° C.

2) Selector de frecuencia.- Se utiliza para escoger a voluntad la longitud de onda o la frecuencia de la radiación.

3) Control de intensidad.- Son muy variadas en la mayoría de los espectrofotómetros hay uno o mas mecanismos de rendijas, accionados o manual o automáticamente cuya anchura se varía controlando así la intensidad de luz que alcanza la muestra.

4) Porta-muestras.-

a) Para la región uv visible se emplean cubetas de vidrio y cubetas de sílice.

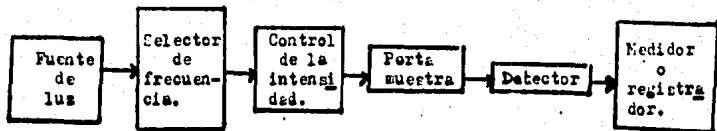
b) Para los espectros infrarrojos se emplean cubetas de cloruro de sodio u otros haluros también dispersandolos en aceite mineral ( nujol ) o se comprimen en tabletas con bromuro de potasio como diluyente la dispersion líquida se coloca entre placas de NaCl como soporte en el paso de luz.

5) Detector.- En los espectrofotómetros se emplean dispositivos electrónicos que se conocen como fototubos y tubos fotomultiplicadores para detectar la intensidad de luz transmitida por la muestra.

En los infrarrojos de energía de radiación se convierte en energía-térmica detectada como un cambio de una propiedad.

6) Medidor registrador.- La señal del detector se alimenta con un circuito potenciométrico que se gradúa para obtener una lectura de transmitancia o absorbancia, por lo que se calibra adecuadamente este instrumento en estas unidades en lugar de la señal eléctrica primaria.

En los espectrofotómetros registradores, trazan un registro de la absorbancia o la transmitancia sobre papel cuadrulado; con estos instrumentos se registra automáticamente el espectro de absorción completo, y el propio instrumento "explora" el intervalo de longitud de onda y dibuja la curva de absorbancia-long.de onda.



Disposición esquemática de un espectrofotómetro.

## ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

El análisis de fluorescencia es un método analítico estrechamente relacionado con la espectrofotometría muchas moléculas son capaces de emitir la energía que absorben como radiación con lo cual vuelven a su estado natural ( fundamental ). La radiación emitida como fluorescencia.

El espectro de absorción electrónico de una molécula que es capaz de sufrir fluorescencia también se conoce como espectro de excitación. De la misma manera que se determina un espectro de absorción, es posible medir un espectro de fluorescencia.

Los máximos de fluorescencia aparecen siempre a longitudes de onda mayores a los máximos de excitación. Esto significa que la diferencia de energía entre los estados excitado y fundamental es mayor en la transición de absorción que en el proceso de emisión. Este resultado se explica si se recuerda que cada estado electrónico conyeva gran número de niveles de energía de vibración. El nivel de vibración más bajo del estado fundamental es el más denadamente poblado. Después de la absorción de la luz por las moléculas, se produce una transición desde el estado fundamental hasta el estado singulete excitado que también posee, muchos niveles de vibración; no todas las moléculas se excitaran al mismo nivel de vibración así, se observara una ancha banda de absorción cuya amplitud viene controlada, en parte, por la separación de niveles de vibración dentro del estado excitado.

El nivel de vibración superior del estado excitado las moléculas pierden rápidamente su exceso de energía de vibración por disipación térmica, poblando así el nivel de vibración inferior del estado excitado. Como emisión de radiación ( fluorescencia ), estas moléculas pueden volver a cualquiera de los niveles de vibración del estado fundamental. El resultado global a sido que la mayoría de las moléculas pierden menos energía por emisión que la que generaron por absorción, por lo que el espectro de fluorescencia aparece a longitudes de onda mayores que el espectro de excitación.



## ANÁLISIS FLUORESCENTE CUANTITATIVO:

Para que una molécula presente fluorescencia debe, ante todo, absorber radiación. Si la concentración de la sustancia absorbente es muy alta, es posible que las primeras capas de la solución absorban toda la luz incidente sin que apenas llegue luz a las partes más distantes de la muestra. La fluorescencia de dicha muestra no será, pues, uniforme ni tampoco proporcional a la concentración de la sustancia.

Puesto que esto es un inconveniente desde el punto de vista analítico siempre se mantiene a niveles muy bajos las concentraciones de las soluciones de sustancias fluorescentes, para evitar la absorción de una fracción apreciable del rayo incidente.

La fórmula para indicar la intensidad de fluorescencia es la siguiente:

$$F = 2.3 I_0 \phi abc$$

Su significado es:

F = intensidad de fluorescencia (intensidad de radiación emitida).

$\phi$  = rendimiento cuántico de fluorescencia.

$I_0$  = intensidad de radiación incidente.

a = absorptividad solar.

b = longitud del paso de luz.

c = concentración molar.

El procedimiento analítico es prácticamente el mismo que para el análisis espectrofotométrico de un solo componente. Se prepara una curva de calibrado de intensidad de fluorescencia en función de la concentración de sustancia fluorescente, con soluciones conocidas de una muestra pura. Luego se somete la muestra problema al mismo procedimiento, y se busca su concentración a partir de la curva. Es necesario mantener las

mismas condiciones experimentales (fuente de excitación, disolvente, pH, temperatura) para las medidas del calibrado y del problema. Muchas sustancias interfieren reduciendo el valor efectivo de  $\phi$  y, por tanto, la sensibilidad de un compuesto fluorescente. Esta represión de la fluorescencia se denomina extensión.

#### MEDIDA DE LA INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA:

En seguida se muestran los componentes esenciales de un fluorómetro (o fluorímetro) y su disposición en el instrumento que se emplea para medir la intensidad de fluorescencia, F.

La fuente de luz debe ser muy intensa y muy estable porque "F" depende directamente de  $I_0$ . Las lámparas de arco de mercurio y de xenón son de uso común. Estas lámparas emiten en las regiones visibles y ultravioletas.

Para alcanzar determinado valor de excitación, y para reducir la luz extraña, se selecciona una banda de radiación más o menos estrecha a partir de la radiación emitida por la fuente de luz. Se efectúa esta selección mediante el filtro de excitación, que en la mayoría de los fluorímetros es un filtro de vidrio que transmite luz de la longitud de onda deseada y absorbe todas las demás radiaciones. El filtro de excitación también se conoce como filtro primario.

Después la luz de excitación pasa por la cubeta de muestra, las cubetas de vidrio son adecuadas para la mayor parte del análisis, por debajo de 320 nm puede usarse el cuarzo.

El filtro de fluorescencia (filtro secundario) hace que parte de la luz transmitida se disperse en la dirección indicada y la luz indeeseable se repara de tal manera que se tenga máxima transmisión en el máximo de fluorescencia.

En continuación la fluorescencia alcanza un fototubo o fotomultiplicador produciendo así una señal eléctrica que se amplifica y mide con un medidor para indicar la intensidad de fluorescencia.

Actualmente se dispone de instrumentos en que se han reemplazado los filtros de excitación y fluorescencia por monocromadores, que permiten la selección de bandas de radiación muy estrechas. Estos instrumentos que se llaman espectrofotofluorímetros, son capaces de medir los espectros de excitación y fluorescencia de la misma manera que se pueden utilizar un espectrofotómetro para determinar espectros de absorción.

## M E T O D O S

## VALORACION ESPECTROFOTOMETRICA DE LA TIAMINA

La tiamina presenta una marcada absorción en la región ultravioleta del espectro, que depende notablemente del pH de la solución. Esta propiedad puede aplicarse al análisis cuantitativo de las sales de tiamina en soluciones puras.

En soluciones neutras ( tampón fosfato pH 7 ) existen dos puntos de absorción máxima: a 232-233 nm con extinción específica  $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 345$  ( calculada para el clorh. de tiamina anhidro ).

Y a 266 nm con extinción específica  $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 255$  en soluciones ácidas ( pH 2 ), el máximo se presenta a 246 nm con un  $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 425$ .

### REACTIVOS:

Acido Clorhídrico 1 N  
Tampón fosfato pH 7.00

### METODO:

La solución problema se ajusta a pH 2 con ácido clorhídrico 1 N o a pH 7 con tampón fosfato, diluyendo en agua en un matríz aforado, de tal modo que se obtengan soluciones de 1 a 2 mg de sal de tiamina por 100ml.

El pH puede ajustarse simplemente asegurándose de que la dilución final contiene 2 ml de ácido clorhídrico 1 N en 100 ml, en el caso de la solución ácida, o 5 ml de tampón en 100 ml, en el de la solución neutra.

Las extinciones E de las soluciones se determinan espectrofotométricamente en una celda de 1 cm. frente a un blanco de HCl 1 N a una longitud de onda de 246 nm. ( pH 2 ) o 232 nm ( pH 7 ).

## CALCULO

a) A pH 2 :

$$\frac{E_{246\text{nm}}}{0.425} = \text{mg. de clorhidrato de tiamina anhidro en 100 ml de solución}$$

b) A pH 7 :

$$\frac{E_{232\text{nm}}}{0.345} = \text{mg de clorhidrato de tiamina anhidro en 100 ml de solución.}$$

### ABSORCION AJENA:

La absorción ajena, debido a impurezas interferentes, se presentan alguna vez en estas determinaciones y puede detectarse fácilmente midiendo la absorción de los puntos isobélicos a 235.8 nm y a 273 nm ( extinciones específicas de 324 y 250 respectivamente ). A estas longitudes de onda la absorción de la vitamina es independiente de pH. Puesto que las curvas de absorción de muchas de las impurezas que pueden existir en las soluciones de vitamina B<sub>1</sub> son asimismo pH dependiente, basta con preparar diversas diluciones de la solución problema a distintos pH y medir y comparar las absorciones a 235.8 y 273 nm. Si los valores obtenidos se corresponden es altamente improbable que exista absorción interferente, y las determinaciones halladas puede emplearse, en consecuencia para el cálculo del contenido en tiamina.

## MÉTODO FLUOROMÉTRICO

### FUNDAMENTO:

El método fluorométrico ( reacción del tiocromo ) se basa en la oxidación de la tiazina o tiocromo, que tiene lugar en solución alcalina, dando el producto una intensa fluorescencia azul. Es el más específico de todos los métodos empleados para la determinación de vitamina B<sub>1</sub>. Sin embargo los resultados son reproducidos únicamente con un margen de  $\pm 5-10\%$ , de acuerdo con la naturaleza de la muestra. Este método se utiliza principalmente para la determinación de vitamina B<sub>1</sub> en alimentos, productos de nutrición animal, órganos, líquidos biológicos y otros productos naturales en los cuales la mayoría de los otros procedimientos son inaplicables debido a la baja concentración de vitamina B<sub>1</sub>, y al alto contenido de sustancias interferentes. La reacción del tiocromo se aplica también con ventaja en el análisis farmacéuticos, particularmente en el examen de preparaciones multivitámicas.

## REACTIVOS:

Clorhidrato de tiamina ( solución de referencia ).- De grado de pureza de investigación bioquímica, se seca sobre  $P_2O_5$  en un desecador de vacío. Se disuelven exactamente 100 mg de producto desecado en ácido clorhídrico 0.1 N y se lleva el volumen a 100 ml.

Isobutanol.- Para el análisis de vitamina B<sub>1</sub> ( libre de impurezas fluorescentes ).

Solución de cloruro potásico acidificada.- Se disuelven 250 gr de cloruro potásico G.R. en unos 900 ml de agua en un matraz aforado de 1000 ml. Se añaden 8.5 ml de ácido clorhídrico fumante y se diluye con agua hasta la señal de aforo.

Solución oxidante.- Se mezclan 1 ml de solución acuosa al 1% de ferricianuro de potasio G.R. con 24 ml de una solución de hidróxido sódico al 15% antes de su empleo.

Sulfato sódico anhidro.

Acido clorhídrico ( 0.001 - 0.2 N ).- Se diluye con agua hasta la concentración requerida de ácido clorhídrico. G. R.

Etol absoluto G. R.

Metanol G. R.



## METODO:

La solución debilmente ácida se diluye con agua hasta que 1 ml contenga alrededor de 5 microgramos de clorhidrato de tiamina para uso inyectable. Se diluye a la misma concentración la solución de referencia de clorhidrato de tiamina de tal modo que 1 ml de esta solución contenga exactamente 5 microgramos de tiamina anhidro.

Se añaden 4 ml de la solución acidificada de cloruro potásico y 3 ml de la solución oxidante a 1 ml de cada una de las soluciones preparadas ( solución muestra y solución de referencia ) en pequeño embudo de separación; se agitan simultaneamente, de forma suave y con movimientos rotatorios se dejan reposar durante un minuto. Se añaden a cada recipiente 15 ml de isobutanol libre de impurezas fluorescentes, y se agitan de nuevo ambos embudos de separación, simultaneamente y vigorosamente, durante dos minutos. Se dejan sedimentar ambas mezclas, se eliminan las capas acuosas, y las capas isobutanólicas se filtran a través de un poco de sulfato sódico anhidro. Se mide la fluorescencia de los filtrados: elaror de isobutanol en un fluorómetro fotoeléctrico el contenido del clorhidrato de tiamina de la muestra se calcula como sigue a partir de las intensidades de fluorescencia halladas:

$$\frac{\text{Intensidad de muestra} \times 5}{\text{Intensidad de referencia}} = \text{microgramos de clorhidrato de tiamina en la muestra.}$$

Puesto que el tiocromo se descompone gradualmente a la luz ultravioleta es aconsejable exponer la solución a la luz del fluorómetro por un espacio superior a los quince segundos la intensidad de la radiación primaria debe mantenerse en el mínimo.

## ANÁLISIS FOTOMÉTRICO DE LA VITAMINA B<sub>1</sub>

### REACTIVOS

- a) Solución de sal de Reinecke.- Solución de sal de Reinecke (reineckato amónico) G. R. al 2% en metanol G. R.
- b) Solución de referencia de tiamina.- Se disuelven en 100 ml de ácido clorhídrico al 1% 0.1 gr de clorhidrato de tiamina para Bioquímica, desecado previamente a 105° C durante 2 horas.
- c) Tampón acetato pH 4.5.- se mezclan 114 ml de ácido acético 0.2-N con 86 ml de una solución de acetato ródico 0.2.
- d) Solución de lavado.- Se diluyen hasta un litro con agua 2 ml de la solución de la sal de Reinecke.
- e) Acetona G. R.

### METODO:

El análisis fotométrico de la vitamina B<sub>1</sub> al estado de reineckato de tiamina se lleva a cabo como se indica a continuación:

10 ml de la solución que contenga alrededor de 2-5 mg de clorhidrato de tiamina en tampón acetato pH 4.5 se tratan con 5 ml de la solución de Reinecke en un vaso de precipitados de 20 ml. La mezcla se agita de la forma más acabada posible, imprimiendo al vaso un movimiento circular y se deja reposar durante media hora. Se filtra a través de un crisol de placa filtrante. El precipitado se lava sobre la misma placa de vidrio ayudando con succión suave con tres porciones de 3 ml. de la solución de lavado. Se succiona hasta desecación y se disuelve a continuación con 10 ml de acetona. Para ello el filtro se adapta, mediante una brandela de goma, sobre un receptor de filtración cuyo orificio de salida se ha hecho capilar, de tal modo que permite conducir directamente la

solución coloreada (rojiza) de acetona a un matraz aforado de 10 Ll.- La acetona se le añade al filtro en fracciones de 2 ml. Se deja filtrar completamente cada una de estas porciones antes de añadir los dos mililitros siguientes de acetona. La filtración puede acelerarse considerablemente aplicando presión (acoplando a la parte superior del filtro un tapón de goma con un orificio central a través del cual se coloca un tubo de vidrio corto que a su vez, se adapta a una pera de goma para ejercer la presión requerida).

Cuatro adiciones de acetona deben de ser suficientes para disolver completamente el reincekato de tiamina y trasladarlo, bien lavado, al matraz aforado. Se mide su extinción a 525 nm. frente a un blanco del solvente en un fotómetro adecuado.

El contenido de tiamina se conduce de una curva de calibración que se ha confeccionado midiendo, en las mismas condiciones, soluciones que contenían 1,2,3,4,5 ml de la solución de referencia de tiamina, diluidos hasta 10 ml con tampón acetato pH 4.5.

IV .  
**ESTADISTICA**

## COMPARACION:

Para la comparación de los métodos, se realizaron 10 veces la determinación de tiempo, cuyo resultado se evaluaron estadísticamente para su validación.

Antes de evaluar los resultados, cabe describir algunos parámetros estadísticos:

**Población.**- Se define una población de elementos, como la mayor colección de elementos por los cuales se tiene cierto interés en un instante particular.

**Muestra.**- Una muestra puede definirse simplemente como una parte de la población.

**Arreglo Ordenado.**- Es una lista de los valores de una población o muestra en orden de magnitud desde el valor más pequeño hasta el valor más grande.

**Medidas de Tendencia Central.**- Las medidas de tendencia central más comunes son:

La Media, La Mediana y La Moda.

**Media Aritmética.**- La media se obtiene sumando todos los valores de una población o muestra y dividiendo entre el número de valores que resultaron,

Se utiliza la siguiente fórmula:

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

$\bar{X}$  = Media Aritmética

$x_i$  = Valor típico de una variable aleatoria

$x_n$  = Último valor en una población finita o muestra de valores

$\Sigma$  = Sumatoria

n = número de valores en la muestra.

### Medidas de dispersión:

La dispersión de un conjunto de observaciones se refiere a la variedad que los valores de las observaciones exhiben.

Si todos los valores son los mismos, no existe dispersión; si no todos son los mismos, hay dispersión en los datos. La magnitud de la dispersión puede ser pequeña, cuando los valores, aunque diferentes están próximos entre sí. Si los valores están ampliamente "desparramados", la dispersión es mayor.

### Rango:

El rango es la diferencia entre el valor menor y el mayor en un conjunto de observaciones.

$$R = X_1 - X_n$$

R = Rango

$X_1$  = Valor mayor

$X_n$  = Valor menor

### Desviación Estándar:

Es la medida que nos indica la dispersión con respecto a la distribución de los valores alrededor de su media.

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

$s$  = desviación estandar

$x_i$  = valor de la población o muestra

$\bar{x}$  = media de la muestra

$n - 1$  = tamaño de la población menos uno ( grados de libertad )

#### Coefficiente de Variación:

Es la medida la cual expresa a la desviación estandar como un porcentaje de la media. su fórmula esta dada por:

$$C.V. = \frac{s}{\bar{x}} ( 100 )$$

C.V. = Coeficiente de variación

$s$  = Desviación estandar

$\bar{x}$  = Media de la muestra.

#### Distribuciones Continuas de Probabilidad.

Una función  $f(x)$  recibe el nombre de distribución de probabilidad - ( a veces llamada función de densidad ) es de la variable aleatoria  $X$ . - El área total limitada por su curva y el eje  $x$  es igual a 1, y la sub-  
rea debajo de la curva, limitada por la curva, el eje  $x$  y las perpendicu-  
lares levantadas en dos puntos cualesquiera  $a$  y  $b$ , da la probabilidad de  
que  $X$  este entre los puntos  $a$  y  $b$ .

Las distribuciones más importantes son:

Binomial, Poisson, Normal.

## REGRESION Y CORRELACIONES LINEALES SIMPLES

El análisis de regresión es útil para averiguar la forma probable de la relación entre las variables y cuando se emplea este método de análisis, el objetivo final por lo general es predecir o estimar el valor de una variable, correspondiente a un valor dado de otra variable.

Por otra parte el análisis de correlación se refiere a la medición de la intensidad de la relación entre las variables. Cuando se acumulan medidas de correlación a partir de un conjunto de datos, el interés se centra en el grado de la correlación entre las variables.

### La Recta de los Mínimos Cuadrados:

El método que por lo común se emplea para obtener la recta que se desea se conoce como método de los mínimos cuadrados y la recta resultante se llama recta de los mínimos cuadrados.

Recuérdese, del álgebra, que la ecuación general para una recta es dada por:

$$y = ax + b$$

Donde:

y = valor sobre el eje vertical

x = valor sobre el eje horizontal

b = es el punto donde la recta cruza el eje vertical

a = indica la cantidad en que la recta se eleva por cada unidad de incremento en x

A b se le da el nombre de ordenada al origen

a se le da el nombre de pendiente.



Para trazar la recta con base en la ecuación anterior se necesitan los valores numéricos de las constantes  $a$  y  $b$ . Dadas estas constantes, se pueden sustituir diversos valores de  $x$  en la ecuación y obtener los correspondientes valores de  $y$ . Los puntos resultantes  $(x_1, y_1)$ ,  $(x_2, y_2)$  y así sucesivamente pueden sustituirse en la gráfica. Puesto que dos parejas de puntos cualesquiera de esas coordenadas determinan la gráfica, pueden seleccionarse dos cualesquiera, localizarse en una gráfica y unirse para obtener los puntos correspondientes de la recta de la ecuación.

Mediante los mínimos cuadrados, de un conjunto de puntos  $(x, y)$  - obtenidos experimentalmente, podremos tratar la "mejor recta" con el siguiente criterio.

La suma de las desviaciones verticales elevadas al cuadrado de los puntos correspondientes a los datos observados respecto de la recta de los mínimos cuadrados es menor que la suma de las desviaciones verticales elevadas al cuadrado de los puntos correspondientes a los datos, respecto de cualquier otra recta.

#### COEFICIENTE DE CORRELACION LINEAL:

Es aquel parámetro que nos va a medir la intensidad de la relación lineal entre  $X$  y  $Y$ .

Se representa con el símbolo de  $(r)$ .

Puede tomar valores entre  $-1$  y  $+1$ . Si  $r$  es igual a  $1$  existe una correlación lineal perfecta entre las variables.

Si  $r$  es igual a  $-1$  indica una correlación inversa perfecta.

Si  $r$  es igual a  $0$  las dos variables no están correlacionadas.

El signo de  $r$  será siempre igual al signo de la pendiente de la recta.

Su fórmula es una aplicación de los mínimos cuadrados:

$$r = \frac{n \sum x_i y_i - (\sum x_i)(\sum y_i)}{\sqrt{(n \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2)(n \sum y_i^2 - (\sum y_i)^2)}}$$

COEFICIENTE DE CORRELACION

## ANÁLISIS DE VARIANCIAS

El análisis de variancia describe una técnica con la que se puede analizar o dividir la variación total en componentes de variación significativa.

Por ejemplo cuando se desea conocer como varía alguna característica en muestras distintas.

En cualquier caso la variación propia de la muestra se llevará variación aleatoria y parte del objetivo del análisis de variancia es determinar las diferencias entre las medias muestrales.

Las muestras aleatorias de tamaño  $n$  se seleccionan de cada una de las  $k$  poblaciones.

Se supondrá que las  $k$  poblaciones son independientes y distribuidas normalmente con medias  $\mu_1, \dots, \mu_k$  variancia común  $\sigma^2$ ; se desea obtener los métodos apropiados para probar la hipótesis.

$$H_0 = \mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_k$$

$H_1 =$  al menos dos de las medias no son iguales.

Se denotó por  $Y_{ij}$  al  $j$ -ésima observación tomada del  $i$ -ésimo tratamiento arreglado los datos como se muestra en la siguiente tabla:

k - MUESTRAS ALSEATORIAS

TRATAMIENTO			
1	2 . . . j . . . k		
Y11	Y21 . . Yj1 . . Yk1		
Y12	Y22 . . Yj2 . . Yk2		
.	.	.	.
.	.	.	.
.	.	.	.
Y1N	Y2N . . YjN . . YkN		
TOTAL			
T1	T2 . . Ti . . Tj . . Tk . . T . . .		
MEDIA			
$\bar{Y}_1$	$\bar{Y}_2 . . \bar{Y}_i . . \bar{Y}_j . . \bar{Y}_k$		$\bar{Y}$

Aquí  $T_i$  es el total de todas las observaciones en la muestra del  $i$ -ésimo tratamiento,  $\bar{Y}_i$  es la media de todas las observaciones en la muestra del  $i$ -ésimo tratamiento,  $T \dots$  es el total de todas las  $nk$  observaciones y  $\bar{Y} \dots$  es la media de todas las  $nk$  observaciones.

Cada observación puede escribirse así:

$$Y_{ij} = \mu_i + E_{ij}$$

donde  $Y_{ij}$  mide la observación de la  $j$ -ésima muestra de la media -- del tratamiento correspondiente.

El término  $E_{ij}$  representa al error aleatorio.

La hipótesis nula de que las  $k$  medias sean, iguales puede reemplazarse ahora por la hipótesis equivalentes.

$$H_0 : \alpha_1 = \alpha_2 = \dots = \alpha_k = 0$$

$H_1$ : al menos 1 de los efectos  $\alpha_i$ 's no es igual al cero.

La prueba se basará en una comparación de dos estimaciones independientes de la variancia poblacional común  $\sigma^2$ . Estas estimaciones se obtendrán separando la variabilidad total de los datos en dos componentes

#### IDENTIDAD DE LA SUMA DE CUADRADOS

$$\sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^n (Y_{ij} - \bar{Y}_{..})^2 = n \sum_{i=1}^k (\bar{Y}_i - \bar{Y}_{..})^2 + \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^n (Y_{ij} - \bar{Y}_i)^2$$

Sera conveniente señalar los términos de la identidad de la suma de cuadrados mediante la siguiente notación.

$$SCT = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^n (Y_{ij} - \bar{Y}_{..})^2 = \text{suma de cuadrados total}$$

$$SCA = n \sum_{i=1}^k (\bar{Y}_i - \bar{Y}_{..})^2 = \text{suma de cuadrados de tratamientos.}$$

$$SCE = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^n (Y_{ij} - \bar{Y}_i)^2 = \text{suma de cuadrados del error.}$$

Así hay que comparar la medida apropiada de la variación entre tratamientos con la variación propia del tratamiento con objeto de detectar las diferencias significativas en las observaciones, debidas a los efectos del tratamiento.

$$E(SCA) = (k-1)\sigma^2 + n \sum_{i=1}^k \alpha_i^2$$

Una estimación de  $\sigma^2$  basada en  $k-1$  grados de libertad, esta dada por el cuadrado medio del tratamiento.

$$s_1^2 = \frac{SCA}{k-1}$$

Si  $H_0$  es verdadera y cada valor  $\alpha_i$  se hace igual a cero, se ve que:

$$E\left(\frac{SCA}{k-1}\right) = \sigma^2$$

Y  $s_1^2$  es una estimación insesgada de  $\sigma^2$ . pero si  $H_1$  es verdadera, se tiene

$$E\left(\frac{SCA}{k-1}\right) = \sigma^2 + \frac{n \sum_{i=1}^k \alpha_i^2}{k-1}$$

Una segunda e independiente estimación de  $\sigma^2$  basada en  $k(n-1)$  grados de libertad, es la fórmula

$$s^2 = \frac{SCE}{k(n-1)}$$

La estimación de  $s^2$  es insesgada, sea verdadera o falsa la hipótesis nula.

La identidad de la suma de cuadrados no solo ha particionado en la variabilidad total de los datos, sino también en número total de grados de libertad:

$$nk - 1 = k - 1 + k(n - 1)$$

Cuando  $H_0$  es verdadera, la razón.

$$f = \frac{E_1^2}{R^2}$$

Es un valor de la variable aleatoria F que tiene una distribución F con  $k-1$  y  $k(n-1)$  grados de libertad. Como  $s_1^2$  sobrestima a  $s^2$  cuando  $H_0$  es falsa, se tiene una prueba con la región crítica totalmente en el extremo derecho de la distribución. La hipótesis nula  $H_0$  se rechaza al nivel de significación  $\alpha$  cuando

$$f > f_{\alpha} [k-1, k(n-1)]$$

En la práctica calculamos primero SCT y SCA y después obtenemos SCE = SCT - SCA.

Las fórmulas de mayor uso están dadas por:

$$SCT = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} Y_{ij}^2 - \frac{T^2}{nk}$$

Los datos se agrupan en una tabla donde se resumen los cálculos de un problema de análisis de variancia.

Fuente de variación	suma de cuadrados	grados de libertad	cuadrado medio	f calculada
Tratamiento	SCA	$k-1$	$s_1^2 = \frac{SCA}{k-1}$	$\frac{E_1^2}{s^2}$
Error	SCE	$k(k-1)$	$s^2 = \frac{SCE}{k(n-1)}$	
Total	SCT	$nk-1$		

## PRUEBA PARA LA IGUALDAD DE VARIAS VARIANCIAS

La prueba más común llamada prueba de Bartlett, se basa en una estadística cuya distribución muestral se aproxima bastante mediante la distribución ji cuadrada cuando las  $k$  muestras aleatorias se toman de poblaciones normales independientes.

La fórmula:

$$S_p^2 = \frac{\sum_{j=1}^k (n_j - 1) s_j^2}{n-k}$$

Otro factor:

$$b = 2.3026 \frac{q}{h}$$

donde

$$q = (n - k) \log S_p^2 - \sum_{j=1}^k (n_j - 1) \log S_j^2$$

y

$$h = 1 + \frac{1}{3(k-1)} \left( \sum_{j=1}^k \frac{1}{n_j-1} - \frac{1}{n-k} \right)$$

Es un valor de la variable aleatoria  $B$  que tiene aproximadamente la distribución ji cuadrada con  $k-1$  grados de libertad.

La cantidad que es grande cuando las variancias muestrales difieren mucho y es igual a cero cuando todas son iguales. Por tanto, el nivel de significancia  $\alpha$  de  $H_0$  se rechaza solo cuando  $b > \chi_{\alpha}^2$ .



V

RESULTADOS EXPERIMENTALES

LECTURAS POR METODOS DE REINECKATO

Utilizando una base estandar de 3 µgr de tiamina.

Microgramos obtenidos en las 10 observaciones:

	$Y_1$	$Y_1^2$
1.-	3.100	9.610
2.-	3.163	9.941
3.-	2.998	8.988
4.-	3.000	9.000
5.-	3.130	9.796
6.-	3.000	9.000
7.-	3.210	10.304
8.-	3.100	9.610
9.-	3.133	9.815
10.-	<u>3.000</u>	<u>9.000</u>
	30.824	95.066

$$T_1 = 30.824$$

$$T_1^2 = 950.118$$

OBTENIENDO LA MEDIA:

$$\bar{x} = \frac{30.824}{10} = 3.0824$$

OBTENIENDO LA VARIANCIA:

$$S^2 = \frac{\sum_{j=1}^n (Y_{1j} - \bar{Y}_1)^2}{n - 1}$$

$$S^2 = 0.0060$$

OBTENIENDO LA DESVIACION ESTANDAR

$$S = 0.0776061$$

## LECTURAS POR EL METODO FLUOROMETRICO

Utilizando una base estandar de 3  $\mu$ gr de Tiamina

Microgramos obtenidos en las 10 observaciones

	$Y_{i2}$	$Y_{i2}^2$
1.-	3.000	9.000
2.-	2.987	8.922
3.-	2.993	8.958
4.-	3.010	9.0601
5.-	3.100	9.610
6.-	2.993	8.958
7.-	2.986	8.916
8.-	3.000	9.000
9.-	3.021	9.126
10.-	<u>3.000</u>	<u>9.000</u>
	= 30.09	= 90.551

$$T_2 = 30.09$$

$$T_2^2 = 905.4081$$

## CALCULO DE LA MEDIA

$$\bar{X} = \frac{30.09}{10}$$

$$\bar{X} = 3.009$$

## CALCULO DE LA DESVIACION ESTANDAR

$$S = 0.03365$$

## CALCULO DE LA VARIANCIA

$$S^2 = 0.0011$$

LECTURAS POR VALORACION ESPECTROFOTOMETRICA A pH 2

Utilizando una base estandar de 3 µgr de Tiamina.

Microgramos obtenidos en las 10 observaciones:

	$Y_{i_3}$	$Y_{i_3}^2$
1.-	3.170	10.048
2.-	3.165	10.017
3.-	3.000	9.000
4.-	3.123	9.753
5.-	3.020	9.1204
6.-	3.120	9.734
7.-	3.010	9.060
8.-	3.000	9.000
9.-	3.111	9.678
10.-	<u>3.010</u>	<u>9.060</u>
	= 30.729	= 94.472

$$T_3 = 30.729$$

$$T_3^2 = 944.271$$

ESTA TESIS  
 NO DEBE  
 SER  
 REPRODUCIDA  
 SIN  
 LA  
 AUTORIZACION  
 DEL  
 AUTOR

CALCULO DE LA MEDIA

$$\bar{x}_3 = \frac{30.729}{10}$$

$$\bar{x}_3 = 3.0729$$

CALCULO DE LA DESVIACION ESTANDAR

$$s_3 = 0.0710$$

CALCULO DE LA VARIANCIA

$$s_3^2 = 0.0050$$

VI

ESTUDIO ESTADISTICO

## CALCULOS ESTADISTICOS

### I.- ANALISIS DE IGUALDAD DE MEDIAS:

a) Calculamos la suma de cuadrados totales:

$$SCT = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} Y_{ij}^2 - \frac{T^2}{nk}$$

Donde:

$$k = 3$$

$$n = 10$$

k = número de tratamientos

n = número de muestras.

$$Y_{i1}^2 = 95.066$$

$$Y_{i2}^2 = 90.551$$

$$Y_{i3}^2 = 94.472$$

$$Y_{i1}^2 + Y_{i2}^2 + Y_{i3}^2 = 280.089$$

Dado que:

$$T = T_1 + T_2 + T_3$$

y así:

$$T_1 = 30.824$$

$$T_2 = 30.09$$

$$T_3 = 30.729$$

$$T = 30.824 + 30.09 + 30.729$$

$$T = 91.643 \quad T^2 = 8398.4394$$

APLICANDO LA FORMULA:

$$SCT = 280.089 - \frac{8398.439}{10(3)}$$

$$\underline{SCT = 0.1417}$$

SUMA DE CUADRADOS TOTALES

b) Cálculo de la suma de cuadrados de tratamiento:

$$SCT_T = SCA = \frac{T_1^2 + T_2^2 + T_3^2}{10} - \left( \frac{\pi^2}{30} \right)$$

$$T_1^2 = 950.118$$

$$T_2^2 = 905.402$$

$$T_3^2 = 944.271$$

$$\hline T^2 = 2799.7985$$

Utilizando todos los decimales;

$$SCA = \frac{2799.7985}{10} - \left( \frac{8398.439}{30} \right)$$

$$279.97977 - 279.94797$$

$$SCA = 0.0319$$

Cálculo de S<sub>ce</sub>

$$SCE = SCT - SCA$$

$$SCE = 0.14101 - 0.031733$$

$$SCE = 0.1098$$

c) Cálculo del cuadrado medio (  $S_1^2$  )

$$S_1^2 = \frac{SCA}{k-1} ; \frac{0.031733}{2} = 0.01586$$

$$S^2 = \frac{SCE}{k(n-1)} ; \frac{0.1092}{27} = 4.044 \times 10^{-3}$$

d) Cálculo de F ( estadístico de prueba )

$$\frac{S_1^2}{S^2} = \frac{0.015861}{4.044 \times 10^{-3}} = 3.92$$

Dado que  $F = 3.92$  es menor que  $F_{.01}(2,27)$  no se rechaza  $H_0$ .

Por lo cual se concluye que no hay variación entre las medias.

( El valor de  $F$  se calculo de las tablas de Fisher correspondiente al percentil 99 ).

TABLA CON LOS DATOS

F V	S.C	gl	n.c	F	F (2,27)
trat	0.0819	2	0.01595	3.92	5.53
Error	0.1098	27	$4.066 \times 10^{-3}$		1%
Total	0.14101	29			



PRUEBA DEL PARTILLO

Para la igualdad de variancias

Aplicando las fórmulas

$$S_p^2 = \frac{0.04543 + 0.01019 + 0.0542}{30 - 3} = 0.00407$$

Siendo:

$$b = 2.3026 \frac{q}{h}$$

Donde:

$$q = (n-k) \log S_p^2 - \sum_{j=1}^k (n_j - 1) \log S_j^2$$

$$q = 27 \log (0.00407) - \sum_{j=1}^3 (9) \log (S_j^2)$$

$$= 2.61954$$

$$h = 1 + \frac{1}{3(k-1)} \left( \sum_{j=1}^k \frac{1}{n_j - 1} - \frac{1}{n-k} \right)$$

$$h = 1 + \frac{1}{3(9)} \left( \frac{1}{9} + \frac{1}{9} + \frac{1}{9} - \frac{1}{27} \right) = 1 + \frac{1}{27} \left( \frac{2}{27} - \frac{1}{27} \right)$$

$$h = 1.01097$$

De donde:

$$b = \frac{2.61954}{1.01097} = 5.96623$$

Comparación con el valor de:

$$\chi^2_{(2)} = 5.991$$

Así:

$$b < 5.991$$

Siendo  $b$  menor que  $X^2$

No se rechaza  $H_0$

Por lo cual NO hay una diferencia significativa cualquier método es igual.

VII

CONCLUSIONES

## CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos y basándonos en los conceptos de precisión y exactitud que a continuación se indican:

**EXACTITUD.**- Es la diferencia que hay entre los resultados obtenidos y la verdadera respuesta (estandar).

Podemos concluir por el análisis de variancia que los tres métodos utilizados para la valoración de la tiamina son igualmente exactos ya que en el estudio estadístico no se encontró diferencia dado que  $F=3.92$

Lo mismo fue obtenido al aplicar la prueba de Bartlett con respecto a la precisión.

**PRECISION.**- Es la medida del grado de acuerdo entre réplicas de análisis.

**REPLICAS.**- Son las múltiples corridas de la misma prueba en ó sobre la misma muestra.

Al aplicar el método no se encontró diferencia significativa entre los 3 procesos así podemos indicar que:

Se ha demostrado que pueden ser empleados por igual dichos métodos tanto el fluorométrico colorimétrico y espectrofotométrico colorimétrico.

Ahora bien el análisis podrá tener la opción de uno u otro basándose en el objeto para que lo quiera ya que si no es un estudio muy preciso podrá usar cualquiera de los tres, además de otros factores que se pudieran tomar en cuenta para el análisis como son: tiempo, costo, etc. Estos serían otros factores para la elección de alguno de ellos.

Demostando así las características de estos métodos bien podríamos aplicar este análisis estadístico, para comparar valoraciones por varios métodos, de una sustancia de características similares a la timina.

Aunado a estos los factores tiempo, costo etc. dando así al químico una base para justificar su uso.

## BIBLIOGRAFIA

A.O.A.C

Infrared and ultraviolet  
Spectra of some compounds  
of Pharmaceutical Interest  
Washington D.C.  
1972.

Connors Kenneth A.;  
Curso de Análisis Farmacéutico  
(Ensayo del Medicamento);  
España;  
Edit. Reverte S.A.;  
1981.

Goodman Gilman Alfred  
Goodman Louis S.;  
Las bases Farmacológicas de la Terapéutica;  
México  
Edit. Panamericana;  
1982.

Grant Eugene L., Leavenworth S. Richard;  
Control Estadístico de Calidad;  
México;  
Cecsa  
1977.

Neter John and Nasserman William;  
Applied Linear Statistical Models;  
Homewood Illinois;  
Edit Richard D. Irwin, Ing;  
1974.

Soria Nicastro Oscar;  
Como investigar ( guía práctica para estudiantes );  
México;  
U.A.G.  
1984.

SSA DIRECCION DE CONTROL DE MEDICAMENTOS;  
Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos;  
Tercera Edición;  
México;  
1963.

Stromecker Rolf;  
Heinz M. Henning;  
Análisis de vitaminas  
(métodos comprobados);  
Madrid;  
Editorial Paz Montalvo;  
1967.

Daniel, Richard L.  
Meyers Raymond F.;  
Probabilidad y Estadística para ingenieros;  
Editorial Interamericana.

Wayne W. Daniel;  
Bioestadística  
(base para el análisis de las ciencias de la salud)  
México;  
Limusa  
1979.

# INSTANESIS

TESIS • INFORMES • MEMORIAS  
COPIAS • REDUCCIONES • EN-  
CUADERNADO • IMPRESIONES •  
COPI-OFFSET • TRANSCRIPCIO-  
NES IBM EN LINO • DIBUJO DE  
GRAFICAS, PLANOS Y ORGANI-  
GRAMAS • HELIOGRAFICAS •  
REVELADO KODAK.

ENRIQUE G. MARTINEZ No. 30  
(ANTES PARROQUIA)  
TEL. 13-99-23 GUADALAJARA