

FUNDAMENTOS TEÓRICO – PRÁCTICOS PARA AUXILIARES DE LABORATORIO

Física – Química – Matemática – Estadística – Seguridad

Segunda edición

Editor

Alfredo Rigalli

Autores

Balmaceda, Gabriel

Comaglia, María Virginia

Ferrer, Alejo

Lehn, Santiago Alberto

Radenti, Juana María

Véscovo, María Belén

Colaboradores

Angeloni, Micaela

Ansaldi, Mateo

Badín Julieta

Bazán, Marianela

Chulibert, María Eugenia

Coletti, Dana

Dos Santos, Paulo

Fernandez Vignaduzzi, Stefania

Grenón, Hernán

Henrich, Leandro Martín

Izaguirre, Camila

Manzano, Brenda

Neira, Melina

Poggiani, Agustina

X, Ariana

Yassogna, Joel



Laboratorio de Biología Ósea
Facultad de Ciencias Médicas
Universidad Nacional de Rosario

2018

FUNDAMENTOS TEÓRICO – PRÁCTICOS PARA AUXILIARES DE LABORATORIO

Física – Química – Matemática – Estadística – Seguridad

Editor

Alfredo Rigalli

Autores

Balmaceda, Gabriel
Cornaglia, María Virginia
Ferrer, Alejo
Lehn, Santiago Alberto
Radenti, Juana María
Vescovo, María Belén

Colaboradores

Angeloni, Micaela
Badín Julieta
Bazán, Marianela
Chulibert, María Eugenia
Coletti, Dana
Dos Santos, Paulo
Fernandez Vignaduzzi, Stefania
Grenón, Hernán
Henrich, Leandro Martín
Izaguirre, Camila
Manzano, Brenda
Neira, Melina
Poggiani, Agustina
X, Ariana
Yassogna, Joel

2018

Departamento de Docencia
Laboratorio de Biología Ósea
Facultad de Ciencias Médicas
Universidad Nacional de Rosario



Fundamentos teórico-prácticos para auxiliares de laboratorio : física, química, matemática, estadística, seguridad / Alfredo Rigalli ... [et al.]. - 1a edición para el alumno - Rosario : Alfredo Rigalli, 2016.

Libro digital, PDF

Archivo Digital: descarga y online

ISBN 978-987-42-3143-7

1. Capacitación para la Investigación. I. Rigalli, Alfredo

CDD 001.42

ISBN 978-987-42-3143-7

PRÓLOGO PRIMER EDICIÓN

El conocimiento se crea de dos maneras básicas: por pensamiento sobre conocimiento existente y por observación y experimentación sobre fenómenos naturales. El Laboratorio de Biología Ósea ,el cual dirijo desde hace aproximadamente una década, viene creando conocimiento en diversos campos de la biología y especialmente en el metabolismo óseo y mineral desde aproximadamente 5 décadas. Iniciado por el entusiasmo del Dr. Rodolfo Puche, su primer director y mi mentor, no ha dejado de funcionar a lo largo de los años. La participación de profesionales de diferentes áreas ha contribuido a su crecimiento y la formación de recursos humanos de alta calificación ha sido siempre uno de sus objetivos.

Sin embargo no se debe olvidar y por lo contrario resaltar la participación de estudiantes de grado de diversas carreras. Estos colaboradores, muchas veces desde el anonimato fueron y son pilares fundamentales del desarrollo de la parte experimental, cumpliendo tareas rutinarias, sin un sólido fundamento teórico como para comprender cabalmente su valiosa colaboración.

Luego de 30 años de trabajo en este laboratorio, acompañado por decenas de alumnos que a lo largo del tiempo se han convertidos en propietarios silenciosos de parte de mis conocimientos, decidí organizar un curso para impartir a los colaboradores fundamentos físico-químico-estadístico-matemáticos para que su participación sea mejor comprendida. Así, en el año 2015 se inició un largo curso de dictado quincenal, casi de madrugada para que no interfiriera con las actividades académicas de docentes y alumnos. Y así fue que comenzamos la primer clase una madrugada de primavera de ese año, con los primeros brotes de las plantas, luego de un frío invierno. Como esos brotes, que se fueron desarrollando, los alumnos fueron creciendo, se transformaron en ramas y hojas y dieron flores para la nueva primavera. Como lo manda la biología esa flor se transformó en fruto. Esos colaboradores, que al principio vinieron en búsqueda de un conocimiento han ganado con el esfuerzo y la perseverancia, acompañarme en este pequeño emprendimiento como autores y colaboradores. Como buenos frutos llevan en su interior una semilla de conocimiento que transferirán a futuros estudiantes que trabajen en este u otro laboratorio.

Trabajar enaltece, da objetivos a la vida, pero hacerlo comprendiendo exactamente qué diente es cada uno del gran engranaje de un laboratorio, entusiasmo mucho más. Espero que este libro sea una buena puerta para que, quienes se inician en la investigación lo hagan comprendiendo los fundamentos de sus trabajos y despierte un espíritu crítico y responsable.

Dr. Alfredo Rigalli

EDITOR

Alfredo Rigalli.

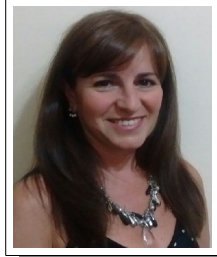
Bioquímico y Doctor en Bioquímica. Director del Laboratorio de Biología Ósea, director del Doctorado en Ciencias Biomédicas y docente de Química Biológica en la Facultad de Medicina de la UNR. Editor regional de Journal Fluoride para América Latina y miembro de la International Society for Fluoride Research. Investigador Independiente del CONICET y del Consejo de Investigaciones de la UNR. Área de Investigación: efectos biológicos y ambientales del fluoruro.



AUTORES

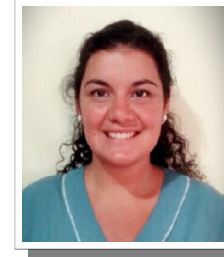
Radenti, Juana María.

Odontóloga. Docente de la Cátedra de Farmacología de la Facultad de Odontología UNR. Estudiante del Doctorado en Odontología. Dictante de cursos de posgrado. Campo de investigación: estudio y evaluación del efecto desmineralizante de las bebidas no alcohólicas sobre estructuras dentales calcificadas.



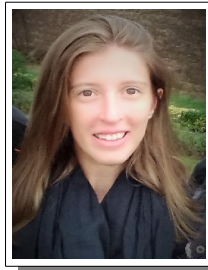
Cornaglia, Maria Virginia.

Odontóloga y Docente de la Cátedra de Farmacología de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Rosario. Estudiante del Doctorado en Odontología. Dictante de cursos de posgrado. Experticia en estudios sobre compuestos fluorados en pastas dentales.



María Belén Vescovo.

Estudiante de Medicina en la Facultad de Ciencias Médicas de la UNR. Becaria del Laboratorio de Biología Ósea. Becaria del Consejo Interuniversitario Nacional 2017-2018. Temas de investigación: biorremediación de aguas con alto contenido de fluoruro y mapeo del contenido de arsénico y fluoruro en aguas de consumo de diferentes áreas de la república Argentina.



Santiago Alberto Lehn.

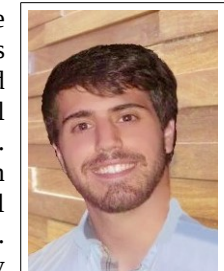
Estudiante de Medicina. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Rosario. Promotor de la Salud. Director del Comité Científico de la Asociación Científica Rosarina de Estudiantes de Medicina. Tema de investigación: interacción entre el calcio y las proteínas de la leche fermentada con kéfir.



Gabriel Balmaceda. Estudiante de Medicina, becario del Laboratorio de Biología Ósea de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNR. Miembro de la Asociación Científica Rosarina de Estudiantes de Medicina y de su Comité Científico. Miembro del Comité Científico de la Federación Argentina Científica de Estudiantes de la Salud y editor Asociado de la Revista de dicha federación. Tema de investigación: variación de la concentración de fluoruro en aguas profundas de la República Argentina.



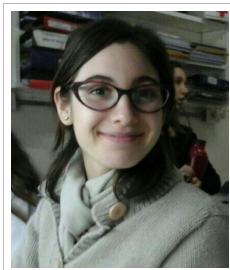
Alejo Ferrer. Estudiante de Medicina, Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Rosario. Becario del Laboratorio de Biología Ósea. Docente del curso capacitación en el uso de bases de datos para el estudio de la ciencias Biomédicas. Área de investigación: separación y efectos de las proteínas de la leche tratada con Kéfir.



COLABORADORES

María Eugenia Chulibert

Licenciada en Nutrición, egresada de la Facultad de Química, Universidad del Centro Educativo Latinoamericano. Miembro del Laboratorio de Biología Ósea, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario. Tema de investigación: desarrollo de una bebida probiótica enriquecida en calcio.



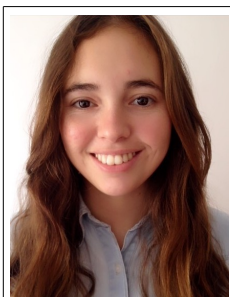
Brenda Manzano

Estudiante de Ingeniería Eléctrica en la Facultad de Ciencias Exactas, Ingeniería y Agrimensura, y Medicina en la Facultad de Ciencias Médicas de la UNR. Auxiliar en el laboratorio de Biología Ósea. Temas de investigación: Evaluación del efecto de fracciones proteicas de leche tratada con kéfir sobre la desmineralización del esmalte dental.



Camila Izaguirre

Estudiante de medicina Facultad de Ciencias Médicas de la UNR. Participación en proyectos de investigación del Laboratorio de Biología Ósea. Tema de investigación distribución de la concentración de arsénico y fluoruro en Santa Fe y la Pampa.



Melina Neira

Estudiante de Medicina en la Facultad de Ciencias Médicas de la UNR. Participación en proyectos de investigación del Laboratorio de Biología Ósea. Tema de investigación: Estudio epidemiológico sobre arsénico, fluoruro y otros componentes en aguas de consumo sobre la homeostasis de la glucosa.



Leandro Martín Henrich

Estudiante de Medicina en Facultad de Ciencias Médicas, UNR. Promotor de la Salud. Tutor Científico y primer vocal de la Federación Argentina Científica de Estudiantes de la Salud. Delegado por la Asociación Científica Rosarina de Estudiantes de Medicina en la FACES. Tema de investigación: detección del peso molecular de péptidos resultantes del proceso de fermentación de leche por kéfir. Pasatiempo: elaboración de cerveza artesanal.



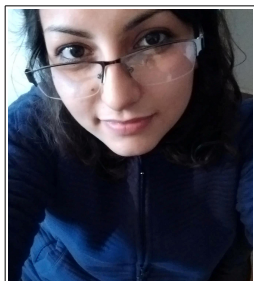
Stefania Fernandez Vignaduzzi

Estudiante de Medicina en la Facultad de Ciencias Médicas de la UNR. Ayudante de investigación en el Laboratorio de Biología Ósea 2017-2018. Temas de investigación: biorremediación de aguas con alto contenido de fluoruro y mapeo del contenido de arsénico y fluoruro en aguas de consumo de diferentes áreas de la república Argentina.



Ariana X

Estudiante de Medicina en la Facultad de Ciencias Médicas de la UNR. Ayudante en el Laboratorio de Biología Ósea. Participa en la determinación de la alcalinidad y dureza total de las aguas de consumo de diferentes partes de la Argentina.



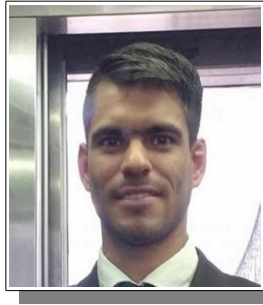
Julieta Badín

Estudiante de medicina en la Facultad de Ciencias Médicas de la UNR. Participación en proyecto de investigación en el laboratorio de biología ósea. Tema de investigación: Análisis multivariado de los componentes del agua de consumo y su relación con la fluorosis y el hidroarsenismo crónico regional endémico en la Argentina

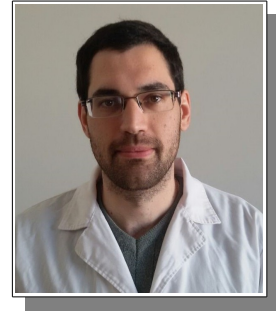


Joel Yassogna

Estudiante de profesorado de tercer ciclo de la educación general básica y de la educación polimodal en biología del ISP N°16. Colaborador en el Laboratorio de Biología Ósea en mediciones de iones en aguas de consumo de diferentes regiones de la República Argentina.

**Hernán Grenón**

Estudiante de Medicina y Auxiliar de laboratorio en el Laboratorio de Biología Ósea de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNR. Temas de investigación: Determinación concentración de Nitrógeno en aguas de consumo de diferentes áreas de la república Argentina, procesamiento de imágenes digitales y estudio por imágenes de deformidad huesos rata.

**Micaela Angeloni**

Estudiante de Medicina en la Facultad de Ciencias Médicas de la UNR. Ayudante de investigación en el Laboratorio de Biología Ósea 2017-2018. Temas de investigación: relación entre la captación de glucosa por tejidos independientes de insulina y efecto de la administración de fluoruro sobre el aprendizaje y la memoria en ratas.

**Marianela Bazán**

Estudiante de medicina de la Facultad de Ciencias Médicas. Ayudante en laboratorio de biología ósea. Tema de investigación: relación entre la captación de glucosa por tejidos independientes de insulina y el aprendizaje en ratas tratadas con fluoruro. Trabajos: medición de insulina por RIA - medición de glucemia- trabajo con animales que abarcan test de nado, extracción sanguínea y cirugía.

**Agustina Poggiani**

Estudiante de Medicina en la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Rosario. Ayudante estudiante de la cátedra de Fisiología Humana. Participación en proyectos de investigación del Laboratorio de Biología Ósea. Temas de investigación: Medidas de sustancias en suelos y análisis multivariado de los componentes del agua de consumo y su relación con la Fluorosis y el Hidroarcanicismo Crónico Regional Endémico

**Dana Coletti**

Estudiante de Medicina en la Facultad de Ciencias Médicas de la UNR. Becaria del Laboratorio de Biología Osea. Becaria del programa de formación de Recursos humanos en investigación de la FCM. Tema de investigación: efectos de las soluciones ácidas en el cemento dental.

**Paulo Dos Santos.**

Estudiante de Medicina en la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Rosario. Ayudante estudiante de la cátedra de Fisiología Humana. Miembro del Laboratorio de Biología Ósea. Tema de investigación: Análisis multivariado de los componentes del agua de consumo y su relación con la Fluorosis y el Hidroarcanicismo Crónico Regional Endémico.



1. TABLA DE CONTENIDOS

1.TABLA DE CONTENIDOS.....	7
2.FUNDAMENTOS MATEMÁTICOS.....	1
2.1.Magnitudes.....	1
2.2.unidad.....	1
2.3.magnitud adimensional.....	1
2.4.magnitudes dimensionales	2
2.5.Cambio de unidades.....	2
2.6.Multiplicación y división	5
3.MEDICIONES Y ERRORES.....	7
3.1.Medición.....	7
3.1.1.Tipos de mediciones.....	7
3.2.Errores.....	7
3.2.1.Tipos de errores.....	8
3.3.Control de calidad.....	9
3.3.1.Coeficiente de variación.....	9
3.3.2.Unidades de desvío estándar.....	10
3.4.Errores por exceso y defecto.....	11
3.5.Propagación de errores.....	13
3.6.Detección de equivocaciones.....	17
4.ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA BÁSICA.....	20
4.1.1.Media.....	20
4.1.2.Mediana.....	21
4.1.3.Moda o Modo.....	21
4.1.4.Cuartilos.....	21
4.1.5.Percentilos.....	21
4.2.Medidas de dispersión.....	21
4.2.1.Rango.....	21
4.2.2.Desvío Estándar.....	21
4.2.3.Variancia.....	21
4.3.Gráficos y tablas.....	22
4.3.1.Tabla de frecuencia.....	22
4.3.2.Histograma.....	23
4.3.3.Box Plot.....	23
5.ESTADISTICA INFERENCIAL.....	25
5.1.Tipos de datos.....	25
5.1.1.Según su característica.....	25
5.1.2.Según su naturaleza.....	26
5.2.Pruebas de normalidad.....	27
5.3.Pruebas de homogeneidad de variancias.....	28
5.4.Comparación de dos muestras de datos.....	31
5.4.1.Comparación medias dos muestras (normales) independientes	31
5.4.2.Comparación medias dos muestras (normales) dependientes.....	31
5.4.3.Comparación medianas dos muestras (no normales) independientes.....	31
5.4.4.Comparación medianas dos muestras (no normales) dependientes.....	31
5.5.Comparación de más de dos muestras de datos.....	32
5.5.1.ANOVA a un criterio con aov y LSD.test.....	34
5.6.Tablas de contingencia.....	35
5.6.1.Test Chi cuadrado.....	36
5.7. Test de correlación.....	37
6.CURVA DE CALIBRACIÓN.....	38

6.1.Pasos generales para la obtención de una curva de calibración.....	39
6.2.Interpolación.....	45
6.3.Extrapolación.....	45
6.4.Límite de detección.....	47
6.5.Otras herramienta para obtener de la ecuación de una curva de calibración.....	48
6.5.1.Obtención de recta de regresión con lm.....	48
6.5.2.Obtención de recta de regresión con lsfit.....	49
7.SOLUCIONES.....	50
7.1.Solución.....	50
7.2.Tipos de solutos.....	50
7.3.Peso molecular.....	51
7.4.Cantidad de soluto.....	51
7.5.Concentración.....	52
7.5.1.% P/V o g %.....	52
7.5.2.% P/P.....	52
7.5.3.Molaridad.....	52
7.5.4.Normalidad.....	52
7.5.5.ppm.....	53
7.6.Dilución.....	53
7.7.Fraccionamiento de soluciones.....	53
7.8.Preparación de una solución estándar a partir de patrón primario.....	54
7.9.Preparación de soluciones a partir de drogas impuras.....	56
8.INSTRUMENTAL.....	59
8.1.Micropipetas.....	59
8.2.Balanzas.....	61
8.3.Elección de un instrumento de medición.....	62
8.3.1.Elección de micropipetas.....	62
8.3.2.Elección de balanza.....	63
8.4.Centrífugas.....	64
8.4.1.Calculo de la fuerza centrífuga.....	64
8.4.2.Tipos de centrífugas.....	65
8.4.3.Precauciones y modo de uso.....	65
8.5.Centrífugas disponibles en el laboratorio.....	65
9.PRESENTACIÓN DE RESULTADOS.....	67
10.ESCRITURA DE UN TRABAJO REALIZADO.....	71
11.PUESTA A PUNTO DE UNA TÉCNICA DE MEDICIÓN.....	73
11.1.Escalado de una técnica de medición.....	74
11.1.1.Problema 1: equipamiento.....	75
11.1.2.Problema 2: errores y su propagación.....	75
12.ESPECTROSCOPIÍA.....	78
12.1.Fotometría de llama.....	79
12.1.1.Monocromador	79
12.1.2.Constante de Planck y energía.....	80
12.1.3.Testigo y diluciones para medir sodio.....	80
12.2.Espectrofotometría.....	82
12.2.1.Determinación de fosfato en agua.....	82
13.VOLUMETRÍA.....	85
13.1.1.Determinación de cloruro en agua.....	85
13.2.Determinacion de carbonato y bicarbonato.....	87
13.2.1.Fundamentos de la determinación.....	87
13.2.2.Procedimiento.....	87
13.2.3.Como calcular las concentraciones.....	89

14.GRAVIMETRÍA.....	91
14.1.1.Medición de solidos solubles totales en agua.....	91
14.2.Medidas de sustancias en suelos.....	91
14.2.1.Preparación de la muestra.....	92
14.2.2.Medida de humedad.....	92
14.2.3.Sólidos volátiles.....	93
14.2.4.Materia orgánica.....	93
15.CONDUCTIMETRÍA.....	95
15.1.Medida de la conductividad eléctrica del agua.....	95
15.2.Conductividad eléctrica en suelos.....	96
16.POTENCIOMETRÍA.....	97
16.1.Medida de pH.....	97
16.1.1.Medición de pH en agua.....	97
17.EXPERIMENTACIÓN CON ANIMALES.....	99
17.1.Medida del metabolismo glucídico, aprendizaje y memoria in vivo.....	99
17.1.1.Técnicas que se llevaron a cabo en este trabajo:.....	99
17.2.Radioactividad:.....	103
18.INDICE ALFABÉTICO.....	104

2. FUNDAMENTOS MATEMÁTICOS

2.1. Magnitudes

La expresión de un resultado, la lectura de un instrumento o la elección de un dispositivo de lectura siempre involucra enfrentarnos a un número que habitualmente tiene unidades. Siempre en el laboratorio se enfrentará a magnitudes, es decir a propiedades que debe medir.

Las magnitudes las podemos clasificar en primer lugar en **cualitativas y cuantitativas**

Magnitudes cualitativas: tiene un valor categórico. Pueden o no tener número y unidades.

Ejemplo

El color de la solución al realizar una medición de glucosa. Es conocido con la técnica actual que si no hay glucosa la solución permanece incolora, por lo contrario si hay glucosa la solución toma una coloración rosada. Así, podríamos clasificar a las soluciones como: incolora - coloreado.

Una rata según su edad podríamos clasificarla en: joven - adulta.

Una muestra según su posibilidad de representar fielmente a una población podríamos clasificarla como: representativa - no representativa

Magnitudes cuantitativas: tienen un número que se asocia a una escala.

Ej: 2 g de NaCl, 3 ml de agua destilada, 0,3 moles de glucosa, pH = 7,1

Por otra parte las magnitudes se pueden clasificar en **dimensionales y adimensionales**

Unidades fundamentales y derivadas: las unidades derivadas son parte del sistema internacional de unidades y se derivan de las 7 unidades fundamentales, que son:

unidad de longitud: metro (m)

unidad de masa: kilogramo (kg)

unidad de tiempo: segundo (s)

corriente eléctrica: amperio (a)

temperatura: kelvin (k)

cantidad de sustancia: mol (mol)

intensidad luminosa: candela (cd)

de estas unidades básicas es posible obtener cualquier otra unidad de medida.

2.2. unidad

una unidad es una cantidad estandarizada de una determinada magnitud física, definida y aceptada por ley.

2.3. magnitud adimensional

una magnitud adimensional o magnitud de dimensión uno. Es una cantidad sin una dimensión física conocida, siendo por lo tanto un número puro que permite describir una característica física sin dimensión ni unidad de expresión explícita y que como tal siempre tiene una dimensión de 1, lo que equivale a decir que no tiene unidades.

Las magnitudes adimensionales son aquellas que solo tienen un número y no poseen unidades.

Ej: pH = 3. Si bien no tiene unidad su valor está indicando una relación con respecto a valores de pH de otras soluciones. Una solución de pH=3 es más ácida que cualquier otra solución que tenga pH>3.

FUNDAMENTOS MATEMÁTICOS

Otras magnitudes son adimensionales pero se les asigna arbitrariamente una unidad. No son comunes, pero puede encontrarlas en su trabajo.

Ej: la intensidad de un sonido es 30 dB (la unidad decibel no surge de ninguna otra unidad).

2.4. magnitudes dimensionales

Se miden en unidades conocidas que pertenecen al sistema internacional de unidad, como por ejemplo: longitud, masa, cantidad de sustancia, intensidad luminosa, etc.

Magnitudes dimensionales: tienen un número y una unidad

Ej: 3 g de glucosa, 0,5 ul de reactivo I, etc.

Un resumen y ejemplos adicionales

Magnitudes	
Cuantitativas	Cualitativas
Dimensionales	Adimensionales
3 mg de NaCl	Macho - hembra
10 pm	Delgado – obeso
pH = 3	Coloreado - incoloro
120 m	Representativo –no representativo
60 db	Color de ojos

2.5. Cambio de unidades

Un problema habitual en el laboratorio y que puede llevar a "errores groseros" es el pasaje de unidades, ya sea para expresar mejor un resultado o para la elección de un instrumentos de medición.

Para proceder con el pasaje de unidades debemos conocer primero los signos de múltiplos y submúltiplos de la unidad, utilizados más comúnmente.

La tabla siguiente muestra los símbolos y la equivalencia respecto de la unidad

símbolo	nombre	equivalencia
p	pico	10^{-12}
n	nano	10^{-9}
μ	micro	10^{-6}
m	mili	10^{-3}
c	centi	10^{-2}

FUNDAMENTOS MATEMÁTICOS

d	deci	10^{-1}
unidad		
K	kilo	10^3
M	mega	10^6
G	giga	10^9

Estos símbolos se colocan delante de una unidad, por ejemplo mL, mg, μ V, Gbyte, etc. En los ejemplos las unidades son L, g, V y byte, respectivamente y las unidades derivadas se leen mililitro, miligramo, microvolt y gigabyte.

¿Qué significa y como se interpreta?

Tomemos la primer línea, correspondiente al submúltiplo p (pico).

Supongamos que tenemos 10 pm (se lee 10 pico metros), esto equivale a $10 \cdot 10^{-12}$ m, es decir 0,00000000001 m.

Veamos otro ejemplo. Cuantos litros son 55 μ L?

La tabla nos indica que μ equivale a 10^{-6} . Por lo tanto 55 μ L equivalen a $55 \cdot 10^{-6}$ L o bien 0,000055 L.

Ejercicios

1- Exprese en V el valor de 25 mV.

2- Exprese en g el valor 31,2 mg.

Antes de continuar con el tema recordaremos algunas propiedades de la potencia, la notación científica y uso de calculadora.

Es frecuente que los números empleados en química son extremadamente grandes o extremadamente pequeños. Es más conveniente expresar tales números en la forma:

$N \times 10^n$

Donde N es un número entre 1 y 10, y n es el exponente, a continuación algunos ejemplos de esta NOTACIÓN EXPONENCIAL también conocidos como NOTACIÓN CIENTIFIFICA, son:

1, 200,000 es 1.2×10^6

0.000604 es 6.04×10^{-4}

Un exponente positivo indica la cantidad de veces que se debe multiplicar un número por 10 para dar la larga forma del número.

$1.2 \times 10^6 = 1.2 \times 10 \times 10 \times 10 \times 10 \times 10 \times 10 \times 10$ (seis dieces)

$= 1.200.000$

También es conveniente pensar que el exponente positivo nos indica el número de lugares que debemos correr el punto decimal hacia la izquierda para obtener un número más grande que 1 pero menor que 10.

FUNDAMENTOS MATEMÁTICOS

Por ejemplo:

3450 si movemos el punto decimal tres lugares hacia la izquierda se expresa 3.45×10^3

De la misma manera un exponente negativo nos indica cuantas veces debemos dividir un número entre 10 para dar la forma larga del número.

$$6.04 \times 10^{-4} = 6.04/10 \times 10 \times 10 \times 10 = 0.000604$$

Por lo tanto es útil pensar que el exponente negativo nos indica cuantas veces el punto decimal debe correrse hacia la derecha para obtener un número más grande que 1 pero menor que 10.

Por ejemplo:

0.0048 si movemos el punto decimal tres lugares hacia la derecha se expresa 4.8×10^{-3}

En el sistema de notación exponencial, cada vez que el punto se recorre un lugar hacia la derecha, el exponente disminuye en 1

$$4.8 \times 10^{-3} = 48 \times 10^{-4}$$

De manera similar, cada vez que se recorre el punto decimal un número hacia la izquierda el exponente aumenta en 1

$$4.8 \times 10^{-3} = 0.48 \times 10^{-2}$$

¿Cómo usar la calculadora en notación exponencial?

Muchas calculadoras tienen una tecla mancada EXP o EE, que se utiliza para introducir números en notación exponencial. Para introducir el número: 5.8×10^3 en este tipo de calculadora, la secuencia de tecla es:

5 **.** **8** **EXP** **EE** **3**

En algunas calculadoras la pantalla mostrará 5.8, luego un espacio, seguido por 03, el exponente. En otras, se muestra un pequeño 10 con un exponente 3.

Para introducir un exponente negativo, utilice las teclas +/- . Por ejemplo para introducir el número 8.6×10^{-5} , la secuencia de teclas es:

8 **.** **6** **EXP** **+/-** **5**

2.6. Multiplicación y división

Cuando se multiplican números expresados en notación exponencial, los exponentes se suman; cuando se dividen números expresados en notación exponencial, el exponente del denominador se resta al exponente del numerador.

$$\begin{aligned}(5.4 \times 10^2) (2.1 \times 10^3) &= (5.4 \times 2.1) (10^{2+3}) \\ &= 11 \times 10^5 \\ &= 1.1 \times 10^6\end{aligned}$$

otros ejemplos

$$(1.2 \times 10^5) (3.22 \times 10^{-3}) = (1.2)(3.22) \times 10^{5+(-3)} = 3.9 \times 10^2$$

$$3.2 \times 10^5 / 6.5 \times 10^2 = 3.2 / 6.5 \times 10^{5-2} = 0.49 \times 10^3 = 4.9 \times 10^2$$

$$5.7 \times 10^7 / 8.5 \times 10^{-2} = 5.7 / 8.5 \times 10^{7-(-2)} = 0.67 \times 10^9 = 6.7 \times 10^8$$

Ejercitación de práctica

Efectué las siguientes operaciones

- Escriba 67,000 en notación exponencial
- $(3.378 \times 10^{-3}) - (4.97 \times 10^{-5})$
- $(1.84 \times 10^{15}) (7.45 \times 10^{-2})$
- $900 / 0.003$

Respuestas

- 6.7×10^4
- 3.328×10^{-3}
- 2.47×10^{16}
- 3×10^5

Veamos ahora el paso de unidades, pero donde no deseo llevarlo a la unidad. Por ejemplo supongamos que medí un volumen en mL (0,321 mL) y lo deseo expresar en μL .

Para esto se puede utilizar el método del factor 1. ¿Qué significa?.

Sabemos que si multiplicamos por 1 un número cualquiera, esta operación no cambia su valor.

Cuanto vale el siguiente cociente?

$$1 \mu\text{L} / 10^{-6}\text{L}$$

el cociente vale 1. ¿Cómo utilizamos esto para el paso de unidades?

La forma más sencilla es expresar primer el número que está con un múltiplo o submúltiplo en la unidad y luego llevarlo al múltiplo o submúltiplo deseado.... veamos!

$$0,321 \text{ mL} * (10^{-3} \text{ L} / 1 \text{ mL})$$

FUNDAMENTOS MATEMÁTICOS

El número cuya unidad deseo cambiar lo multipliqué por un cociente que tiene la equivalencia entre la unidad y el submúltiplo que quiero cambiar (note que el paréntesis vale 1). Los mL del numerador se simplificará con mL del denominador quedando

$$0,321 * (10^{-3} L)$$

ahora multiplico por la equivalencia entre L y μL , ubicando el cociente de manera que μL me quede en el numerador

$$0,321 * (10^{-3} L) *(1 \mu L/10^{-6} L)$$

si simplificamos L con L y resolvemos la potencia de 10, nos queda

$$0,321*(10^3)*(1 \mu L)$$

que resulta 321 μL

Ejercicios

Pase 0,000021 Kg a mg

pase 0,125 mV a μV

Un poco de complejidad. Supongamos que tenemos magnitudes derivadas, es decir magnitudes que se calculan a partir de otras.

Ej: densidad 1,85 g/ml

concentración 0,25 moles/L

Ejemplo de paso de unidades. Supongamos que tengo una concentración de 0,2 pmoles/mL y la deseo expresar en μ moles/dL. El procedimiento es el mismo que el explicado anteriormente, utilizando el factor 1. Veamos

$$0.2 \frac{pmol}{mL} * \frac{10^{-12} mol}{1 pmol} * \frac{1 \mu mol}{10^{-6} mol} * \frac{1 mL}{10^{-3} L} * \frac{10^{-1} L}{1 dL}$$

Simplificamos todas las unidades posibles y operamos con las potencias de 10 quedando

$$0.2 * 10^{-4} \frac{\mu mol}{dL} = 2 * 10^{-3} \frac{\mu mol}{dL}$$

3. MEDICIONES Y ERRORES

Uno de los principales desafíos de un laboratorio es producir un resultado confiable, creíble, reproducible y repetible.

Confiable: el resultado obtenido debe ser utilizado por otros y por nosotros sin duda, fundado en una buena metodología. La confiabilidad del resultado surge de control extremo de equivocaciones, errores aleatorios y errores sistemáticos.

Las equivocaciones o accidentes pueden evitarse.

Los errores aleatorios pueden disminuirse, pero nunca hacerlos desaparecer

Los errores sistemáticos pueden ponerse en evidencia y eliminarlos casi por completo.

Creíble: esta característica de un resultado surge en general de una trayectoria de trabajo prolija, que ha superado la mirada crítica de otros, que ha sido discutida a fondo y que los resultados producidos para otros han sido bienvenidos.

Repetible: un resultado es repetible si en un mismo día da valores similares. Se conoce como variación intraensayo.

Reproducible: si da valores similares en días distintos. Se conoce como variación interensayo.

Los resultados de un laboratorio se generan a partir de un proceso de medición.

3.1. Medición

Comparación de una muestra con un patrón (utilizando un instrumento). La medición indica la relación entre la magnitud de la muestra y el patrón utilizado. Por ejemplo si un fémur (muestra) pesa 3.1 g, indica que su masa es 3.1 veces mayor que 1 g (el patrón con el que se compara: en las balanzas del laboratorio no vemos los patrones, pero están implícitos en los instrumentos que utilizamos).

3.1.1. Tipos de mediciones

Hay dos tipos de mediciones

Medición directa

Es aquella medición en que se obtiene el valor luego de medir algo con un instrumento. Por ejemplo medir una longitud con una regla, una masa con una balanza, un volumen con una pipeta, etc.

Ejemplo

2.5 ml

0,15 g

11.12 mm

Medición indirecta

Es aquella que se obtiene por cálculo a partir de otras mediciones directas. Por ejemplo la densidad que se obtiene del cociente entre una masa y un volumen, ambos medidos de manera directa. Son medidas indirectas la rigidez ósea (cociente entre fuerza y desplazamiento), el módulo de Young (cociente entre tensión y deformación), el área (largo por ancho).

Ejemplo

si he medido una hoja de papel que tiene 10 cm de ancho por 20 de largo, su área es $10 \cdot 20 = 200$ cm². Son medidas indirectas las concentraciones medidas por espectrofotometría, ya que lo que mido es absorbancia y luego a partir de esta por un cálculo obtengo la concentración.

3.2. Errores

El error es una parte del proceso de medición, que puede disminuirse pero no anular. La equivocación es un mal manejo de los instrumentos de medición, un descuido, mala obtención de la medición por desconocimiento.

3.2.1. Tipos de errores

Los errores se pueden clasificar desde diferente punto de vista. Veamos algunas clasificaciones. De acuerdo a su forma de cálculo y significado podemos clasificar a los errores en : absoluto y relativo (o relativo porcentual) y se cometen cuando se utiliza un instrumento de medición.

Error absoluto

El error absoluto (EA), es la diferencia entre el valor real y el medido de una determinada magnitud. El valor real es siempre un número desconocido y al que deseamos aproximarnos a través de nuestro proceso de medición. Por esta razón el EA absoluto no lo podemos calcular de la manera indicada en el párrafo anterior. El EA se considera igual a la menor división de la escala del instrumento de medición. Por ejemplo una regla milimetrada se puede considerar que tiene un error absoluto de 0,1 cm o 1 mm. Una balanza cuya pantalla muestra 0,000 g al encenderla tiene un error de apreciación o absoluto sería 0,001 g = 1 mg

El error relativo

El error relativo (ER) o el error relativo porcentual (ER%) es el cociente entre el error absoluto y la medición realizada multiplicado por 100. El error relativo es menor cuanto menor es la apreciación del instrumento y mayor la medición realizada.

Ejemplo

Si medimos una masa de 2.1 g con una balanza de apreciación 0,01g, el error relativo de la medida es $0,01 \cdot 100 / 2,1 = 0,48 \%$

Ejercicio

Busque un instrumento (preferentemente uno que use para medir en sus tareas). Investigue cual es su error de apreciación (apreciación o error absoluto) y calcule el ER% que cometería al hacer una medición.

De acuerdo a su origen se pueden clasificar en aleatorios y sistemáticos. Estos errores son los que debemos controlar y medir en nuestras determinaciones.

Errores aleatorios

Los errores aleatorios surgen de variables en algunos casos incontrolables:

- cambios en voltaje eléctrico
- humedad ambiente
- presión atmosférica
- temperatura ambiente
- material mal lavado
- agua destilada contaminada.

Errores sistemáticos

Los errores sistemáticos pueden surgir del funcionamiento de instrumentos:

- filtro sucio que no deja pasar la luz adecuadamente
- envejecimiento de sistema de medida analógicos
- envejecimiento de lámparas
- balanza descalibrada
- testigos en mal estado
- cambio de soluciones de diferentes kits de medición

Los errores sistemáticos pueden originarse también en el operador. Por ejemplo:

- mal uso de los topes de la micropipetas
- errores de paralaje al medir un instrumento
- mal manejo de unidades de medida.

Dentro de los errores sistemáticos puede existir los errores conocidos también como sesgo. Puede ocurrir que al medir una variable, el conocimiento previo de los grupos induzca a inclinar los valores hacia un lado en particular. Por ejemplo, si medimos una solución que es ácido y el pH que mide el pHmetro va descendiendo, tendremos tendencia a esperar más tiempo para la medida. En cambio si sabemos que una solución debe ser más alcalina, la lectura la haremos en menor tiempo, intentando tener un valor más elevado. El trabajo a ciegas es recomendable para evitar este tipo de error o bien como en el caso mencionado, fijar un tiempo de lectura y cumplido ese tiempo tomo el número, aun cuando todavía esté variando.

3.3. Control de calidad

Algunos conceptos

- Al realizar una medición aun con el mayor de los cuidados siempre existirá error.
- Los errores aleatorios pueden indicar un valor mayor o menor que el real.
- Los errores sistemáticos producen un error en la medición que siempre subestima o sobrestima el valor real.
- Los errores aleatorios pueden minimizarse con buenas prácticas de trabajo, protocolos estandarizados y atención.
- Los errores sistemáticos deben ser descubiertos y corregidos. Una vez corregidos desaparecen.
- Tan importante como minimizar el error es conocer el valor de dicho error.
- El coeficiente de variación (CV%) se calcula teniendo duplicados de la medición
- El error sistemático se evalúa utilizando el valor de UDS

3.3.1. Coeficiente de variación

Para calcular el coeficiente de variación se debe hacer cada medición por duplicado, proceso en el que se obtendrán dos valores que llamaremos: x_1 y x_2 . El coeficiente de variación se calcula con la siguiente expresión

$$CV = \frac{\text{valor absoluto}(x_1 - x_2) * 100}{\text{media}(x_1 : x_2) * 1,41}$$

Ecuación 3.1.

Supongamos una medida directa de pH. Si tenemos una solución en la que queremos medir el pH debemos hacer dos mediciones de la misma solución. Así, obtendremos dos medidas por ejemplo

pH1= 5,40

pH2= 5,10

Con dichos valores calculamos la media (mal llamada a veces promedio)

pHm= 5,25 (la m indica media)

Con estos valores calculamos el coeficiente de variación con la fórmula siguiente

$$CV \% = \frac{\text{valor absoluto}(pH1 - pH2) * 100}{(pHm * 1.41)}$$

Ecuación 3.2

$$CV \% = \frac{\text{valor absoluto } (pH 1 - pH 2) * 100}{(pH_m * 1.41)} = \frac{(5,40 - 5,10) * 100}{(5,25 * 1,41)} = 4,05 \%$$

Ecuación 3.3

para nuestro ejemplo el CV% = 4,05%. La medición es aceptada, ya que el CV% es inferior al 10%. El valor que se informa es pH= 5,25 y si se desea se puede indicar el CV% de la medición

En general aceptamos una medición si el CV% es menor o igual al 10%, aunque puede cambiarse esta regla para algunos tipos de mediciones si la metodología lo requiere. Si el CV% de una muestra supera el 10% se debe repetir la medición.

3.3.2. Unidades de desvío estándar

Las unidades de desvío estándar (UDS) se calculan como la diferencia entre el valor de referencia de una muestra llamada quality control (usaremos "quality control" o "qc" cuando nos referimos a la muestra que utilizamos para realizar el control de calidad. Por su parte cuando utilicemos la palabra control de calidad, nos referiremos al proceso de control) y el valor medido promedio (que surge de las dos mediciones x1 y x2), dividido por el desvío estándar de la medida del control de calidad.

$$UDS = \frac{\text{valor medido promedio} - \text{valor del quality control}}{\text{desvío estándar del control de calidad}}$$

Ecuación 3.4.

supongamos que tenemos para la medida de pH una solución "quality control" que tiene un valor de pH= 5 y un desvío estándar (SD)= 0,2

A dicha solución la medimos como si fuera una muestra y obtendremos dos valores

pH_{1qc}= 5,1

pH_{2qc}= 5,3

sacamos el promedio: pH_{mqc}= 5.2

calculamos el UDS con Ecuación 3.4

para nuestro caso quedaría

$$UDS = \frac{\text{valor del QC} - \text{valor medido del QC}}{SD} = \frac{(5,2 - 5)}{0,2} = 1$$

Ecuación 3.5

Un UDS=1 me permite afirmar que el qc está dentro del rango esperado.

En general aceptamos una medición si el UDS se halla en el intervalo [-2,2], aunque dicho rango puede ser modificado con fundamentada decisión. Si el valor de UDS cae fuera del rango mencionado se debe repetir todo el lote de determinaciones.

Los errores de medición pueden conducir a mayor trabajo porque puede ocurrir que tenga que repetir todas las determinaciones. Recuerde, si algo le salió mal y trata de arreglar los resultados:

- tarde o temprano alguien se dará cuenta.
- más temprano que tarde verá que tiene que medirlo nuevamente para arribar a conclusiones valederas. Puede ocurrir que ya las muestras hayan sido descartadas.
- Si el CV% o el UDS le indican que debe realizar nuevamente la medición de una muestra o toda la tanda de determinaciones, acéptelo.
- Antes de repetir la medición de una muestra o toda la tanda de determinaciones, discuta el tema con su superior.

Práctica:

MEDICIONES Y ERRORES

1- se realizó la medición de la concentración de glucosa en dos muestras y un QC, sus valores medidos y el CV% fueron:

muestra 1, glucosa= 1,1 g/l, CV%= 4,5

muestra 2, glucosa= 1,8 g/l, CV%= 17%

UDS= -1

¿Se aceptan las mediciones? ¿Se repite una o las dos?

2- Se midieron dos muestras siguiendo los protocolos habituales. Los valores obtenidos luego de hacer los cálculos fueron:

muestra 1, glucosa= 1,1 g/l, CV%= 4,5

muestra 2, glucosa= 1,8 g/l, CV%= 0,17%

UDS= -3

¿Se aceptan las mediciones? ¿Se repite una o las dos?

Curso: Fundamentos matemáticos, físicos y químicos para ayudantes N° 11

Clase 11.

13/4/2016. 7.30 h

3.4. Errores por exceso y defecto

Ya sabemos que al realizar una medición cometemos errores que pueden ser aleatorios y sistemáticos. Los errores aleatorios pueden dar valores mayores o menores que el real y la magnitud de este error la podemos estimar con CV%. Si bien el CV% no controla el error, el análisis de las curvas de CV% nos irán dando pauta si las modificaciones de nuestro comportamiento y habilidades contribuye a disminuir dicho error. Por ello es necesario que cada operador lleve una tabla de CV% de los QC que utiliza y en la misma gráfica escriba los cambios introducidos o la percepción de ellos que tiene.

Los errores sistemáticos, introducidos por el operador y la metodología utilizada produce habitualmente errores en un mismo sentido. La identificación de estos errores se realiza por los valores de UDS. La ausencia de errores sistemáticos importantes se demuestra a través de valores de UDS que varían alrededor de cero, oscilando entre valores positivos y negativos que no excedan el rango [-2,2].

Los errores sistemáticos se pueden dividir en errores por exceso (cuando dan un valor mayor que lo real) y por defecto (cuando dan un valor menor a lo real)

Ejemplos

1- una pipeta automática cuya denominación el 10 ul, si en realidad coloca 9 ul, al utilizarla estaremos cometiendo un error sistemático por defecto.

2- Si una balanza electrónica, al prenderla mide el valor 0,2 g y no la taramos (ponerla a cero), los valores que midamos tendrán 0,2 g más que lo real, cometándose un error por exceso.

Es importante conocer que un error aleatorio puede conducir a un error sistemático, por exceso o por defecto. Cada vez que realizamos una medición estamos afectados por lo errores aleatorios (que como vimos pueden ser por encima o por debajo del valor real). Supongamos que pesamos una determinada masa de una sustancia para preparar un estándar para una curva de calibración. Si a la hora de pesar el error aleatorio nos produjo un valor menor, cuando preparemos la solución, este estándar tendrá en realidad menos concentración que lo que realmente creemos y cuando la utilicemos en una medición, está estará afectada por un error por exceso.

MEDICIONES Y ERRORES

Advertencia: note que un error por defecto en la pesada, es decir la cantidad de masa colocada es menor que lo que la balanza midió nos dará un error por exceso en las mediciones cuando la utilicemos como testigo.

Veamos otro ejemplo que quizás sirva para aclarar. Supongamos que queremos controlar la duración de algún evento, por ejemplo una partido de football que estamos mirando por TV. Con que lo haremos? Pues, con un reloj. Supongamos que dicho reloj "adelanta", es decir cuando realmente han pasado 15 minutos, el reloj nos dirá que pasaron 16 (por ejemplo). Si controlo el primer tiempo con dicho reloj, y no hubo tiempo adicional, cuanto duró este primer tiempo. Para todo el mundo duró 45 minutos, pero cuanto duró para nosotros?. Habrá durado 48 minutos. Es decir que con este reloj si medimos la duración de un tiempo de football, en esta medición cometimos un error por exceso, es decir medimos algo más prolongado que lo real.

Ahora si con este mismo reloj por ejemplo cargo agua en un bidón a través de una canilla que larga un litro por minuto. La carga del bidón la hago controlando exactamente 16 minutos, cuantos litros tendrá el bidón. Si la canilla larga 1 litro/minuto, teóricamente el bidón debería tener 16 litros, pero en realidad, cuando mi reloj dice que pasaron 16 minutos en la realidad pasaron 15 min y por lo tanto el bidón tendrá 15 litros

CONCLUSIÓN PARCIAL 1: un instrumento que tenga un error por exceso puede producir errores por exceso o por defecto en otras magnitudes.

CONCLUSIÓN PARCIAL 2: Los errores aleatorios pueden conducir a errores sistemáticos, por exceso o defecto, que luego incidirán sobre otras mediciones de manera de producir errores sistemáticos que podrán ser por exceso o defecto y así sucesivamente.

CONCLUSIÓN PARCIAL 3: los errores aleatorios tienen mayor impacto cuando la medición es utilizada para una medición posterior. Por ejemplo como dijimos: pesar algo para luego utilizarlo como testigo o QC de una determinación.

Los errores sistemáticos pueden sumarse o en algunos casos restarse y hasta anularse. Acá es donde juega la suerte del laboratorista. Veamos.

Supongamos que queremos preparar una solución estándar de 2000 ppm es decir 2000 mg/L

Para preparar una solución utilizaremos una balanza para pesar los 2000 mg y algún elemento volumétrico para medir el volumen de 1 litro

Posibilidad 1: la balanza comete un error por defecto del 5 %, es decir cuando me marque 2000 mg, en realidad ha pesado 1900 mg. Por otra parte si utilicé un probeta que tiene un error por defecto del 5%, es decir cuando creo que coloqué 1000 ml (1L), en realidad he colocado 950 ml. Por lo tanto cuanto vale la concentración real? $1900 \text{ mg} / 0,950 \text{ L} = 2000 \text{ ppm}$

El error por defecto de un instrumento, fue compensado por el error por defecto del otro. Pero veamos otra posibilidad. No siempre tendremos dicha suerte.

Posibilidad 2: la balanza comete un error por defecto del 5 %, es decir cuando me marque 2000 mg, en realidad ha pesado 1900 mg. Por otra parte si utilicé un probeta que tiene un error por exceso del 5%, es decir cuando creo que coloqué 1000 ml (1L), en realidad he colocado 1050 ml. Por lo tanto cuanto vale la concentración real? $1900 \text{ mg} / 1,05 \text{ L} = 1809 \text{ ppm}$. La concentración real de la solución es menor que lo que creo. PARA MI, CUAL ES SU CONCENTRACIÓN?

Obviamente: 2000 ppm!

Cuando mida una concentración desconocida utilizando este estándar todo me dará más grande que lo real, es decir cometeré siempre errores sistemáticos por exceso. Informaré siempre valores más grandes que los reales.

Ejercicio

Suponga que las soluciones estándar no tienen error o bien se han compensado y que los errores aleatorios son mínimos, pero el QC ha sido preparado de manera que el valor medio calculado en base a mediciones es más grande que lo que realmente tiene. Los valores de UDS obtenidos serán positivos o negativos?

RECUERDE: muchas veces (y afortunadamente) los errores por exceso y defecto son menores que los aleatorios y por ello no nos afectan demasiado en nuestro trabajo. Pero, como hacemos para que ellos sean pequeños? Pues bien, fácil. Teniendo instrumentos bien calibrados, controlando periódicamente su uso y estando alerta a la hora de medir.

Cuales son los principales momentos en que se pueden originar estos errores?

- preparar curva de calibración nueva
- preparar QC nuevo
- cambiar de instrumento de medición.

Es recomendable no cambiar todo a la vez.

Qué es mejor para evitar errores preparar todos los estándar nuevos de una vez, o una por vez e ir introduciéndolos en la curva?

3.5. Propagación de errores

Conocemos que toda medición está asociada a errores que estos errores pueden minimizarse con buenas prácticas de trabajo. Muchos de los errores aleatorios dependen de nuestra habilidad en el trabajo y otros dependen de las condiciones de experimentación. Aun cuando no podamos controlarlos los errores introducidos por variables ambientales, estacionales o experimentales pueden evaluarse a través de ensayos estadísticos que los involucren en el estudio.

Por ejemplo si prevemos que los resultados de nuestro experimento puede ser influencia por la estación del año, la temperatura ambiente, el lote de agua destilada, el lote de reactivos utilizados, la camada de animales, etc., estas variables pueden incluirse como variables del experimento y realizarse un análisis de la variancia que nos permitirá evaluar si realmente es correcto nuestro presentimiento.

El conocimiento del error siempre es importante, siendo clave tenerlo en cuenta para evaluar la magnitud del efecto de nuestros tratamientos. Por ejemplo si la medición de una variable tiene un CV% de 8%, podría ser considerada una buena medición, según criterios estándar manejados en nuestro laboratorio. Sin embargo, si la modificación en un 4% de la variable en un individuo determina un cambio biológico importante, es claro que no podremos considerar 8% como aceptable.

Por ejemplo si realizamos una medición de la concentración de insulina en sangre de dos grupos de ratas, dicha medición tendrá un error aleatorio y sistemático que estimaremos con los valores de CV % y UDS. Si esos valores son utilizados para realizar un análisis e inferir sobre alguna hipótesis, terminando allí nuestro experimento y conclusiones, el error no sufrirá propagación.

Pero, si el valor de insulinemia medida se utiliza para calcula el índice HOMA, que resulta de multiplicar el valor de la insulinemia por el de la glucemia y por una constante, el error de la insulina y el de la glucemia influirán sobre el valor del índice mencionado.

MEDICIONES Y ERRORES

Es decir que cuando se realizan operaciones con valores medidos, los errores de la medición realizada se propagarán a los resultados, afectando a estos en algunos casos de manera dramática.

¿Cómo se propagan los errores?

La propagación de errores puede calcularse conociendo los errores absolutos o los relativos de la medición directa. Recordemos los conceptos de error absoluto y relativo.

1- Si la medición indirecta resulta de suma o resta de las mediciones directas, el error absoluto de la medición se calcula como la suma de los errores absolutos de cada medición.

Supongamos que medimos de manera directa una variable "a" y otra "b", cada una con su error absoluto Δa y Δb y con ellas calculamos una variable c, con la siguiente fórmula

$$c = a + b$$

Ecuación 3.6

El error absoluto se calcula con la fórmula

$$\Delta c = \Delta a + \Delta b$$

Ecuación 3.7

lo mismo ocurriría si las mediciones de a y b se utilizarán en una resta

$$c = a - b$$

Ecuación 3.8

el error absoluto de la medición indirecta sería la suma de los errores.

$$\Delta d = \Delta a + \Delta b$$

Ecuación 3.9

Ejemplo

Supongamos que se pesa un recipiente con una balanza cuya apreciación es 1 g (el error absoluto de la medición es 1g), siendo el valor obtenido: 95 g. En ese recipiente se coloca luego una sustancia y se pesa nuevamente el recipiente pero ahora con una balanza cuya apreciación es 0,1 g, ya que la cantidad colocada es muy pequeña, obteniéndose un valor de 95,4 g. ¿Cuánta sustancia he pesado?

El cálculo parece y lo es sencillo

cantidad de sustancia = $95,4 - 95 \text{ g} = 0,4 \text{ g}$

que error cometimos

Los errores absolutos de las mediciones fueron 1g para la pesada del contenedor y 0,1 g para el contenedor más la sustancia.

El error de los 0,4 g medidos se propaga como suma de errores ya que el cálculo resultó de una resta de las dos mediciones.

error absoluto = $1 + 0,1 = 1,1 \text{ g}$

Qué error relativo estamos cometiendo entonces

$Er\% = 1,1 * 100 / 0,4 \text{ g} = 275\% \text{ !!!!!}$

MEDICIONES Y ERRORES

Si los errores de laboratorio los estimamos por el CV% y aceptamos aquellos menores al 10%, evidentemente estamos muy muy lejos de acercarnos a esos estándares.

¿Cómo corregiría rápidamente este error?

2- Si la medición indirecta resulta de producto o cociente de las mediciones directas, el error relativo de la medición se calcula como la suma de los errores relativos de cada medición.

Supongamos que medimos de manera directa una variable "a" y otra "b", cada una con su error absoluto Δa y Δb , que nos permite calcular sus errores relativos E_a y E_b . Luego con los valores de a y b calculamos una variable indirecta "c"

$$c = a * b$$

El error absoluto se calcula con la fórmula

$$E\%c = E\%a + E\%b$$

lo mismo ocurriría si las mediciones de a y b se utilizarán en un cociente

$$d = a / b$$

el error relativo de la medición indirecta sería la suma de los errores relativos .

$$E\%c = E\%a + E\%b$$

Ejemplo

Supongamos que se preparó una solución con el objetivo que su concentración fuera 10 g/L, para ello pesamos 1 g con una balanza de apreciación 0,0001 g y utilizamos un probeta de 100 mL con un error absoluto de 5 mL. ¿Qué error relativo y absoluto cometemos en el valor de la concentración de la solución?

Calculemos!

La concentración surge de dividir

concentración = masas de soluto en g/ volumen solución en L

$$\text{concentración} = 1 \text{ g} / 0,1 \text{ L} = 10 \text{ g/L}$$

Tal cual lo deseamos. Ahora que error tenemos en este valor?

como la concentración es el cociente de las mediciones, el error relativo en la concentración será la suma de los errores relativos de las mediciones

$$E\% \text{concentración} = E\% \text{gramos} + E\% \text{litros}$$

expresando los errores relativos

$$\frac{(\Delta \text{concentración} * 100)}{\text{concentración}} = \frac{(\Delta \text{gramos} * 100)}{\text{gramos}} + \frac{(\Delta \text{volumen} * 100)}{\text{volumen}}$$

el error relativo sería

$$E\% \text{concentración} = \frac{0,0001 * 100}{1} + \frac{0,005 * 100}{0,1} = 5,01\%$$

podemos ver ahora el error absoluto de la medición. Volviendo a la ecuación

$$\frac{(\Delta \text{concentración} * 100)}{\text{concentración}} = \frac{(\Delta \text{gramos} * 100)}{\text{gramos}} + \frac{(\Delta \text{volumen} * 100)}{\text{volumen}}$$

como 100 multiplica a todos los términos podemos suprimirlos

$$\frac{\Delta \text{concentración}}{\text{concentración}} = \frac{\Delta \text{gramos}}{\text{gramos}} + \frac{\Delta \text{volumen}}{\text{volumen}}$$

reemplazando los valores

$$\frac{\Delta \text{concentración}}{10} = \frac{0,0001}{1} + \frac{0,005}{0,1}$$

podemos calcular el error absoluto de la concentración

$$\Delta \text{concentración} = \left[\frac{0,0001}{1} + \frac{0,005}{0,1} \right] * 10 = 0,501$$

Ejercicios

1- Si en un recipiente coloca 5 ml con una pipeta automática que aprecia 0,05 ml, 270 ul con una micropipeta que mide 100-1000 con apreciación 10 ul y 24 ml con una pipeta y propipeta con apreciación 0,5 ml. ¿Cuál es el volumen final y cuál es el error absoluto y relativo de la medición?

2- Usted desea calcular la concentración de glucosa en una solución, para ello realiza una curva de calibración obteniendo los siguientes resultados

concentración estándares, g/L	absorbancia
0	0
1	110
2	195
3	315

utilizando R, realiza la curva de calibración y obtiene

> a (datos)

x y

1 0 0

2 1 110

3 2 195

4 3 315

> abs<-lm(y~x,data=a) #realiza la regresión lineal

> summary(abs) #obtiene el análisis

Call:

lm(formula = y ~ x, data = a)

Residuals:

1 2 3 4

-0.5 6.5 -11.5 5.5

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	0.500	8.470	0.059	0.95830
x	103.000	4.528	22.749	0.00193 **

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 10.12 on 2 degrees of freedom

Multiple R-squared: 0.9962, Adjusted R-squared: 0.9942

F-statistic: 517.5 on 1 and 2 DF, p-value: 0.001927

Supongamos que midió una absorbancia de una muestra que le dió el valor de 200 y 210 (realizada por duplicado). ¿Cuál es el valor de concentración de glucosa y el error absoluto y relativo

Normalmente como procede?

Calcula $CV\% = \frac{\text{abs}(210-200) \cdot 100}{(1,41 \cdot 205)} = 3,46\%$

Este es el coeficiente de variación de nuestra medición directa, la absorbancia.

Pero cuanto es el error de nuestra medida indirecta? La concentración.

Como la concentración surge de

concentración = $\frac{\text{abs}}{\text{pendiente}}$ de la recta = $\frac{205}{103} = 1,99 \text{ g/L}$

El error relativo sería

$E\% \text{ concentración} = E\% \text{ abs} + E\% \text{ pendiente}$

$E\% \text{ concentración} = 1 \cdot 100/205 + 4,528 \cdot 100/103 = 4,88\%$

3.6. Detección de equivocaciones

Las determinaciones de laboratorio pueden estar asociadas a

- errores: sistemáticos y aleatorios
- equivocaciones

Ya sabemos que los errores aleatorios podemos medirlos a través del coeficiente de variación. Por su parte los errores sistemáticos lo podemos controlar con la medida de una solución o muestra "QC" cuya concentración conocemos. Con el valor medido de esta se calculan las unidades de desvío estándar (UDS). Este valor aceptamos que es bueno si está en el intervalo [-2,2] y oscila aleatoriamente su valor alrededor del cero.

Las equivocaciones por su parte son las más difíciles de detectar. En primer lugar definamos qué es una equivocación. Consideramos una equivocación cuando hay una mala maniobra del investigador en sus procedimientos, uso de instrumento, cálculos o análisis.

Pongamos algunos ejemplos:

1- El medir pH el electrodo debe estar sumergido hasta cierta profundidad en la solución, si no lo hacemos la medida será errónea, pero no podemos endilgar este error al azar o a algo sistemático, fue nuestra desatención o falta de conocimiento.

2- Tengo que hacer una curva de calibración, la hago correctamente en cuanto a la medición, pero

MEDICIONES Y ERRORES

cuando cargo los valores, en la tabla me equivoco en la concentración de los testigos utilizados.

3- Tengo 10 muestras a las que rotulé mal de manera que el rótulo utilizado no tiene una correspondencia unívoca con las muestras. Las mido, pero luego no sabré a qué muestra asignarle el valor.

Si en todos estos casos me di cuenta, perfecto! Repito todo y desaparece el error.

Ahora bien, como se detectan las equivocaciones?

Lamentablemente no existe método eficiente ni seguro para detectar las equivocaciones, más allá de la atención del investigador y su supervisor. Muchas veces los pueden pasar desapercibidos aun al ojo del mejor observador.

Entre investigador y supervisor existe una razón confianza/desconfianza (C/D), generada por el trabajo conjunto. Un investigador gana o pierde la confianza del supervisor en función de su trabajo cotidiano. Muchas veces el investigador puede sentirse molesto si su supervisor le dice "muéstreme como calculaste los valores", pensando que ya no le tienen confianza o dudan de su habilidad. Cada uno de estos episodios, si pasan sin error aumentan la relación C/D, lo que conduce a que el supervisor cada vez supervise menos. Quienes conocen esto, tratan de mantener la supervisión, sin perder la confianza en el investigador. Actitud que conduce a un desgaste de la relación supervisor/investigador.

Los seminarios, donde el investigador debe presentar sus resultados y la forma que los obtuvo es una mecanismo menos desgastante y además está a la vista de mas personas. Sin embargo, en esta instancia pueden saltar algunos errores, pero no otros como los mencionados por uso de un electrodo, rótulo de muestras, etc.

No parece haber otra solución que la discusión continua de resultados de experimentos "desde el cuaderno hasta la presentación en pantalla de proyección"

Algunos consejos para evitar equivocaciones:

1- si no conoce como pasar de unidades, realizar operaciones matemáticas básicas o la equivalencia entre diferentes unidades, no haga cálculos, solo anote números e indique de donde salieron los mismos. Si no está 100% seguro de qué es lo que mide un instrumento, no lo use. Si no le interesa lo que está haciendo, no lo haga.

2- anotar en el cuaderno los detalles del experimento a medida que se toman los datos. Por ejemplo, tomé la temperatura ambiente y la anoto en el momento. Construyo una curva de calibración y copio las concentraciones de los contenedores de las muestras.

3- mostrar los resultados obtenidos y el contenido del cuaderno de bitácora lo antes posible al supervisor o superior en la línea de investigación.

4- leer protocolos, prestando atención a volúmenes, temperaturas, y demás condiciones.

5- tener claro en la mente el protocolo a utilizar y aun así leer del mismo.

6- comparar resultados de cada repetición de medición, a través de pendientes de curvas de calibración, valores de pH, voltaje, volúmenes y cualquier medición que le haya dado. Si no coincide o es cercano, cuando debería serlo, discuta con su superior el tema.

7- llevar curvas de CV% y UDS por investigador para cada determinación, observar periódicamente dichas curvas en la detección de cambios. Discuta las curvas con su superior.

8- Si no es consciente que lo que está haciendo es importante para la humanidad, la ciencia, el laboratorio o usted, no lo haga. Siempre habrá otro con más entusiasmo y cuidado que usted

esperando.

9- Si nota que su superior le tiene mucha confianza, piense que es usted el que tiene más riesgo que una equivocación tarde más tiempo en descubrirse. Además, si tarda más tiempo en descubrirse, el daño de la misma será mayor. También será mayor su vergüenza si la equivocación fue grosera.

10- Insístale a su superior que mire los resultados. Hágale usted preguntas como:

¿Le parece que los testigos utilizados fueron adecuados?

¿Le parece adecuado el valor de r^2 de la curva de calibración?

¿Me revisa la ecuación introducida para hacer el cálculo en la planilla?

Me resultan sospechosos los valores de CV% ya que no siguen el comportamiento de mi curva de CV% ¿Por qué no revisamos juntos la planilla?

11- Si su superior no accede a dicho control, siga insistiendo. Si continua el desinterés pueden ocurrir varias cosas:

Le tiene demasiada confianza. Recuerde que es lo peor

No tiene interés en sus resultados. Dedíquese a otra cosa o busque otro superior

4. ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA BÁSICA

4.1 ¿Qué es la estadística?

La estadística es una ciencia con base matemática referente a la recolección, análisis e interpretación de datos.

La palabra “estadística” procede del vocablo “Estado”, pues era función principal de los Gobiernos de los Estados establecer registros de población, nacimiento, defunciones, impuestos, cosechas. Su aporte primordial entonces es la cuantificación y hasta la actualidad la Estadística constituye una herramienta del Estado para contar al pueblo.

Los datos se obtienen a partir de unidades experimentales, es decir el objeto de estudio, las mismas pueden ser un grupo de ratas, seres humanos, tubos con alguna reacción química, muestras de leche, entre otras. Todas las unidades experimentales que comparten una o más características en común reciben el nombre de **población**. Mientras que el conjunto de unidades experimentales que seleccionamos para realizar nuestro experimento se conoce como **muestra**, y en base a esa muestra sacaremos las conclusiones respecto de la población que estamos estudiando.

Por otro lado, es de esperar que en la población las características asuman valores distintos (*variabilidad*) y desconocidos (*incertidumbre*), por lo que se las denomina **variables**. Las variables pueden manifestarse mediante atributos o cualidades, o mediante valores numéricos, por lo cual se las denomina **variables cualitativas** y **variables cuantitativas**, respectivamente.

Una vez recolectados los **datos** que expresan comportamientos de variables en una población determinada se puede comenzar con su análisis. Para obtener una visión de ese conjunto y con el fin de describir apropiadamente las diversas características del mismo son necesarios los métodos de la **estadística descriptiva**, que permite organizar los datos en gráficos o en medidas que los resuman. Las variables cualitativas se resumen utilizando proporciones, razones y tasas, mientras que para las variables cuantitativas se emplean **medidas de resumen**, ya sean de posición o de dispersión. Una vez que esos datos han pasado por la estadística descriptiva, fueron analizados e interpretados, dejan de ser meramente datos, para transformarse en **información**. Si dicho trabajo se repite en el tiempo constituye un **registro**.

Dentro de las **medidas de posición central**, o también denominadas de tendencia central encontramos: media o promedio, mediana, moda o modo, y pudiendo no ser centrales siempre encontramos a los cuartiles y percentiles, que nos dan un valor que se puede tomar como representativo de todos los datos. Mientras que las **medidas de dispersión** por su parte, cuantifican la separación, la dispersión y la variabilidad de los valores de la distribución respecto al valor central, las mismas son: rango, desvío estándar y varianza.

4.1. Medidas de resumen, posición y tendencia central

4.1.1. Media

Es el promedio de las observaciones, es decir, el cociente entre la suma de todos los datos y el número de ellos. Es la más utilizada, principalmente en distribuciones normales – simétricas. Carece de significado para variables nominales u ordinales. Su principal desventaja es que resulta sensible a cada una de las observaciones.

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

4.1.2. Mediana

es el valor que ocupa la posición central una vez que los datos han sido ordenados de menor a mayor. De tal forma que el 50% de estos son menores que la mediana y el 50% restante son mayores. Si el número de datos es impar la mediana será el valor central, si a diferencia es par tomaremos como mediana el promedio de los dos valores centrales. Divide al grupo de datos en 2 partes iguales y no es sensible al valor de cada medición, sino que se la llama “robusta”, al no influenciarse por datos atípicos.

4.1.3. Moda o Modo

es el valor de la variable que más veces se repite, puede no ser único, por lo que en este caso estaríamos frente a una población bimodal o multimodal. Es donde se concentra la mayor frecuencia de un conjunto de valores y es útil para variables cualitativas.

4.1.4. Cuartiles

son los tres valores de la variable que dividen a un conjunto de datos ordenados en cuatro partes iguales. Q1, Q2 y Q3 determinan los valores correspondientes al 25%, al 50% y al 75% de los datos. Q2 coincide con la mediana.

4.1.5. Percentilos

se localizan con la siguiente fórmula: $L*(N/100)$

L = frecuencia absoluta acumulada.

N = número del percentil que debemos hallar.

De esta manera veremos que el primer cuartil coincide con el percentil 25, el segundo cuartil con el percentil 50 y el tercer cuartil con el percentil 75.

4.2. Medidas de dispersión

4.2.1. Rango

es un par de datos que tiene como primer valor el menor valor de la muestra y como segundo valor el mayor valor de la muestra. Calculando la diferencia entre la menor y la mayor de las observaciones de 2 poblaciones puedo determinar cual posee mayor o menor dispersión de sus datos.

Por otro lado podemos calcular el **rango intercuartílico** o **rango intercuartil** que se define como la diferencia entre el tercer cuartil (Q3) y el primer cuartil (Q1), es decir:

$$RQ = Q3 - Q1$$

4.2.2. Desvío Estándar

se halla como la raíz cuadrada positiva de la varianza. El mismo se calcula utilizando una fórmula que se halla incluida en cualquier planilla de cálculo: STDEV(...), los puntos entre paréntesis hacen referencia a las celdas de dicha planilla. El desvío estándar informa sobre la dispersión de los datos respecto al valor de la media, cuanto mayor sea su valor, mas dispersos estarán los datos.

4.2.3. Variancia

indica cuanto me alejo en promedio de la media y se calcula de la siguiente manera: a cada uno de los valores se le resta la media, luego el resultado se eleva al cuadrado, se suman los resultados y se

divide por la cantidad de datos [n-1] menos 1

Para calcular las estadísticas antes mencionadas es común utilizar funciones que vienen incluidas en las planillas de cálculos. Para el caso de la planilla Calc de libreOffice las funciones son las siguientes:

media = AVERAGE(...)

desvío estándar = STDEV(...)

mediana = MEDIAN(...)

percentilo 25 o 1er cuartil = QUARTILE(...,1)

rango = [MAX(), MIN()]

Los puntos entre paréntesis hacen referencia a las celdas de la planilla de cálculo.

Para el cálculo con R se utilizan las siguientes funciones:

mean(...)

sd(...)

median(...)

quantile(..., probs=.....)

range(...)

Los puntos entre paréntesis de cada función indican el nombre de la tabla y la columna que deseamos calcular. Por ejemplo: tabla1\$medicacion.

4.3. Gráficos y tablas

La estadística descriptiva permite representar las características principales de un conjunto de datos a través de tablas, gráficos y medidas de resumen, a continuación se muestran algunos de ellos.

4.3.1. Tabla de frecuencia

A partir de un conjunto de datos es posible construir una *tabla de distribución de frecuencias*, seguidamente veremos los diferentes pasos para la construcción de la misma.

1-En la primera columna se ordenan de menor a mayor los diferentes *valores* que tiene la variable en una muestra determinada.

2-En la segunda columna se determina la *frecuencia absoluta* para cada valor, es decir el número de veces que dicho valor se encuentra en el conjunto de datos.

3-En la tercera columna se calcula la *frecuencia absoluta acumulada* que es la suma de todas las frecuencias absolutas de los valores de la variable analizada.

4-La cuarta columna contiene la *frecuencia relativa* que se define como el cociente entre la frecuencia absoluta de un valor determinado y el número total de datos. La misma puede expresarse en tantos por ciento, para lo cual se debe multiplicar la frecuencia relativa por 100 y así obtener el porcentaje correspondiente.

La suma de las frecuencias relativas expresadas en decimales es igual a 1.

5-Finalmente en la quinta columna se calcula la *frecuencia relativa acumulada* que es la suma de las frecuencias relativas expresadas en porcentaje.

La suma de todas las frecuencias relativas acumuladas es igual al 100%.

Considerando por ejemplo datos correspondientes al peso de recién nacidos de 38 semanas de gestación calcularemos todas las frecuencias para finalmente construir una tabla de distribución de frecuencias.

N°	Peso en g	Frecuencia absoluta	Frecuencia absoluta acumulada	Frecuencia relativa	Frecuencia relativa (%)	Frecuencia relativa acumulada
1	2450	1	1	0,04	4,8%	4,8%
2	2690	2	3	0,09	9,5%	14,3%

ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA BÁSICA

3	2780	3	6	0,14	14,3%	28,6%
4	2900	4	10	0,19	19%	47,6%
5	3050	5	15	0,23	23,8%	71,4%
6	3240	3	18	0,14	14,3%	85,7%
7	3310	2	20	0,09	9,5%	95,2%
8	3370	1	21	0,04	4,8%	100%
Total		21	21	1	100%	100%

4.3.2. Histograma

El *histograma* es una representación gráfica de una variable en forma de barras, para su construcción se traza un eje horizontal donde se representan los valores de la variable y un eje vertical en el que se representa una medida de frecuencia (frecuencia absoluta, frecuencia relativa o frecuencia relativa porcentual).

Este tipo de gráfico sirve para obtener una primera vista general de la distribución de la muestra, respecto a una característica cuantitativa y continua, como puede ser el peso, la longitud, entre otras. De esta manera permite observar una tendencia por parte de la muestra por ubicarse hacia una determinada región de valores dentro del espectro de posibles valores que pueda adquirir la característica. Así podemos observar el grado de homogeneidad o por el contrario evidenciar el grado de variabilidad o dispersión de todos los valores de la característica de la muestra.

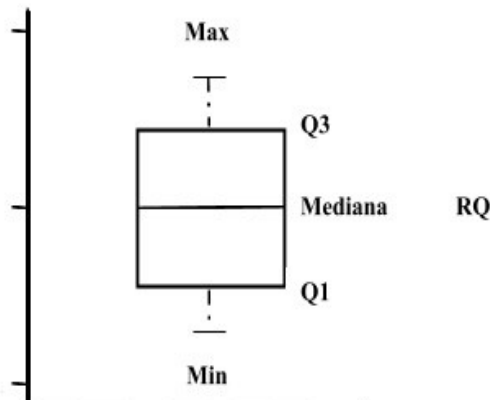
El propósito de un histograma es mostrar la *forma de la distribución de los datos*.

En la siguiente representación gráfica podemos observar el histograma de los datos presentados anteriormente.

4.3.3. Box Plot

El Box Plot o gráfico de caja está compuesto por un rectángulo (la caja) y dos brazos (los bigotes), el mismo permite visualizar la distribución de un conjunto de datos. Para su interpretación primero se deben ordenar los datos de menor a mayor, calcular la mediana, el primer y tercer cuartil, y finalmente el rango intercuartílico.

Para la construcción del Box Plot se debe dibujar una escala que cubra el rango de variación de los datos, luego marcar la mediana, primer y tercer cuartil. Dibujar una caja que se extienda entre los cuartiles y marcar en ella la posición de la mediana. Los bigotes, es decir las líneas, se extienden desde la caja hasta los valores máximo y mínimo de la serie de datos, mientras que el rango intercuartílico queda comprendido entre Q1 y Q3.



ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA BÁSICA

Podemos concluir que el gráfico de caja es una de las herramientas de la estadística descriptiva que permite observar como es la dispersión de los datos respecto a la mediana, los percentiles 25 y 75, como así también los valores máximo y mínimo. Permite estudiar la simetría de la distribución de los datos, por lo cual si la mediana no se encuentra en el centro de la caja estaríamos frente a una distribución asimétrica.

5. ESTADISTICA INFERENCIAL

Los siguientes conceptos de estadísticas contienen simplificaciones y lenguajes sin un extremo rigor estadístico, con fines de comprensión del tema.

Ya vimos algunos conceptos de estadística descriptiva. Cuando tenemos datos de una o más variables de una muestra de individuos, podemos describirla a través de algunas estadísticas como: media, desvío estándar, rango, mediana, etc.

En este capítulo nos dedicaremos a estudiar la estadística inferencial.

La estadística inferencial es la parte de la estadística que se ocupa de llegar a establecer una ley o conclusión a partir de los hechos observados. Es decir, estudia cómo arribar a conclusiones generales para toda la población a partir del estudio de una muestra.

Repasemos dos conceptos fundamentales de la estadística: población y muestra.

La población (o universo) es el conjunto de elementos que comparten características en común. La población es definida por el investigador. Por ejemplo: todos los habitantes de la ciudad de Rosario, todos los alumnos de la Facultad de Medicina de la UNR.

La muestra es una porción de la población debido a que estudiar la totalidad de la población resulta en la mayoría de los casos imposible.

La estadística inferencial es la parte de la estadística que permite básicamente comparar si los valores de la variable de una muestra son diferentes o no de los valores de esa misma variable medidos en otra muestra.

Para el análisis estadístico se utilizan programas para tal fin. En este libro utilizaremos un software llamado R de descarga gratuita y libre. El entorno R trabaja con códigos que para cada análisis en particular es diferente. En este libro nos dedicaremos a estudiar qué tipo de test estadístico utilizar en algunos casos y a la interpretación de los resultados pero no estudiaremos cómo funciona el programa R.

Primero que todo necesitamos saber qué tipos de datos tenemos que analizar. Es clave determinar qué tipo de datos tenemos: cualitativos o cuantitativos, independientes o dependientes, ya que los test estadísticos que se aplicarán serán diferentes en cada caso.

5.1. Tipos de datos

5.1.1. Según su característica

Cualitativos

Expresan alguna característica. Por ejemplo: sexo, ocupación, etnia.

Cuantitativos

Expresan un valor numérico. Por ejemplo: altura, peso, edad, concentración de un metabolito en sangre, longitud.

Se puede transformar una variable cuantitativa en variable cualitativa. Para ello debemos categorizar la variable cuantitativa.

Por ejemplo, tenemos el Índice de Masa Corporal (IMC) como indicador del estado nutricional de un grupo de personas. En el caso que lo tomemos como variable cuantitativa analizaremos el valor

numérico en sí: 24.5, 23, 30, 32.5.

Si lo tomamos como variable cualitativa tendríamos que tener rangos de valores que nos indiquen el estado nutricional del paciente, es decir nos dan una cualidad. Una clasificación podría ser la siguiente:

-<18.5: DESNUTRICIÓN

-18.5-24.9: NORMOPESO

-25-29.9: SOBREPESO

->30: OBESIDAD

5.1.2. Según su naturaleza

Independientes o no apareados

los datos obtenidos corresponden a mediciones realizadas en dos grupos. Ejemplos:

Obtenemos datos de presión arterial medidas en dos grupos de pacientes.

Medimos la glucemia en 3 grupos ratones, aplicando tratamientos diferentes a cada grupo.

Dependientes o apareados

Obtenemos datos que corresponden a mediciones realizadas sobre la misma unidad experimental. El valor de la segunda medición estará siempre condicionado por el valor de la primera. Ejemplos:

- Medimos el pH de un grupo de gaseosas a tiempo 0 y a los 30 minutos.
- Medimos la presión arterial a un grupo de pacientes, administramos una droga y volvemos a medirles la presión.

Ejercicio

¿Qué tipo de datos son los siguientes, independientes o dependientes?

- Obtenemos datos de pH medidos en dos grupos de gaseosas.
- Obtenemos datos de calcemia medidos en un grupo control y un grupo tratado con una droga. Respuestas al pie de página¹

Las pruebas estadísticas nos permiten, en general, contrastar la hipótesis llamada nula (HN) con la hipótesis alternativa (HA).

La HN es la que plantea que no existe diferencia que sí se busca demostrar con la HA.

Cuando aplicamos una prueba o test estadístico llegamos a una conclusión pero no estará libre de error, sin embargo será conocido. Es fundamental reducir el error a su mínima expresión posible.

Error de tipo 1 o alfa

Es la probabilidad de rechazar la hipótesis nula cuando en realidad es cierta. La probabilidad de cometer este error alfa o tipo 1 es lo que mide el nivel de significación estadística valor de p , habitualmente se expresa como p-value y es en lo que nos vamos a fijar para decir si aceptamos o rechazamos la HN.

1. Respuestas ejercicio 1

1-Datos independientes.

2-Datos independientes.

ESTADISTICA INFERENCIAL

En las ciencias biomédicas en general se fija la probabilidad de este error en un valor de p 0,05 o 0,01. La máxima probabilidad de rechazar incorrectamente la H_0 será del 5% o del 1%, respectivamente.

Veamos un ejemplo. Supongamos que medimos la glucemia (g/L) en dos grupos de ratas (I y II), cuyos valores quedan representados en la tabla siguiente:

	grupoI	grupoII
rata1	1.1	1.6
rata2	1.5	1.5
rata3	1.3	1.8
rata4	1.2	1.6
rata5	1.0	1.5
Media	1.22	1.6
SD	0.19	0.12
Variancia	0.037	0.015
Rango	1-1.5	1.5-1.8
Mediana	1.2	1.6

Las 5 primeras líneas de la tabla tienen los valores de glucemia de cada una de las 5 ratas de cada grupo y los últimos cuatro renglones de la tabla tienen algunas de las estadísticas descriptivas que utilizamos a menudo.

Entonces nos hacemos algunas preguntas:

1- ¿Son las glucemias del grupo I diferentes de las del grupo II?

2- ¿Son las glucemias del grupo II mayores que las del grupo I?

Estas preguntas bien pueden originarse porque aplicamos un tratamiento que podría aumentar la glucemia del grupo II o bien porque la media y la mediana del grupo II es a "simple vista" mayor que la del grupo I.

Para poder hacer una comparación utilizando una prueba estadística, primero deberíamos comprobar al menos dos supuestos:

1- test de normalidad

2- test de homogeneidad de variancias

Si las dos muestras tienen "distribución normal" y sus variancias son homogéneas se aplicará un tipo de test para dar una respuesta a las dos preguntas formuladas anteriormente. En este caso se utilizarán pruebas paramétricas.

Si no se cumple al menos uno se aplicarán otras pruebas, conocidas como pruebas no paramétricas.

5.2. Pruebas de normalidad

Podemos utilizar dos pruebas:

1- Prueba de Kolmogorov-Smirnov

2- Prueba de Shapiro Wilk

5.2.1. Prueba de Kolmogorov Smirnov

Aplico el test a los grupos I y II.

El código para R es:

`ks.test(grupo ,pnorm,1.22,0.037)`. El test incluye el nombre del grupo, su media y variancia. Entre los resultados que nos indica el test figura: $p\text{-value} = 0.3104$

¿Cómo se interpreta?

Si $p\text{-value} < 0.05$ decimos que el grupo I no tiene distribución normal, por lo tanto en este caso la muestra I tiene distribución normal. Es decir que para el grupo I se cumple el supuesto de normalidad.

Aplicamos el mismo test para el grupo II de la misma manera, pero utilizando media y variancia de este grupo.

El código para R es:

```
ks.test (grupoII,pnorm,1.6,0.015)
```

$p\text{-value} = 0.4005$

¿Cuál es su conclusión? ¿La muestra II tienen distribución normal? Si el valor de $p\text{-value}$ fuera menor a 0.05 no tendría distribución normal. Por lo tanto, podemos decir que la muestra II tiene distribución normal.

5.2.2. Prueba de Shapiro Wilk

Este test sirve para probar supuesto de normalidad a semejanza del test de Kolmogorov Smirnov, aunque éste último puede ser utilizado para probar otras distribuciones de probabilidad.

Se interpreta de la misma manera: si $p < 0.05$ la distribución no es normal, si $p > 0.05$ asumo que la distribución es normal.

El código para R es:

```
shapiro.test(grupoI)
```

$p\text{-value} = 0.9276$

```
shapiro.test(grupoII)
```

$p\text{-value} = 0.1458$

¿Qué opina? ¿Tienen el grupo I y el grupo II distribución normal? Efectivamente, ya que en ambos casos el $p\text{-value}$ fue mayor a 0.05.

5.3. Pruebas de homogeneidad de variancias

Para evaluar la homogeneidad de variancias, también conocido como supuesto de homocedasticidad, se pueden aplicar tres pruebas estadísticas:

- Test de Bartlett
- Var test
- Test de Fligner

En los tres tests si $p < 0.05$ las variancias no son homogéneas, si $p > 0.05$ las variancias son homogéneas. Puede aplicar cualquiera de los tres test.

A continuación se pueden ver los códigos para su aplicación en R y el valor de $p\text{-value}$ para los grupos I y II.

5.3.1. Prueba de Bartlett

```
bartlett.test(list(grupoI,grupoII))
```

$p\text{-value} = 0.4024$

5.3.2. Var.test

```
var.test(grupoI,grupoII)
```

$p\text{-value} = 0.4032$

5.3.3. Test de Fligner

fligner.test(grupoI,grupoII)
 p-value = 0.147

¿Son homogéneas las variancias de los grupos I y II? Efectivamente, los tres test lo confirman ya que en los tres casos p-value fue mayor a 0.05.

Dado que para ambos grupos (I y II) se cumple el test de normalidad y las variancias son homogéneas se podrán aplicar test paramétricos para su comparación.

Ejercicio2

Supongamos que tenemos dos grupos de animales con dos tratamientos (controles y tratados). Los animales controles tienen una media de 250 g y los tratados de 290 g. Además el tratamiento aplicado conceptualmente produciría aumento de peso. Por lo tanto deseamos probar si el peso de los tratados es mayor que el de los controles. Previo a dicha prueba (que veremos en clases siguientes) realizamos los test de normalidad (Shapiro Wilk) y el de homogeneidad de variancias (Var.test). Los valores de p obtenidos fueron:

Shapiro Wilk p-value=0.00014
 var.test p-value= 0.07

- 1- ¿Aplicará una prueba paramétrica o no paramétrica?
- 2- ¿Por qué?

Respuestas al pie de la página.²

Ejercicio 3

Medimos la concentración de flúor en el agua del río Paraná y del río Carcarañá, se le asignaron los nombres a cada grupo: RPFppm y RCFppm respectivamente. El nombre de la tabla es “tablaf”

muestra	RPFppm	RCFppm
1	3	1
2	8	2
3	11	3
4	4	2
5	5	1
6	9	2
7	3	1
8	2	2
9	8	3
10	7	4
11	5	5
media	5.90	2.36
SD	2.87	1.28
varianza	8.29	1.65
rango	[2,11]	[1,5]

2. Respuestas ejercicio 2

- 1- No paramétrica.
- 2- Ya que no se cumple el test de normalidad, la p fue menor a 0.05.

mediana	5	2

- 1- ¿Qué tipos de datos son según su característica y naturaleza ?
- 2- ¿Qué test podría utilizar para ver si las muestras pertenecen a una distribución normal o no normal? Escriba el código para R del Test de Shapiro
- 3- Shapiro test RPFppm p-value=0.636 ¿qué tipo de distribución tiene?
- 4- Shapiro test RCFppm p-value=0.1259 ¿qué tipo de distribución tiene?
- 5- El Test de Bartlett p-value=0.01784 ¿Cuál es su conclusión?
- 6- ¿Qué test aplicará paramétrico o no paramétrico?

Respuestas al pie de página. ³

Ahora veremos cómo comparar si dos muestras de datos son diferentes o no.

Como vimos anteriormente, primero siempre se deberían probar los supuestos de normalidad (con el test de Shapiro Wilk o el de Kolmogorov Smirnov) y el de homogeneidad de variancias (var.test, fligner.test o el bartlet.test). Además debemos preguntarnos si las muestras son apareadas o no.

Supongamos que tenemos mediciones de glucemias (g/L) de dos grupos de ratas (grupoI y grupoII) representados por la siguiente tabla donde se muestran también sus estadísticas descriptivas.

	grupoI	grupoII
	1.1	1.6
	1.5	1.5
	1.3	1.8
	1.2	1.6
	1.0	1.5
media	1.22	1.6
SD	0.19	0.12
variancia	0.037	0.015
rango	1-1.5	1.5-1.8
mediana	1.2	1.6

En este caso tenemos dos muestras no apareadas (o independientes), ya que los valores de glucemias del grupoI corresponden a datos de un grupo de ratas y el grupo II a mediciones realizadas en otro grupos de ratas.

Pero si grupoI correspondiera a la glucemia de un grupo de ratas, y grupoII a las glucemias medidas en las mismas ratas en otro momento serían datos apareados.

Según se cumplan los supuestos de:

1-normalidad

2-homocedasticidad (homogeneidad de variancias)

3-y los datos sean o no apareados se utilizan test diferentes para probar si las muestras difieren o no.

3. Respuestas ejercicio 3

1- Cuantitativos continuos e independientes.

2- Test de Kolmogorov-Smirnov o Test de Shapiro Wilk. `shapiro.test(tabla f$RPFppm)`.

3- Distribución normal.

4- Distribución normal.

5- Como p es menor a 0,05 las variancias no son homogéneas.

6- No paramétrico.

En general, cuando queremos probar si dos muestras difieren nos referimos a que sus medias o medianas difieren. Por ejemplo, si decimos que con un tratamiento las glucemias son menores en el grupo tratado que en el control, queremos decir que la media es menor en el grupo tratado que en el control.

5.4. Comparación de dos muestras de datos

A continuación se estudiarán los diferentes casos que podemos tener cuando comparamos dos muestras de datos.

5.4.1. Comparación medias dos muestras (normales) independientes

Si se cumplen los supuestos de normalidad y homocedasticidad, siendo los datos independientes, se utiliza el siguiente test: t de Student para datos independientes.

El código en R es:

```
t.test(grupoI,grupoII,paired=FALSE,p.value=0.05)
```

5.4.2. Comparación medias dos muestras (normales) dependientes

Si se cumple normalidad y homocedasticidad, siendo los datos apareados, se utiliza t de Student para datos apareados.

El código en R es:

```
t.test(I,II,paired=TRUE,p.value=0.05)
```

5.4.3. Comparación medianas dos muestras (no normales) independientes

Si no se cumple alguno de los dos supuestos de normalidad y homocedasticidad y los datos son independientes se utiliza el test de Mann Whitney.

El código en R es:

```
wilcox.test(I,II,paired=FALSE,p.value=0.05)
```

5.4.4. Comparación medianas dos muestras (no normales) dependientes

Si no se cumple alguno de los dos supuestos de normalidad y homocedasticidad y los datos son apareados se utiliza el test de Wilcoxon.

El código en R es:

```
wilcox.test(I,II,paired=TRUE,p.value=0.05)
```

Veamos nuestros datos.

Supongamos que tenemos los datos de glucemias (g/L) de la siguiente tabla. Éstos provienen de dos grupos de ratas independientes. Por lo tanto, el test será para datos independiente o no apareados (paired= FALSE).

grupoI	grupoII
1.1	1.6
1.5	1.5
1.3	1.8
1.2	1.6
1.0	1.5

Comprobamos si grupoI y II tienen distribución normal con el test de Shapiro Wilk:

shapiro.test(grupoI)
 shapiro-Wilk normality test
 data: I
 W = 0.97872, p-value = 0.9276
 Como p-value es mayor a 0.05 aceptamos que es normal.

Lo mismo hacemos con el grupo II:
 shapiro.test(grupoII)
 Shapiro-Wilk normality test
 data: II
 W = 0.83274, p-value = 0.1458
 Aceptamos que el grupo II tiene distribución normal porque $p > 0.05$

Veamos ahora la homogeneidad de variancias con var.test:
 var.test(grupoI,grupoII)
 F test to compare two variances
 F = 2.4667, num df = 4, denom df = 4, p-value = 0.4032
 Como $p > 0.05$ aceptamos que las variancias son homogéneas.

Entonces: datos independientes, distribuciones normales y variancias homogéneas aplicamos t de student para datos independientes.
 El código en R es:
 t.test(grupoI,grupoII,paired=FALSE, p.value=0.05)
 Welch Two Sample t-test
 data: grupoI and grupoII
 t = -3.7262, df = 6.7854, p-value = 0.007824
 Como $p < 0.05$ decimos que la media del grupo I difiere de la media del grupo II.

5.5. Comparación de más de dos muestras de datos

Ahora veremos cómo comparar si tres o más muestras de datos son diferentes o no. Primero se deben probar los supuestos de normalidad (con el test de Shapiro Wilk o el de Kolmogorov Smirnov) y el de homogeneidad de variancias (fligner.test o el bartlet.test; no se puede aplicar var.test ya que este es sólo aplicable a dos muestras de datos).
 Además debemos preguntarnos si las muestras son apareadas o no.
 Supongamos que tenemos mediciones de glucemias (g/L) de tres grupos de ratas (grupo I, grupo II y grupo III) representados por la siguiente tabla, donde se muestran también sus estadísticas descriptivas.

	grupoI	grupoII	grupoIII
	1.1	1.6	1.2
	1.5	1.5	2.1
	1.3	1.8	2.2
	1.2	1.6	3.1
	1.0	1.5	1.8
media	1.22	1.6	2.08
SD	0.19	0.12	0.69
variancia	0.037	0.015	0.477

ESTADISTICA INFERENCIAL

rango	1-1.5	1.5-1.8	1.2-3.1
mediana	1.2	1.6	2.1

En este caso tenemos tres muestras no apareadas (o independientes), ya que los valores de glucemias del grupo I corresponden a datos de un grupo de ratas, el grupo II a mediciones realizadas en otro grupos de ratas y lo mismo con el grupo III.

Pero si grupo I correspondiera a la glucemia de un grupo de ratas, y grupo II y III a las glucemias medidas en las mismas ratas en otro momento serían datos apareados.

Para trabajar en R es conveniente organizar los datos de diferente manera:

grupo	glucemia g/l
I	1.1
I	1.5
I	1.3
I	1.2
I	1.0
II	1.6
II	1.5
II	1.8
II	1.6
II	1.5
III	1.2
III	2.1
III	2.2
III	3.1
III	1.8

Según se cumplan los supuestos de:

1-normalidad

2-homocedasticidad

3-y los datos sean o no apareados se utilizan test diferentes para probar si las muestras difieren o no.

Si se cumple normalidad y homocedasticidad, siendo los datos independientes, se pueden utilizar dos análisis que me llevarán a las mismas conclusiones.

Primero construiré un objeto con los datos de la tabla anterior, al objeto lo llamaré glucemias

```
> glucemias
glucemia grupo
1 1.1 I
2 1.5 I
3 1.3 I
4 1.2 I
5 1.0 I
6 1.6 II
7 1.5 II
8 1.8 II
9 1.6 II
10 1.5 II
```

11	1.2	III
12	2.1	III
13	2.2	III
14	3.1	III
15	1.8	III

Los 5 primeros elementos son del grupo I, del 6 al 10 del grupo II y los restantes del grupo III. Entonces para ver si difieren los grupos se aplica el test de análisis de la variancia a un criterio o factor (ANOVA a un criterio). Es a un criterio porque se analiza una sola variable o factor, en este caso la glucemia.

5.5.1. ANOVA a un criterio con aov y LSD.test

Utilizando R, aplicamos el siguiente código:

```
>anova<-aov(glucemia~grupo,data=glucemias)
pido un summary
> summary(anova).
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
grupo	2	1.857	0.9287	5.267	0.0228 *
Residuals	12	2.116	0.1763		

Como siempre miramos el valor de p (en este caso Pr) y como es menor de 0.05 decimos que los tres grupos no son iguales o que hay diferencia significativa entre los grupos.

Una vez que concluimos que existe diferencia entre los grupos nos preguntamos entre qué grupos existe diferencia. Para ello utilizamos la prueba LSD.test.

El código en R es:

```
lsdanova<LSD.test(anova,"grupo",p.adj="none")
```

El test nos da lo siguiente:

Groups, Treatments and means

a	III	2.08
ab	II	1.6
b	I	1.22

Esta tabla indica qué grupos son distintos o no. Aquellos que comparten al menos una letra igual en la columna Group no son diferentes. Dicho de otra manera, para poder afirmar que dos grupos son diferentes tienen que tener entre si todas las letras de la columna Groups diferentes.

Conclusión: las glucemias de los grupos I, II y III difieren, siendo diferentes la del grupo III del I, pero no así del III con II y el II con el I.

Ejercicio4

Ud. midió la calcemia en 3 grupos de ratas que recibieron 3 diferentes dietas, hipocálcica, normal e hipercálcica. Se midió la calcemia post tratamiento y se desea comprobar si los tratamientos tienen efectos diferentes sobre la calcemia. Responda las siguientes preguntas.

- 1- ¿Podría aplicar el Test de Student para datos despareados habiendo comprobado que pertenecen a poblaciones con distribución normal y variancias homogéneas?
- 2- ¿Qué test aplicaría y por qué?
- 3- ¿Cuál es la variable, cuál es el factor, cuáles los niveles?

4- Ud. aplicó la función aov y obtuvo un p-value= 0,0023. ¿Cómo se interpreta este resultado? Respuestas al pie de página.⁴

5.6. Tablas de contingencia

Las tablas de contingencia nos permiten presentar datos de frecuencias según dos o más criterios. Cuando se desea investigar si dos variables cualitativas están asociadas, las tablas de contingencia y su análisis a través de la prueba de Chi cuadrado son adecuadas.

Veamos un tabla de datos, llamada a:

Tenemos 13 ratas que han sido clasificadas por su condición metabólica: normal (n), anormal (a) y por su condición de edad: joven (j) y adulta (a). La tabla siguiente muestra cada unidad experimental.

>a

unidadexperimental	condicionmetabolica	condicionedad
1	n	j
2	n	j
3	n	j
4	n	j
5	n	j
6	a	j
7	n	a
8	a	a
9	a	a
10	a	a
11	a	a
12	a	a
13	a	a

Queremos ver si existe una asociación entre la condición metabólica y la condición edad. Es decir queremos ver si ser normal o anormal está asociado a ser joven o adulta.

Para esto se construye una tabla de contingencia que haremos a mano:

¿Cuántas ratas jóvenes son normales?: 5

¿Cuántas ratas jóvenes son anormales?: 1

¿Cuántas ratas adultas son normales?: 1

¿Cuántas ratas adultas son anormales?: 6

Se observan más normales entre las jóvenes y más anormales entre las adultas. Es decir parecer haber una asociación.

4. Respuestas ejercicio 4

1- No.

2- Test Anova: por ser datos cuantitativos, se cumplieron los supuestos de normalidad y homocedasticidad y comparamos más de 2 muestras.

3- Calcemia, dieta, hipocálcica, normal e hipercálcica.

4- Como es menor de 0,05, decimos que hay diferencia significativa entre las medias de las calcemias de los 3 grupos.

Los datos anteriores que obtuvimos contando lo podemos obtener con R con el siguiente Código en R:

```
> table(a$condicionmetabolica,a$condicionedad)
      a  j
a    6  1
n    1  5
```

Para ver asociación hacemos una prueba chi cuadrado.

5.6.1. Test Chi cuadrado

Cuando se quiere comparar datos cualitativos el test que se utiliza es el chi cuadrado. Esta prueba estadística busca demostrar asociación o no entre dos variables cualitativas como por ejemplo hipertensión y consumo de sal.

El código en R es:

```
> chisq.test(table(a$condicionmetabolica,a$condicionedad))
Resultados del test:
```

Pearson's Chi-squared test with Yates' continuity correction

```
data: table(a$condicionmetabolica, a$condicionedad)
X-squared = 3.7309, df = 1, p-value = 0.05342
```

El valor p-value, se halla justo en el límite que consideramos para tener en cuenta si existe o no diferencia. En este caso dependerá un poco de nuestro criterio. Supongamos que aceptamos que este valor es significativo. Entonces: ¿qué concluimos? Que ser normal o anormal desde el punto de vista metabólico no es independiente de ser joven o adulto.

Podemos calcular ahora el riesgo relativo de ser anormal entre jóvenes y adulto.

El riesgo relativo (RR) es el cociente entre el riesgo del grupo con el factor de riesgo y el grupo de referencia.

Volvamos a ver la tabla de contingencia:

```
      a  j
a    6  1
n    1  5
```

Tenemos 7 adultos y 6 jóvenes.

¿Cuál es el riesgo de ser anormal entre los jóvenes?: $1/6=0.16$, o sea 16%

¿Cuál es el riesgo de ser anormal entre los adultos?: $6/7 = 0.86$ o sea 86 %

¿Cuál es el riesgo relativo de adultos respecto de los jóvenes de padecer la anormalidad metabólica estudiada?

$RR= 0.86/0.16= 5.4$

Existe 5.4 veces más de riesgo de padecer la anormalidad mencionada entre los adultos que entre los jóvenes.

5.7. Test de correlación

Cuando queremos analizar dos variables cuantitativas y ver si cuando el valor de una aumenta la otra aumenta o disminuye de manera sistemática se utiliza el test de correlación.

El análisis de correlación permite hallar una estadística que es el coeficiente de correlación (r). Este valor puede hallarse entre -1 y $+1$. Cuanto más cercano sea a $+1$ indica una fuerte relación positiva entre las variables estudiadas, es decir cuando una aumenta, la otra también lo hace. Por su parte un valor de r cercano a -1 también muestra una gran correlación entre las variables, pero de manera inversa, cuando una crece, la otra decrece. Contrariamente, un valor cercano a 0 , nos indica falta de relación entre las variables.

$R +1$ = fuerte relación positiva, cuando una aumenta la otra también.

$R -1$ = fuerte relación negativa, cuando una crece la otra decrece.

$R 0$ = no hay relación entre variables.

El coeficiente de correlación (r) elevado al cuadrado (r^2) se conoce como coeficiente de determinación y nos indica qué porcentaje de una variable es explicado por la otra.

Por otra parte en una correlación tendremos un valor de p -value, que será interpretado como en todos los casos. Un valor de p -value $< 0,05$ nos indica que las variables están correlacionadas, mientras que un p -value $> 0,05$ indicará falta de correlación.

Veamos la siguiente tabla:

visc	prot
4	7
3.5	7.5
3.3	7.4
3.1	8
3.4	6.5
4.1	6.6
4.2	7

Código en R: `cor.test(nombredetabla$vis,nombredetabla$prot)`

Resultados:

$r = -0,598$

p -value: $0,15$

Lo analizo como los demás test.

Como r dio negativo significa que hay correlación negativa pero como $p > 0,05$ significa que no hay correlación significativa.

6. CURVA DE CALIBRACIÓN

Una curva de calibración es un procedimiento que nos permite hallar una función o ecuación que relaciona dos variables, habitualmente una medida (variable dependiente) y otra conocida de estándares o patrones (variable independiente) con el objetivo de poder conocer el valor de una de ellas midiendo la otra. Habitualmente la función que se utiliza es la regresión lineal, ya que la relación entre las variables puede ser ajustada por una recta. Pero no es el único tipo de relación que se utiliza, aunque sí el más común. Es importante tener en cuenta que esa función no siempre debemos hallarla, muchas veces se encuentra incorporada en los instrumentos que usamos para medir.

Ejemplos cotidianos de curvas de calibración:

- Vaso medidor de cocina
- Regla

Un concepto fundamental es el de SOLUCIÓN ESTÁNDAR o PATRÓN, la cual es una solución con una concentración conocida.

A continuación se explica como se construye una curva de calibración utilizando como ejemplo la construcción de un vaso medidor, Figura 6.1.

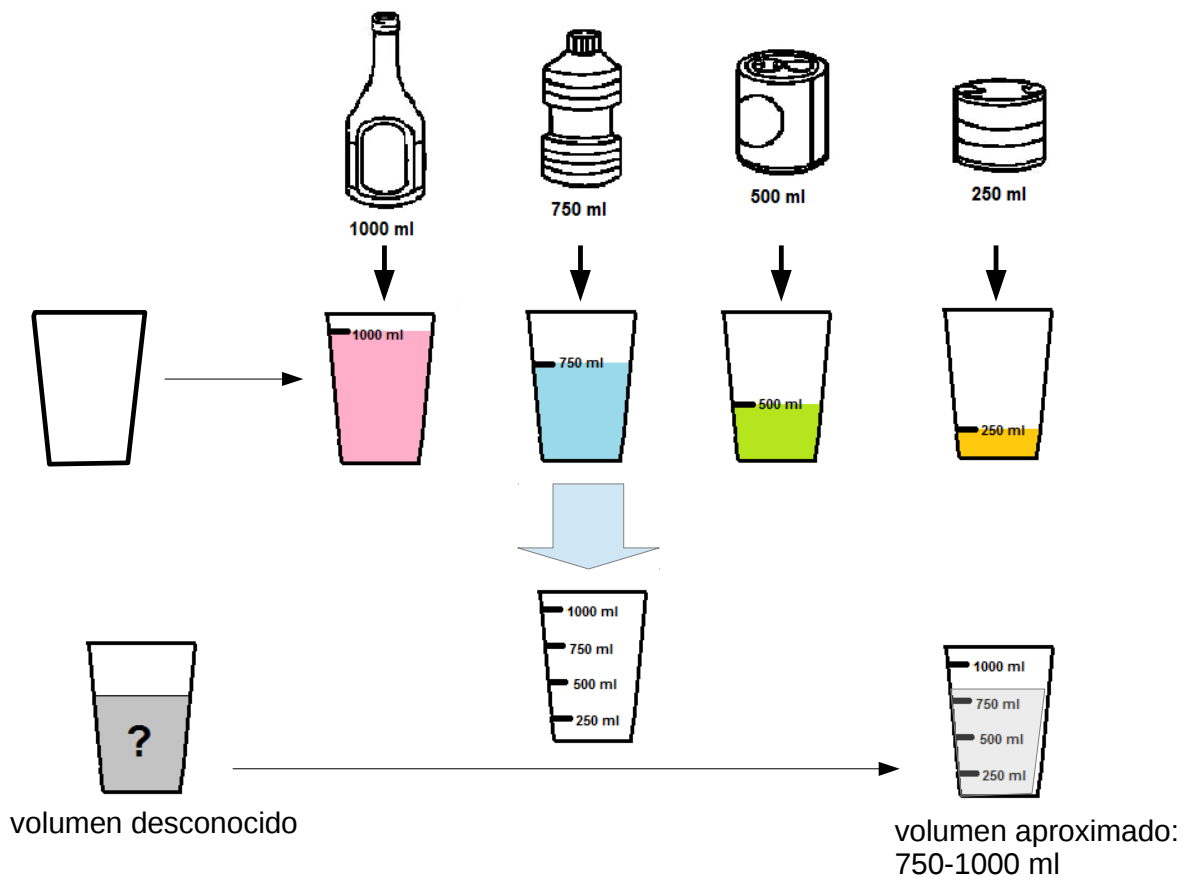


Figura 6.1. Construcción de un vaso medidor. Proceso de calibración.

Supongamos que deseo saber que cantidad de agua hay en un recipiente sin graduación y no cuento con un vaso medidor. Debo buscar recipientes con capacidad volumétrica conocida y llenarlos hasta

CURVA DE CALIBRACIÓN

ese volumen y volcar el agua de cada uno de los recipientes en un vaso vacío e ir marcando en el recipiente el volumen. De esa forma queda construido un vaso medidor como el que muestra la figura. Ahora podremos calcular el volumen de un recipiente cualquiera volcando su contenido en el vaso graduado. En este caso hay dos propiedades, una que deseamos medir el volumen y otra la altura en el vaso medidor. Es claro que esta altura está relacionada al volumen de manera directa. Los recipiente de volumen conocidos serían nuestros estándares, en los cuales conocemos el volumen y la altura que marcamos en el vaso. Para nuestro volumen desconocido, no tenemos el volumen, pero al colocarlo en el vaso, se obtiene el valor del volumen.

En el laboratorio las curvas de calibración se suelen construir cuando realizamos mediciones del tipo espectroscópicas y potenciométricas. Pero también puede ser utilizado para otros fines.

Con mediciones espectroscópicas hacemos referencia a la medición de una propiedad de la luz, por ejemplo la absorbancia (cuánta luz absorbe la solución). Este es el caso de la medición de Arsénico y Calcio.

Las mediciones potenciométricas miden un voltaje (por lo general en milivoltios) para estimar una concentración. Este es el caso de la medición de flúor.

Ejemplos de curvas de calibración comunes en el laboratorio:

1- curva de calibración para medida de fluoruro: variable conocida: concentración de fluoruro de los estándares. Variable medida: milivoltios medidos con el electrodo específico para fluoruro.

2- curva de calibración para medida de calcio por absorción atómica. variable conocida: concentración de calcio de las soluciones estándares. Variable medida: absorbancia obtenida con el espectrofotómetro de absorción atómica.

3- curva de calibración para medida de glucosa por espectrofotometría. Variable conocida: concentración de las soluciones estándar. Variable medida: absorbancia.

4- curva de calibración para medida de arsénico: variable conocida: concentración de Arsénico de los estándares. Variable medida: absorbancia

6.1. Pasos generales para la obtención de una curva de calibración

1- se preparan soluciones de concentración conocida (estándares o patrones); en el mejor de los casos puedo necesitar un estándar estándar (ya que considero también el 0), pero generalmente utilizamos entre tres y seis.

2- se mide una propiedad de esa solución: mV, transmitancia o absorbancia. Si bien podría haber otras variables medidas estas son las más comunes.

3- ajuste de una función a los puntos obtenidos experimentalmente.

Hemos dicho que la función más comúnmente utilizada es la función lineal. Para obtener esta función utilizamos la regresión lineal que es un método que nos permite obtener la ecuación de una recta que ajuste valores experimentales.

Una línea recta puede representarse matemáticamente por una ecuación que tiene dos parámetros: a: pendiente y b: ordenada al origen. Si nuestros datos son pares de valores (x,y), la ecuación de la recta se escribe

$$y = a * x + b$$

Ecuación 6.1.

Hay diferentes recursos para aplicar la regresión lineal:

Planilla de cálculo (EXCEL para Windows; CALC para Linux)

CURVA DE CALIBRACIÓN

R (software libre) u otro software de manejo de datos estadístico (PRISMA)

Explicaremos a continuación el proceso de construcción de una curva de calibración para una medición de Arsénico (espectroscópica) utilizando una planilla de cálculo (EXCEL):

Trabajando con muestras de agua de consumo de las cuales necesitamos saber la concentración de arsénico. Para esto primero es necesario realizar la curva de calibración la cual tendrá valores estándares de concentración de arsénico que conoceremos y dentro de los cuales suponemos que nuestras muestras tienen. El límite máximo de concentración en agua de consumo permitido por la OMS es de 0,01 mg/l (10 ppm). A partir de este valor los estándares que se utilizan son 0 ppm, 10 ppm, 50 ppm, 100 ppm, 200 ppm.

A continuación se explican los materiales y pasos para la construcción de la curva.

Materiales: Erlenmeyer 125ml, soporte Tergopol, tapón de goma con perfus, tubo de Khan con tapón perforado con catéter y aguja.

Pasos:

1. Pesar 0.01 g de AgDEDTC en un tubo de Khan para medir As, usando la balanza Ohaus de 0.001 g (aproximadamente $\frac{1}{3}$ de espátula). Al resto de los tubos agregar la cantidad aproximada que se pesó en el primer tubo. Luego colocar tapón con catéter.
2. Colocar soporte plástico en la boca del erlenmeyer y rotular tubos de Khan y matraces Erlenmeyers.
3. Agregar en los matraces Erlenmeyers muestras y estándares como se muestra en la siguiente tabla, utilizando dos probetas de 50 ml (una para la curva y otra para las muestras)

Estándar (ug/l)	Volumen (ul)	Solución (ug/l)	Volumen final con agua destilada (ml)
0	0	0	50
10	50	10000	50
50	250	10000	50
100	500	10000	50
200	1000	10000	50

4. Agregar 5 ml de HCl concentrado con el dispensador de volumen fijo en cada Erlenmeyer.
5. Agregar 2 ml de KI 0.1 N en cada matraz Erlenmeyer.
6. Agregar 0.5 ml de SnCl₂ 0.3 N en cada matraz Erlenmeyer.
7. Agitar.
8. Dejar reposar abierto 15 minutos y mientras agregar 2 ml de piridina a los tubos de Khan con AgDEDTC (prender campana extractora) y tapar los tubos.
9. Colocar 4 granallas de Zn en cada Erlenmeyer y tapar con tapón.
10. Dejar 24 h, controlar el adecuado burbujeo luego de aproximadamente una hora.
11. Leer en espectrofotómetro a 540nm directamente en el tubo de Khan.

La técnica utilizada para la medición es por espectrofotometría visible empleando el

CURVA DE CALIBRACIÓN

dietilditiocarbamato de plata (AgDEDTC). Con dicha técnica se obtienen valores de absorbancia que determinan la concentración de arsénico de nuestros estándares con los cuales realizaremos nuestra curva de calibración trabajando en una planilla de cálculo (EXCEL).

En nuestro laboratorio existen dos tipos de espectrofotómetros digital y analógico, ambos miden absorbancia y transmitancia, propiedades que se hallan relacionadas a la captación de la luz por la solución. Si una solución deja pasar poca luz decimos que tiene alta absorbancia y baja transmitancia. Para la construcción de una curva siempre utilizamos la absorbancia porque mantiene una relación lineal con la concentración la cual no es así en la transmitancia. Teniendo en cuenta esto cuando medimos en transmitancia debemos convertirla en absorbancia. La relación entre ambas es de tipo logarítmica inversa.

$$\text{Absorbancia} = -\log(\text{Transmitancia}/100)$$

A continuación se muestra el procedimiento de obtención de los valores de concentración de arsénico para la realización de la curva de calibración:

Ars Ug/l curva	Trans	Abs
0	100	0
10	98	0.00877392
50	52	0.28399666
100	38	0.4202164
200	8	1.09691001

Luego se construye un gráfico de dispersión con los valores de Absorbancia (eje Y) y estándares ppb (eje X). Dentro del gráfico se selecciona agregar línea de tendencia, presentar ecuación y mostrar el valor de R^2 .

Para estos valores la ecuación que nos presenta es: $y = 0,011x + 0,228$

Ahora para saber la concentración de arsénico de nuestras muestras lo que necesito es despejar X de la ecuación: $x = (\text{abs muestra} - 0,228) / 0,011$.

Por ejemplo:

Muestras	Transmitancia	Absorbancia	As Ug/l
A4	28	0.55284197	107.989253
A15	63	0.20065945	42.7702686

Haciendo los cálculos con la ecuación esos serían nuestras concentraciones de arsénico para las muestras.

Explicaremos ahora la construcción de una curva de calibración para una medición de Flúor (potenciométrica) utilizando una planilla de cálculo (EXCEL):

Se poseen cinco muestras de agua de la provincia de Santa Fe en las que se desea conocer la concentración de fluoruro. Para construir la curva de calibración que permita conocer el valor de dichas muestras necesitaremos de cuatro soluciones estándares con concentraciones que abarquen los valores que sospechamos poseen las muestras a medir. Téngase presente que el límite máximo permitido para agua de consumo es de 1,5 ppm. De esta manera los patrones a usar serán 8 ppm; 1,9 ppm; 0.8 ppm, 0.19 ppm.

CURVA DE CALIBRACIÓN

El instrumento empleado para la medición de fluoruro es un electrodo de ion específico y la técnica se denomina potenciometría directa.

Con el electrodo se medirán las 4 soluciones estándares y las 5 muestras de la provincia de Santa Fe. El valor que arroja este instrumento se expresa en mV (milivoltios).

Se obtendrá una tabla como la siguiente:

TUBO	mV
8	3197
1.9	3754
0.8	4119
0.19	4568
MUESTRAS	
1	3765
2	4207
3	3271
4	3398
5	3838

Luego, específicamente para el cálculo de la concentración de fluoruro, es necesario calcular el logaritmo de las concentraciones de los estándares, pasando los datos a una planilla de cálculo, Figura 6.2

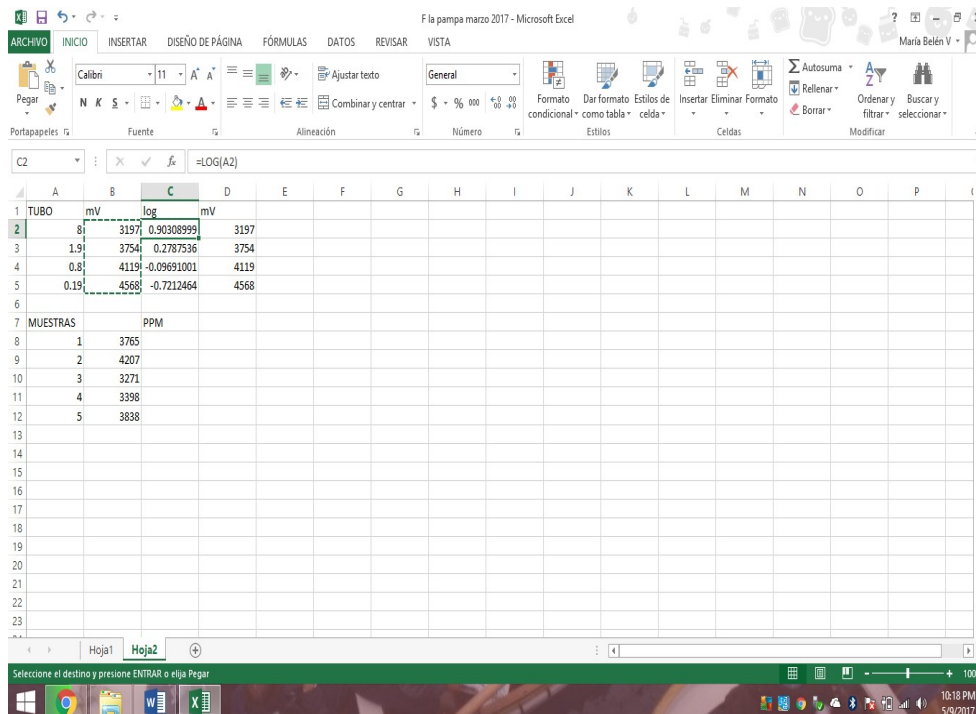


Figura 6.2

CURVA DE CALIBRACIÓN

Luego, con los mV medidos a los patrones y el logaritmo de la concentración de los mismos se construye un gráfico de dispersión, donde el logaritmo de la concentración será el eje x y los mV medidos serán el eje y (lo que explica la disposición en la tabla ya que la columna izquierda representa la x y la derecha al y).

Se seleccionan los valores de las columnas “log” y “mV”; se clickea la pestaña INSERTAR; dentro de los gráficos se elige el gráfico de dispersión, Figura 6.3.

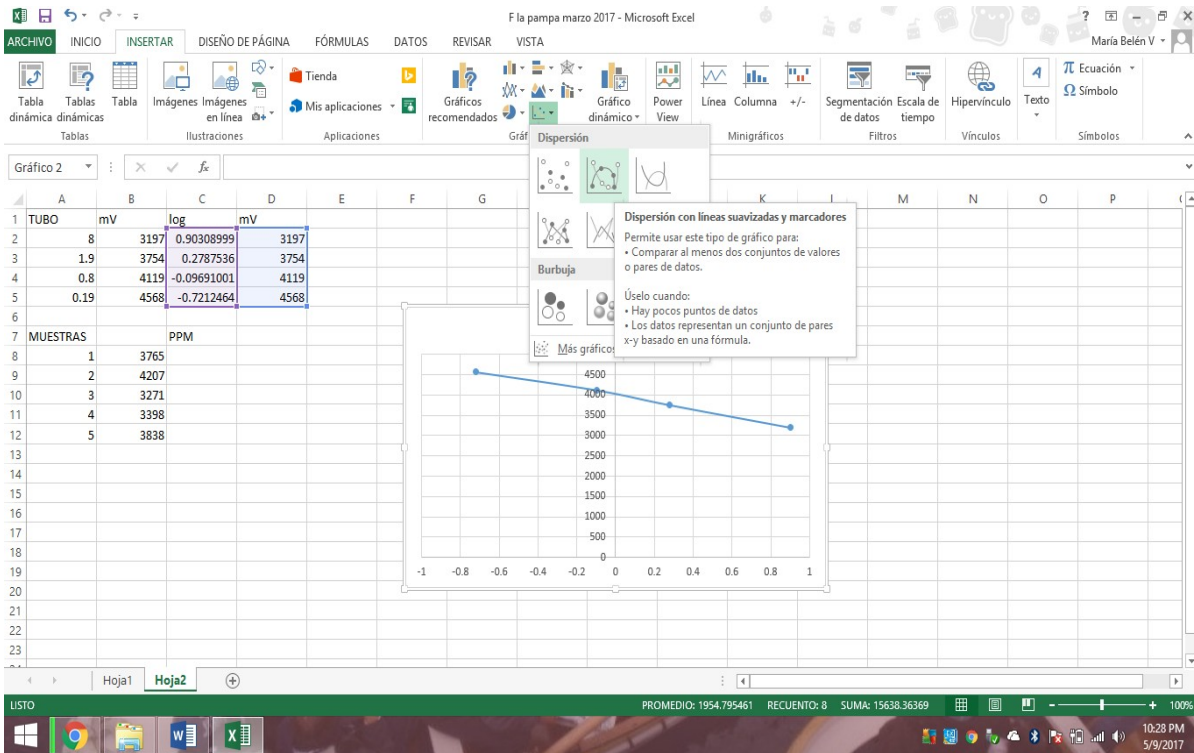


Figura 6.3

Luego a la gráfica se le agrega línea de tendencia y sobre ella se hace click para que aparezca la opción de mostrar ecuación de la gráfica, Figura 6.4

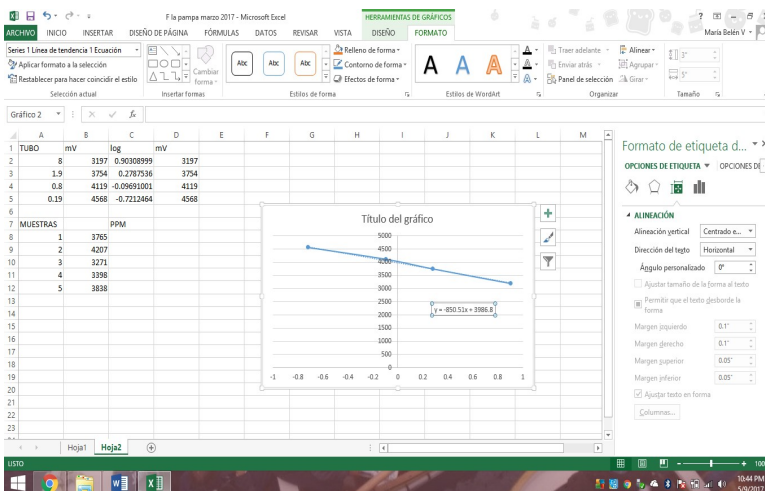


Figura 6.4

CURVA DE CALIBRACIÓN

La ecuación es: $y = -850,51x + 3986,8$

Lo que necesito para conocer la concentración de las muestras es despejar la x de la ecuación variando la y que son los mV medidos para cada muestra y considerando que de la concentración considerábamos su logaritmo:

$$x = 10^{((y - 3986,8) / (-850,51))}$$

Esa ecuación la aplicamos en la columna de PPM, Figura 6.5

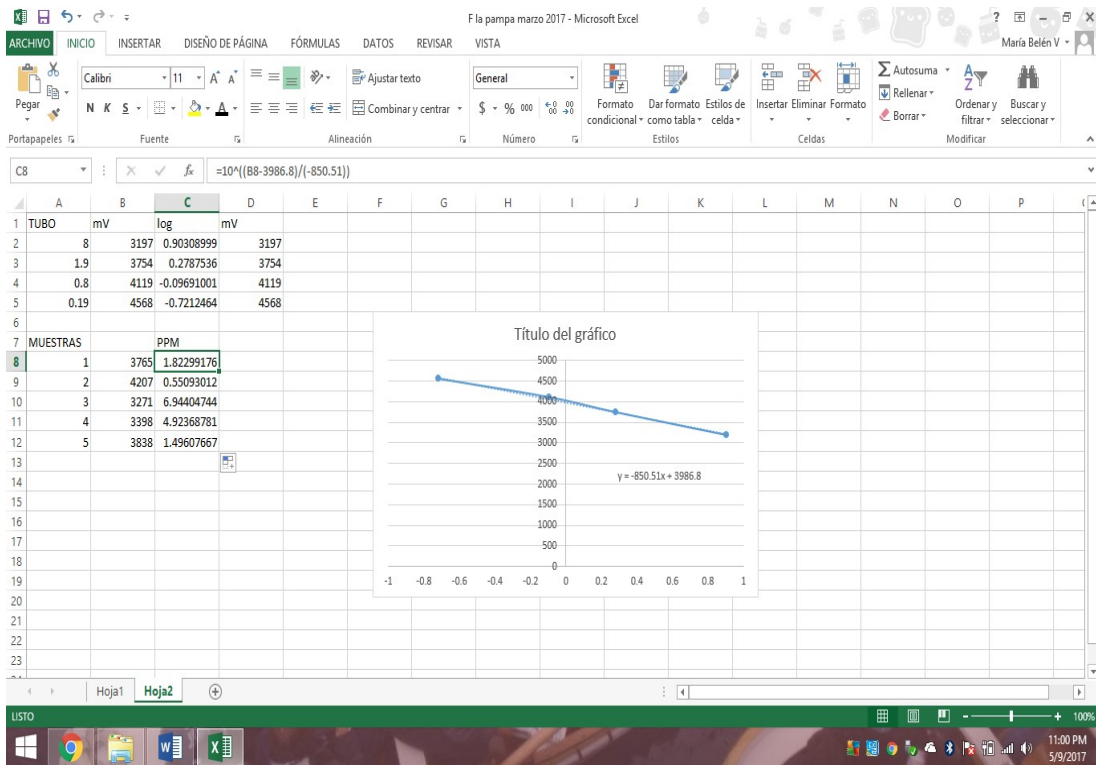


Figura 6.5

A continuación se expone un ejemplo de una curva de calibración para la medición de Calcio:

La primera columna muestra la propiedad conocida de los estándares: cantidad de $\mu\text{g/ml}$. La segunda columna la transmitancia medida en el equipo ($T\%$). La tercera, muestra la absorbancia que es una variable calculada a partir de la transmitancia y su función es obtener una relación con los $\mu\text{g/ml}$ a través de una función lineal

$\mu\text{g/ml}$	$T\%$	abs	REGRESIÓN LINEAL
0	100		pendiente ordenada origen
3	81,5	0,0888423913	0,0257608199
5	73,1	0,136082623	
10	52,5	0,2798406966	
25	25,2	0,5985994592	
36	11,2	0,9507819773	

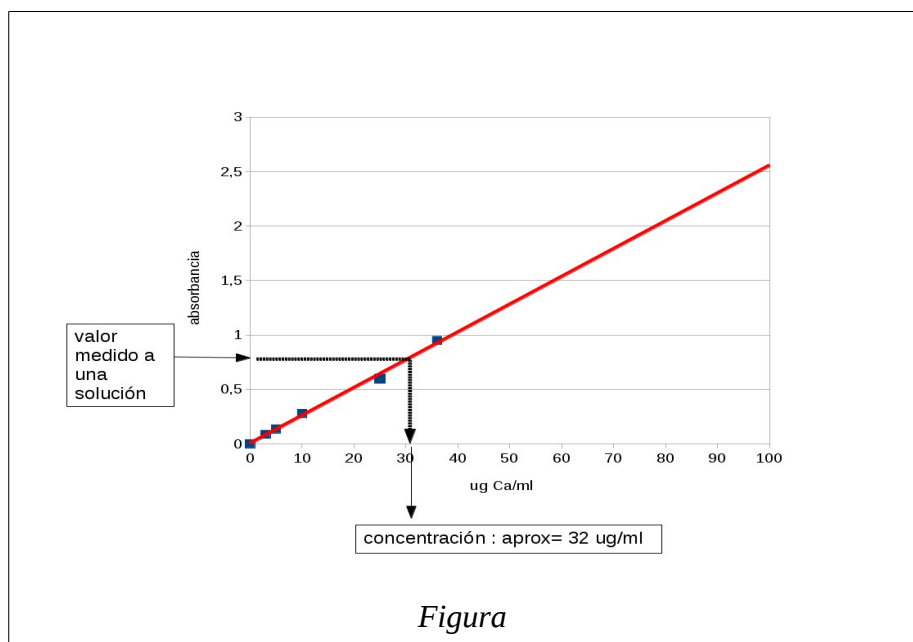
Se muestra también el resultado de la regresión lineal: pendiente: 0,0258 y la ordenada al origen. La Figura 6.1 muestra los valores de Abs en función de los $\mu\text{g/ml}$ y la recta de regresión

6.2. Interpolación

Se entiende por interpolación al proceso de cálculo de una de las dos variables utilizando valores de la variable medida que caigan en el rango de los valores de los estándares.

Es decir la interpolación en la curva de nuestro ejemplo se realizaría siempre y cuando la absorbancia este en el rango 0,0888 – 0,95 o la concentración en el rango: 0 -3

Si tenemos una solución cuya concentración desconocemos, podemos fácilmente medir su absorbancia. En Figura 6.2 se explica situación. Si el valor medido de absorbancia es por ejemplo 0,8, con este valor interpolamos en la gráfica y obtenemos el valor de la concentración, el cual era desconocido para nosotros.



Figura

Este cálculo puede ser fácilmente hecho sin necesidad de la gráfica sino utilizando los parámetros de la regresión lineal. Pendiente = 0,0258, ordenada al origen= 0

concentración = (absorbancia muestra – ordenada al origen)/pendiente

concentración = (0,8- 0)/0,0258 = 31 $\mu\text{g/ml}$

6.3. Extrapolación

La extrapolación es el proceso en el cual calculamos una concentración utilizando valores fuera de la curva de calibración.

Por ejemplo si tuviéramos una absorbancia= 2, el cálculo sería

concentración = (absorbancia muestra – ordenada al origen)/pendiente

concentración = (2- 0)/0,0258 = 77,51 $\mu\text{g/ml}$

y a través de Figura 6.3 vemos el mismo resultado

CURVA DE CALIBRACIÓN

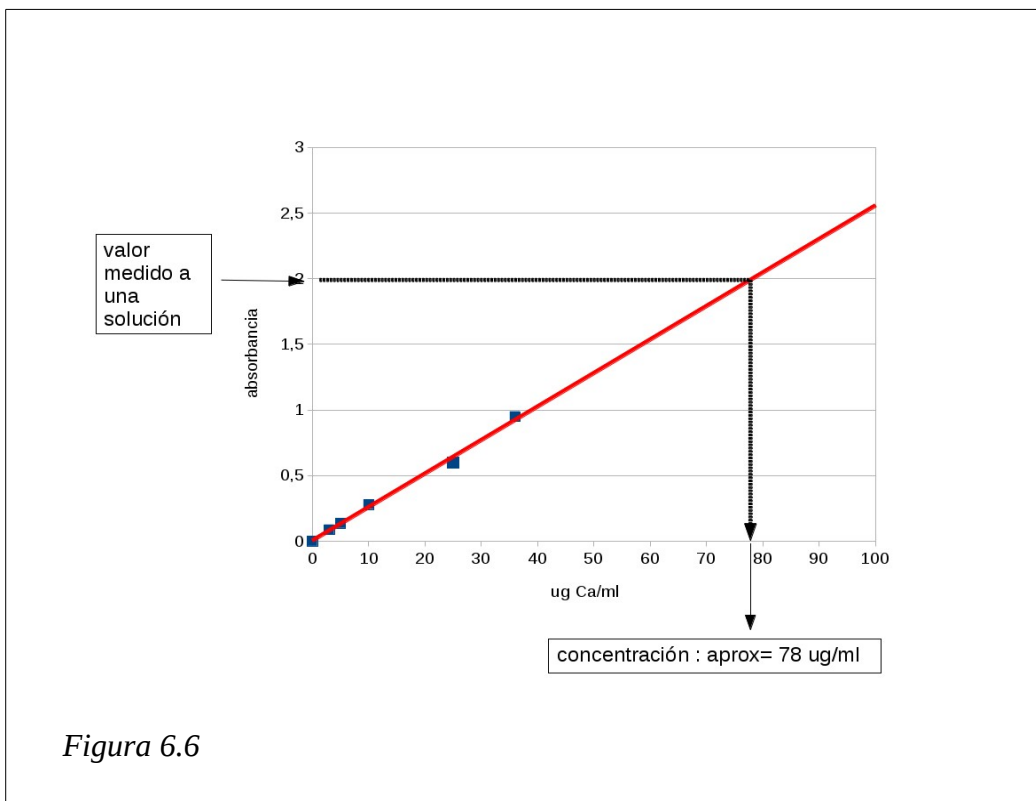


Figura 6.6

Nos preguntamos cuan correcto es este procedimiento. Al parecer es igual que el aplicado en la interpolación. Sin embargo podríamos tener un gran error, dado que estamos suponiendo que la relación está siguiendo la misma relación lineal que seguía hasta valores de 36 $\mu\text{g/ml}$.

Si dicha relación no fuera así, podríamos estar cometiendo severos errores.

Por ejemplo, en la Figura 6.4 se muestra una extrapolación pensando en que el comportamiento lineal se mantiene, aun cuando en la realidad no lo fuera. En este caso vemos que la medida asumiendo que el comportamiento se mantiene, sobre-estima el valor real de la solución. También podría haber ocurrido una subestimación si la desviación de la recta hubiera sido hacia abajo de ésta.

CURVA DE CALIBRACIÓN

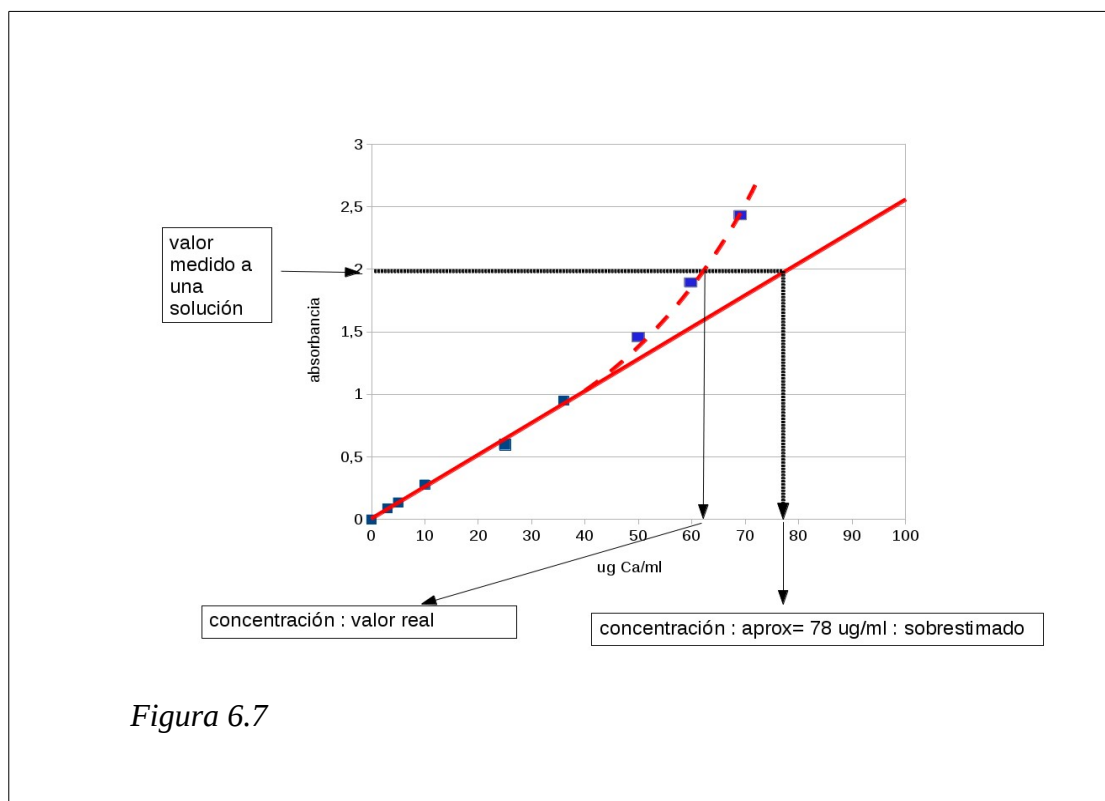


Figura 6.7

Conclusión: nunca se debe extrapolar. Cuando una valor de absorbancia cae fuera de la curva se debe diluir la muestra o poner menor volumen de manera que la medida caiga en el rango de las absorbancias de los estándares.

6.4. Límite de detección

Se entiende por límite de detección el valor de la concentración por debajo de la cual la variable medida da siempre un valor constante.

Cuando se realiza una curva de calibración es usual trazar la recta de regresión desde cero. Pero en realidad no sabemos si la variable medida sigue esa relación entre 0 y la concentración menor de los estándares.

Por ello si la absorbancia fuera menor a 0,0888, no se debería calcular la concentración con la fórmula o por interpolación, sino informar el valor como concentración $< 3 \mu\text{g/ml}$

Si se deseara medir el real valor se podría proceder de las siguientes maneras.

- 1- colocar mayor cantidad de muestra y luego de cálculo tener en cuenta el volumen utilizado
- 2- agregar testigos entre el valor 0 – 0,0888.
- 3- concentrar las muestras con alguna metodología acorde a la sustancia a medir.

¿Por qué algunas técnicas requieren curva de calibración y otra no?

la respuesta es sencilla. Si la variable que queremos medir no la podemos medir directamente sino a través de una propiedad relacionada requeriremos una curva de calibración.

En otros casos, como por ejemplo cuando se quiere medir un peso, no hace falta hacer una curva de calibración por el usuario. Sin embargo la curva de calibración viene incluida en el instrumento.

6.5. Otras herramienta para obtener de la ecuación de una curva de calibración

Utilizando el programa R Proyecto:

6.5.1. Obtención de recta de regresión con lm

Supongamos que tenemos un conjunto de pares de valores que son glucemias medidas a diferentes tiempos. Estos datos los tenemos en un objeto de R al que llamamos datosrl

```
>datosrl
t  glucemia
1  0    1.1
2  1    1.5
3  2    1.3
4  3    1.2
5  4    1.0
6  5    1.6
7  6    1.5
8  7    1.8
9  8    1.6
10 9    1.5
11 10   1.2
12 11   2.1
13 12   2.2
14 13   3.1
15 14   1.8
```

Podemos graficar los datos de glucemias en función del tiempo. El código a aplicar es.

```
>plot(glucemias$t,glucemias$glucemia)
```

Para obtener la ecuación de la recta de regresión (es decir sus parámetros) y coeficiente de correlación (que nos indica si la recta es un buen modelo de ajuste, aplicamos la función lm).

```
>rl<-lm(glucemia~t,data=glucemias)
```

```
>summary(rl)
```

Call:

```
lm(formula = glucemia ~ t, data = glucemias)
```

Residuals:

```
    Min     1Q   Median     3Q      Max
-0.68083 -0.20708  0.04417  0.14542  0.97167
```

Coefficients:

```
            Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept)  1.05583   0.19605   5.386  0.000124 ***
t             0.08250   0.02383   3.462  0.004214 **
```

Multiple R-squared: 0.4796, Adjusted R-squared: 0.4396

F-statistic: 11.98 on 1 and 13 DF, p-value: 0.004214

En la tabla anterior (intercept) es la ordenada al origen de nuestra recta y su valor se halla en la columna Estimate y su valor es 1,05583. Por otra parte en la fila "t" se halla la pendiente de nuestra recta. El valor de la pendiente se halla en la columna Estimate y en este caso es igual a 0,08250.

La columna Pr de la tabla nos indica el significado estadístico de cada parámetro. ¿Qué significa

CURVA DE CALIBRACIÓN

que (intercept) tiene $Pr = 0,000124$? Este valor es menor de 0,05, lo que indica que la ordenada al origen es 1,05583 y este valor es significativamente diferente de cero. Por otra parte la pendiente cuyo valor es 0,08250 tiene $P = 0,004214$, lo que nos está indicando que dicha pendiente es significativamente diferente de cero. Este significado no está indicando una asociación entre la glucemia y el tiempo, es decir a medida que transcurre el tiempo la glucemia aumenta 0,08250 g/L por minuto.

6.5.2. Obtención de recta de regresión con lsfit

La función lsfit es otro métodos para obtener la recta de regresión (es decir sus parámetros) a partir de nuestros datos. Veremos a continuación el cálculo de la recta de regresión, asignándole una ordenada al origen igual a cero (para ellos el argumento intercept=FALSE)

```
> cc
```

```
ppm  A
1    0  0
2    1 15
3    5 60
4   10 180
5   20 320
```

Con la función lsfit, obtenemos la ordenada al origen, en este ensayo se conoce como X

```
>lsfcc<-lsfit(cc$ppm,cc$A, intercept=FALSE)
```

```
>lsfcc
```

```
$coefficients
```

```
  X
```

```
16.18821
```

con la función abline graficamos la recta

```
>abline(a=0,b=lsfcc$coefficients)
```

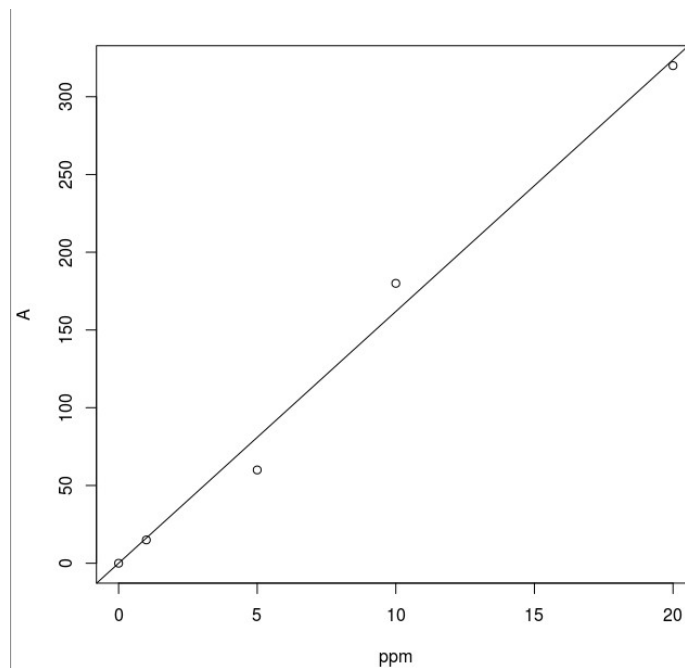


Figura 6.8

7. SOLUCIONES

Veremos algunas definiciones que nos conducirán al concepto de solución.

Sistema material: es toda porción del universo formada por una o más sustancias.

Existen dos tipos fundamentales de sistemas materiales: homogéneos y heterogéneos.

Sistema homogéneo: es aquel sistema que presenta propiedades constantes en todos sus puntos. Dentro de estos sistemas tenemos las soluciones.

Sistema heterogéneo: es aquel sistema que presenta diferentes propiedades en los diferentes puntos del mismo o está formado por más de una fase. Por ejemplo arena y agua.

Fase: es cada una de las porciones homogéneas de un sistema heterogéneo. Podemos redefinir sistema homogéneo como aquel formado por una sola fase. Sistema heterogéneo es aquel formado por más de una fase.

Componente: es cada una de las sustancias puras que forman un sistema.

7.1. Solución

También conocida como disolución, es una mezcla homogénea de un soluto y un solvente. Es homogénea porque no es posible distinguir el soluto una vez disuelto. Por ejemplo al colocar sal en agua, no es posible distinguir la sal disuelta; en cambio si se coloca arena en agua se observa que la arena se puede distinguir, esta última no es una solución es sólo una mezcla heterogénea.

solvente: en nuestro caso el agua será el solvente más utilizado y las soluciones se denominan acuosas. Existen soluciones donde el solvente puede ser otro líquido (alcohol, acetona, etc) o puede ser también un gas.

7.2. Tipos de solutos

Trabajaremos con dos tipos de solutos: no electrolitos (no dissociables o no iónicos) y electrolitos (dissociables o iónicos).

No electrolitos: son solutos que al colocarlos en agua cada molécula queda como tal sin disociarse (Figura 6.2, izquierda).

Electrolitos: se disocian, originando dos o más partículas, llamadas cationes y aniones (Figura 6.2, derecha).

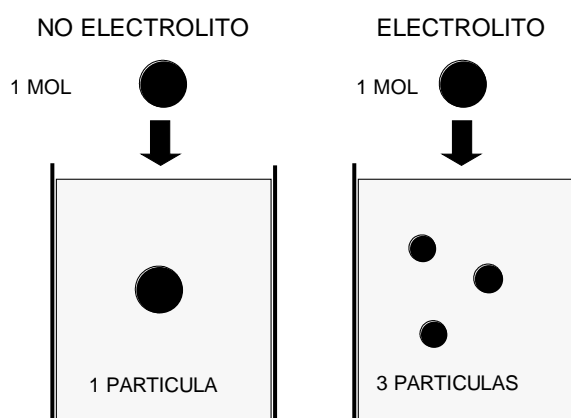


Figura 7.1

Por ejemplo: en la Figura 6.2 izquierda al colocar 1 molécula de un no electrolito en agua queda una partícula en solución. En el panel de la derecha de la Figura 6.2, al colocar una molécula de electrolito se disocia formándose en este caso 3 partículas. Son electrolitos las sales, ácidos e hidróxidos. Los no electrolitos son compuestos generalmente de naturaleza orgánica.

Un compuesto como Na_2SO_4 , al colocarlo en agua se disocia en el radical ácido: SO_4^- y dos cationes Na^+ .

7.3. Peso molecular

Todo soluto tiene un peso molecular. Esto es un dato que hace referencia al tamaño de la molécula del soluto. Se calcula sumando los pesos atómicos de los elementos que componen la molécula. Este dato puede presentarse sin unidades, en gramos, en umas (unidad de masa atómica) o en Dalton (Da) éste último es sinónimo de uma. Si bien ésta última es la forma adecuada, será más común para nosotros el gramo. Ejemplo: El NaCl tiene un PM de 58,5 y la albúmina de 60000; la molécula de albúmina es más grande que la de cloruro de sodio.

7.4. Cantidad de soluto

Puede expresarse en diferentes unidades, las más comunes son el gramo, el mol (o molécula gramo) y el equivalente gramo. Hay otras formas que no trataremos acá.

Ejemplo 1

NaCl (cloruro de sodio). La fórmula está compuesta por un catión sodio y un anión cloruro. Al disociarse se forma un catión (una carga positiva) y anión (una carga negativa). Siempre deben coincidir la cantidad de cargas positivas y negativas.



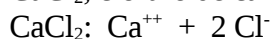
Para el caso del cloruro de sodio, el peso molecular es 58,5.

El peso molecular (en gramo) es igual a 1 mol, además es igual a tantos equivalentes como cargas positivas o negativas tiene el soluto al disociarse. A partir de un mol de cloruro de sodio se formaron un sodio (una carga positiva) y un cloruro (una carga negativa) por lo tanto hay 1 equivalente.

$$58,5 \text{ g} = 1 \text{ mol} = 1 \text{ equivalente}$$

Ejemplo 2:

CaCl_2 , cloruro de calcio, cuyo peso molecular es 111.



A partir de una molécula se formó un catión calcio con dos cargas positivas y dos aniones cloruro cada uno con una carga negativa (se formaron dos cargas positivas y dos negativas), por lo tanto

$$111 \text{ g} = 1 \text{ mol} = 2 \text{ equivalentes}$$

Ejemplo 3:

$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, fosfato de calcio, peso molecular 310.



Se han formado 3 cationes calcio y dos aniones fosfato. Los tres iones calcio tienen 6 cargas positivas y los dos iones fosfato 6 cargas negativas, por lo tanto tienen 6 equivalentes. Resumiendo los datos:

$$310 \text{ g} = 1 \text{ mol} = 6 \text{ equivalentes}$$

Ejemplo 4:

Urea, peso molecular 60. Es un no electrolito; al colocar una molécula en agua dará origen a una sola partícula sin carga (no se calcula equivalente). Por lo tanto:

60 g = 1 mol

Son solutos no disociables: glucosa, manitol, sacarosa y en general todo soluto que no sea sal, ácido o hidróxido.

7.5. Concentración

La concentración de una solución es la relación o cociente entre la cantidad de soluto y el volumen de la solución (ecuación 1).

$$\text{concentración} = \frac{\text{cantidad de soluto}}{\text{volumen de solución}}$$

Ecuación 7.1

La concentración es un cociente de dos magnitudes: la cantidad de soluto y el volumen. Si es grande el numerador (mucha cantidad de soluto) o chico el denominador (poco volumen de solución) el resultado será grande, es decir la solución tendrá una elevada concentración. Se dice que se tiene una **solución concentrada**. En caso contrario, se trata de una **solución diluida**.

De acuerdo a las unidades de cantidad de soluto que se utilicen, se obtendrán diferentes formas de expresar la concentración.

7.5.1. % P/V o g %

Esta forma de concentración expresa la cantidad de gramos disueltos en 100 ml de solución. También puede expresarse en g/l o ‰, que expresa los gramos de soluto disueltos en 1 litro de solución.

Ejemplo: glucosa 5% (se lee glucosa al 5 por ciento): significa que en 100 ml de solución hay disuelto 5 g de glucosa.

7.5.2. % P/P

Expresa la cantidad de gramos de soluto en 100 gramos de solución. Esta forma de concentración siempre va acompañada de la densidad de la solución, es decir la masa de solución contenida en 1 ml. Por ejemplo el agua tiene una densidad de 1 g/cm³, esto quiere decir que un cm³ de agua pesa 1 gramo. La concentración en %P/P se relaciona con el % P/V por la Ecuación 7.2:

$$\%P/V = \%P/P * \text{densidad}$$

Ecuación 7.2.

7.5.3. Molaridad

La molaridad expresa la cantidad de moles disueltos en 1 litro de solución y su unidad es M.

Ejemplo: urea 0,3 M (se lee urea 0,3 molar): significa que en 1 litro de la solución hay disuelto 0,3 moles de urea.

7.5.4. Normalidad

La normalidad expresa la cantidad de equivalentes disueltos en 1 litro de la solución y su unidad se expresa como N:

Ejemplo: KCl 0,75 N (se lee cloruro de potasio 0,75 normal): en 1 litro de la solución hay disuelto 0,75

equivalentes de KCl, 0,75 equivalentes de Cl⁻ y 0,75 equivalentes de K⁺.

7.5.5. ppm

Se lee partes por millón. En general expresamos con esta forma la cantidad de miligramos de una sustancia en un litro de solución.

Ejemplo: NaF 1900 ppm, indica que en 1 litro de la solución tenemos disueltos 1900 mg de NaF

7.6. Dilución

Proceso en el cual se agrega solvente a una solución ya preparada. Durante la dilución no cambia la cantidad de soluto, pero como aumenta el volumen, se produce una disminución de la concentración.

En un proceso de dilución llamamos **solución madre, inicial o concentrada** a la que recibe el agregado de solvente, o sea la solución de la cual partimos. La solución que obtenemos después del agregado del solvente, la llamamos **solución resultante, final o diluída**. El volumen de la solución resultante será igual a la suma del volumen de la solución madre más el volumen de agua agregado. En la Figura 6.3, 100 ml de solución reciben el agregado de 100 ml de agua, como se puede ver la solución resultante está más diluída, aunque la cantidad de soluto permaneció constante.

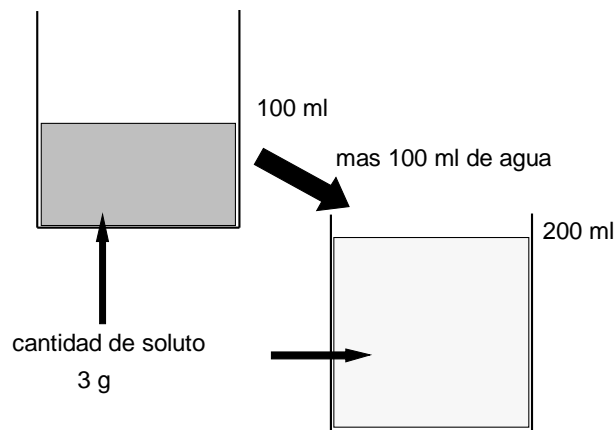


Figura 7.2

En el ejemplo anterior se dice que se realizó una dilución al medio o se diluyó dos veces: Se diluye dos veces cuando el volumen de la solución final es el doble de la inicial, en este caso la concentración será la mitad de la inicial. Si se hubiera diluido 7 veces o lo que equivale a hacer una dilución a 1/7, el volumen de la solución final sería 7 veces mayor y la concentración 7 veces menor.

Para calcular el número de diluciones realizadas se pueden aplicar la Ecuación 7.3 y la Ecuación 7.4

$$\text{número de diluciones} = \frac{\text{volumen solución diluída, } V_{\text{final}}}{\text{volumen de solución madre, } V_{\text{inicial}}}$$

Ecuación 7.3

$$\text{número de diluciones} = \frac{\text{concentración solución madre, } C_{\text{inicial}}}{\text{concentración solución diluída, } C_{\text{final}}}$$

Ecuación 7.4

7.7. Fraccionamiento de soluciones

Significa tomar una fracción o alícuota de la solución madre. En este caso cada fracción tendrá un volumen y cantidad de soluto menor que la madre, pero igual concentración. En el ejemplo de la figura

3.3, a partir de 200 ml de solución al 1,5% se toman dos fracciones de 100 ml; si el volumen total contenía 3 g ahora cada fracción tendrá 1,5 (menor cantidad), pero la concentración es la misma.

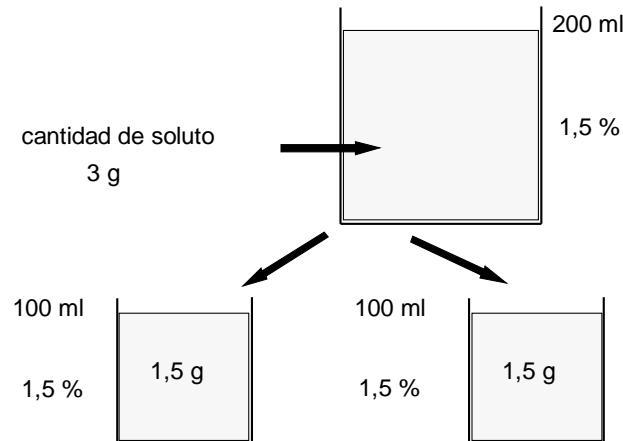


Figura 7.3

Dilución vs disolución: diluir una solución o hacer una dilución es agregar agua a una solución ya preparada. Disolver un soluto o hacer una disolución es agregar solvente a un soluto o bien agregar soluto a un solvente.

7.8. Preparación de una solución estándar a partir de patrón primario.

Un patrón primario es una sustancia que tiene composición química conocida, contenido de impurezas analizado y rotulado y además es estable y no higroscópica. Habitualmente cuando preparamos una solución intentamos hacerlo a partir de este tipo de drogas, aunque su costo es mayor que el de otras sustancias.

Pasos para preparar una solución.

- 1- definir las sustancias que se utilizarán como soluto y solvente
- 2- definir la exactitud requerida en la concentración
- 3- definir volumen y concentración de la solución
- 4- elegir materiales
 - soluto
 - solvente
 - pipetas (necesarias si el soluto ya está en solución)
 - material volumétrico para la preparación (probeta, matraz aforado, vaso de precipitación)
 - piseta
 - balanza
 - espátula
 - embudo
 - estufa
 - cristalizador
 - elementos para rotular de manera segura la solución

Veamos un ejemplo.

Debo preparar un estándar de NaF 1900 ppm

1- definir sustancia: ver droguero la existencia. Diferentes opciones.

Si existe copiar números y ver en el droguero o en la base de datos las calidades existentes. Que luego elegiré en función del punto 2.

2- definir exactitud de la concentración.

2.1. Sin necesidad de exactitud extrema. Por ejemplo, formol para conservar muestras, lavandina al 10% para desinfectar.

2.2. Exactitud intermedia. Por ejemplo reactivos que se agregan siempre en igual volumen en una prueba y se hallan en exceso con respecto al resto de los constituyentes. Por ejemplo reactivo para medir fosfato, buffer acético-acetato 2 M pH 5.5 para el ajuste de pH en la medida de fluoruro.

2.3. Estándares y soluciones QC. Estas soluciones deben ser preparadas a partir de patrones primarios, es decir drogas de calidad conocida, impurezas detalladas y estabilidad reconocida.

En este caso: La solución a preparar actuará como estándar para construir una curva de calibración para medidas de fluoruro en muestras biológicas. La exactitud y precisión debe ser máxima (no ahorrar ni mirar los errores, para todo usar lo más preciso)

3- definir volumen. El volumen se prepara en base a tres consideraciones:

3.1. ¿Cuánto voy a utilizar?

Se debe analizar el caso particular de uso. el NaF 1900 ppm se utilizará como testigo en una curva de calibración. Cada vez que se mide se utilizan 0,2 ml (0,1 por duplicado). Por lo tanto si preparáramos 100 ml tendríamos para 500 determinaciones. Considerando además que a partir de esta solución puedo preparar por dilución los otros estándar, 100 ml sería un volumen adecuado. Midiendo 1-2 veces por semana tendríamos solución para 1-2 años.

3.2. ¿qué estabilidad tiene la solución preparada?

El NaF en agua es estable, aun mas en esta concentración ya que el NaF es un inhibidor de vías metabólicas como la glucólisis. Es poco probable que se contamine. Además a pH neutro y en frasco plástico es más estable aun, ya que aunque lentamente el fluoruro puede reaccionar con el vidrio.

3.3. ¿Qué elementos tengo para prepararla?

He decidido preparar 100 ml. Dispongo de material adecuado?

4. Elección del material

4.1. la solución actuará como testigo. La pureza de la droga debe ser la máxima y conocida.

4.2. Utilizaré matraz aforado

4.3. balanza apreciación 0,0001 g

4.4. recipiente para pesar y espátula

4.5. embudo

4,6. piseta

4,7. agua destilada

4.8. recipiente para colocar la solución preparada

4.9. elementos de rotulación

4,10. estufa

4.11. cristalizador

Proceda según se indica en los pasos siguientes

1. busque en el droguero la sustancia
2. observe la pureza
3. haga los cálculos de la cantidad a pesar
4. coloque una cantidad ligeramente mayor en un cristalizador

5. colóquelo en el horno de esterilización o estufa 1 h a 105°C
6. retírelo y pese la cantidad deseada en un recipiente tarado previamente, en la balanza adecuada
7. pase con pisete con agua a través de un embudo al matraz aforado. El embudo debería tener un vástago que sea más largo que el aforo.
8. agregue agua a través del embudo sin mojar las paredes.
9. Cuando esté cerca del aforo, retire el embudo sin mojar paredes.
10. afore con pipetas, sin mojar paredes (por qué?)
11. tape
12. agite por inversión
13. tome el recipiente de almacenaje (por supuesto limpio).
14. Coloque un pequeño volumen de la solución en él. Enjuague el recipiente y descarte esa solución
15. coloque el resto de la solución
16. tape y guarde de acuerdo a la conveniencia.

7.9. Preparación de soluciones a partir de drogas impuras

Ya se han visto las formas de preparación de soluciones y la forma de obtener una solución ya sea a partir de una droga sólida o de una solución stock.

En esta clase veremos los recaudos a tener a la hora de preparar una solución a partir de una sustancia impura o a partir de drogas de baja estabilidad.

Drogas impuras

Llamamos droga impura a aquella que tienen un porcentaje de impurezas conocidas, de tal manera que la droga que nos interesa no es el 100 % de la masa.

Para preparar una solución deberemos tener en cuenta dichas impurezas.

Ejemplo 1

Preparar 200 ml de una solución de NaCl al 2 %P/V, a partir de una droga de 98% de pureza.

¿Qué implica el 98% de pureza?

Indica que cada 100 g de la droga solo 98 g son de NaCl

Procedamos al cálculo entonces

100 ml debemos tener 2 g NaCl

como deseo preparar

200 ml deberemos tener x = 4 g NaCl

La droga que disponemos contienen

98 g de NaCl están contenidos en 100 g de la droga

4 g de NaCl que necesitamos..... estarán contenidos en x = 4,08 g de droga

Por lo tanto deberemos pesar 4,08 g de la droga, colocarlos en 200 ml de solución y de esta manera la solución tendrá una concentración de NaCl del 2 % P/V

Ejemplo 2

Deseamos preparar 500 ml de una solución 1 %P/V de MgCl₂, y lo haremos a partir de una droga de 100% de pureza pero que la sustancia es MgCl₂.6 H₂O.

peso molecular del MgCl₂: 95

SOLUCIONES

peso molecular del $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 203

100 ml debemos tener 1 g de MgCl_2
500 ml tendremos $x = 5$ g de MgCl_2

como

95 g de MgCl_2 están contenidos en 203 g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
5 g de MgCl_2 estarán contenidos en $x = 10,68$ g de sal hexahidratada

Por lo tanto colocaremos 10,68 g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 500ml de solución y la misma tendrá una concentración de 1 % P/V.

Ejemplo 3

Deseamos preparar 500 ml una solución 0.4 % P/V de NaOH y disponemos de una droga cuya pureza no conocemos pero tenemos cierta aproximación.

En estos casos se debe preparar la solución y luego titularla con una sustancia de pureza conocida y estable.

Supongamos que partimos de un hidróxido de sodio que aproximadamente es un 80% de pureza.

100 ml debemos tener 0,4 g de NaOH
500 ml tendremos $x = 2$ g de NaOH

teniendo en cuenta la pureza

80 g de NaOH estarán en 100 g de la droga
2 g de NaOH estarán en: 2.5 g de droga.

Pesamos entonces 2.5 g de la droga y los colocamos en 500 ml de solución. De esta manera es aproximadamente 0,4 % P/V.

Ahora la titularemos con un patrón primario. Para este caso se suele utilizar el biftalato de potasio. Supongamos que tenemos esta droga con 100% de pureza (peso molecular 204.22)

Nuestra solución tiene 0,4 g en 100 ml.

La reacción que se produce es

biftalato de potasio + NaOH -----> ftalato de sodio y potasio + agua
204,22g 40 g

si quisiéramos hacer reaccionar 1 ml de nuestra solución, ¿cuanto biftalato requeriríamos?

100 ml de nuestra solución contienen 0,4 g
1 ml contienen $x = 0,004$ g

como

40 g de NaOH reaccionan con 204,22 g
0,004 g reaccionarán con $x = 0,020422$ g de biftalato.

SOLUCIONES

Entonces pesamos esa cantidad, la colocamos en un vaso de precipitación y agregamos nuestra solución controlando el volumen, hasta que el $\text{pH} = 7$. En ese punto, la reacción habrá sido completa y controlamos el volumen gastado.

Supongamos que gastamos 0,93 ml

Entonces

0,93 ml tenemos 0,004 g

100 ml tendremos $x = 0,43$ g

por ende nuestra solución tiene una concentración de 0,43 % P/V

Práctica

- 1). Se disuelven 5 g de HNO_3 (peso molecular 63) en 3500 ml de agua. A esta solución se le agrega agua hasta un volumen final de 7500 ml. Calcular la M de la solución final.
- 2). Se disuelven 0,55 moles de HCl (peso molecular 36,5) en 700 ml de agua. Calcular la concentración de la solución final expresada en g% .
- 3). Calcular la molaridad de la solución que se obtiene al disolver 0,8 equivalentes de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ en 1500 ml de agua. Peso molecular $\text{Ca}(\text{OH})_2 = 74$.
- 4). Calcular la Normalidad de la solución que se obtiene al disolver 0,8 g de KOH en 500 ml de agua. Peso molecular $\text{KOH} = 56$.
- 5) Hallar la normalidad de una solución de ácido sulfúrico puro que tiene una densidad de 1,84 g/ml y una concentración de 96 %P/P.

Respuestas

1- 0,0106 M

2- 2,87 g%

3- 0,267 M

4- 0,029 N

5- 36,05 N.

8. INSTRUMENTAL

El instrumental de laboratorio es una de las partes claves de todo trabajo de investigación. El conocimiento de su funcionamiento así como su funcionamiento son claves para la correcta realización de un experimento y la confiabilidad de los resultados.

Las balanzas y micropipetas son elementos básicos de laboratorio que no escapan a ningún proyecto de investigación. Contrariamente otros instrumentos como espectrofotómetros, equipos de electroforesis, electrodos, contadores de centelleo, etc, tienen aplicaciones más específicas.

Debido a esta extensa participación en los proyectos, estos equipos deben ser controlados periódicamente, dado que su mal funcionamiento afecta al conjunto del laboratorio.

8.1. Micropipetas

Las micropipetas o micropipetas automáticas son dispositivos de medida de volumen, de las cuales las hay de volumen fijo o regulable.

Precauciones para su uso:

1- Volumen: al utilizar asegurarse que ha interpretado adecuadamente el volumen que emite y qué tip (dispositivo plástico que se coloca en el extremo) se debe utilizar. El volumen puede estar escrito en el costado o en la parte superior. En algunos casos se indica la unidad y en otros no. Por ejemplo si la indicación es 200-1000, se sobreentiende que es μl (microlitros) y es regulable entre esos volúmenes.

2- Apreciación. La apreciación es la menor división que puede medir. Para las pipetas de volumen fijo, no existe este valor. Para las de volumen variable sí. En estas pipetas la apreciación se puede observar en la ventana que muestra los números que cambian al girar en un sentido o el contrario, el botón superior, que se utiliza para cargar y para emitir el volumen. Por ejemplo: si al girar el botón, el número cambia de 23 a 24 y la pipeta tenía un rótulo 10-50. Éste último nos indica que sirve para emitir volúmenes entre 10 y 50 μl y que la apreciación es 1 μl .

3- Carga y descarga del volumen. La mayoría de las micropipetas en uso tiene dos toques al oprimir el botón de la parte superior. Para la carga se deben seguir los siguientes pasos:

1. asegurarse de haber elegido la pipeta adecuada al volumen y apreciación.
2. asegurarse de haber elegido el tip adecuado y que esté bien colocado. No debe quedar flojo.
3. destapar el recipiente de donde se pipeteará.
4. sin haber sumergido el tip en la solución, oprimir el botón hasta el primer toque.
5. sumergir el tip en la solución.
6. observando la posición del tip en la solución, soltar suavemente el botón de manera de absorber la solución, que quedará en dentro del tip.
7. retirar el tip del recipiente. Si quedara alguna gota externa de líquido eliminarla tocando el borde interno de la boca del frasco o bien secarla con un papel absorbente. (no tocar con el papel la punta, ya que absorberá parte del contenido interno).
8. colocar el tip en el recipiente que recibirá el volumen. No tocar la solución existente en el recipiente (Hay situaciones especiales donde sí debe hacerse esto). Puede descargarse tocando la pared del recipiente o no, dependiendo de la situación. Asegurarse en cada caso.
9. oprimir lentamente el botón hasta el primer toque. Cuando más viscoso el líquido más lento

se debe oprimir el botón.

10. oprimir rápidamente el botón hasta el segundo tope, eliminando el líquido remanente en la punta del tip.

11. retirar el tip del recipiente, descartarlo con el botón de eliminación de tip, en caso que la micropipeta lo posea.

4- Precisión y exactitud de las micropipetas. A diferencia de otros equipos utilizados en el laboratorio, estos no tienen un QC y no se calcula el CV%. ¿Cómo puede ser tratándose de un instrumento tan importante en el laboratorio?. Muy sencillo, hay alguien que lo hace por usted a intervalos de tiempo establecidos.

Si usted sospecha que la precisión y/o la exactitud no son las adecuadas, se debe sacar de circulación y comunicar el problema.

Aunque existe un encargado del control de la micropipetas es bueno saber como se hace dicho control.

Calculo de precisión. Se utiliza una balanza de precisión, habitualmente una de apreciación 0,1 mg.

Se pesa un contenedor vacío y luego se va agregando agua destilada con la micropipeta y se toma cada peso. Se repite este procedimiento al menos cinco veces. Veamos un ejemplo. Supongamos que probamos precisión y exactitud de una micropipeta Boeco 100-1000. En el caso de las regulables podemos hacer la prueba para diversos volúmenes, siendo lo más común que se pruebe en un volumen medio, por ejemplo 500 ul. Con la balanza obtenemos los siguiente datos y se tiene en cuenta que la densidad del agua es 0,99829 g/ml

	gramos	g agua	volumen (ml)	volumen (ul)
contenedor	3,2562			
contenedor + 1 pipeteada	3,7578	0,5016	0,500742264	500,742264
contenedor + 2 pipeteada	4,2461	0,4883	0,487465007	487,465007
contenedor + 3 pipeteada	4,767	0,5209	0,520009261	520,009261
contenedor + 4 pipeteada	5,25	0,483	0,48217407	482,17407
contenedor + 5 pipeteada	5,7444	0,4944	0,493554576	493,554576
SD			0,0147122682	14,712268181
media			0,4967890356	496,7890356
Precisión (CV%)			2,9614719985	2,9614719985
inexactitud			0,64219288	0,64219288

En este caso CV% se calcula como

$$CV\% = \frac{\text{desvío estándar} * 100}{\text{media}}$$

Ecuación 8.1

y la inexactitud con la fórmula

$$\text{inexactitud} = \frac{ABS(\text{media} - \text{valor de volumen elegido}) * 100}{\text{valor de volumen elegido}}$$

Ecuación 8.2

El CV% (precisión) y la inexactitud deben ser menores al 10%

Si esto no ocurre se realiza la calibración y ajuste necesario, a cargo de un responsable del proceso.

5- cuidados de la micropipeta:

- no las golpee.
- si se le cayó o golpeo avise al encargado de la calibración o a su superior.
- maneje los tips como se debe de acuerdo al lavado o descarte. Tips azules y amarillos se descartan luego del uso. Tips blancos tienen recipientes para lavado.
- aspire la solución con lentitud manteniendo el tip dentro de la solución. De no ocurrir esto puede introducirse líquido dentro de la micropipeta. Comuníquelo a su superior o el responsable. La micropipeta deberá ser desarmada inmediatamente y limpiada. El líquido siempre debe quedar en el tip y no llegar hasta la micropipeta.

Ejercicios

1- Analice la siguiente tabla.

temperatura de calibración 20 °C				
densidad agua: 0,99829 g/ml				
pipeta 10-200				
volumen elegido de la micropipeta 100				
	gramos	g agua	volumen (ml)	volumen (ul)
contenedor	3,2562			
contenedor + 1 pipeteada	3,356	0,0998	0,099629342	99,629342
contenedor + 2 pipeteada	3,4421	0,0861	0,085952769	85,952769
contenedor + 3 pipeteada	3,5701	0,128	0,12778112	127,78112
contenedor + 4 pipeteada	3,656	0,0859	0,085753111	85,753111
contenedor + 5 pipeteada	3,735	0,079	0,07886491	78,86491
SD			0,0195061115	19,506111461
media			0,0955962504	95,5962504
CV%			20,404682589	20,404682589
inexactitud			4,4037496	4,4037496

8.2. Balanzas

Existen en el laboratorio dos tipos de balanzas. Las mecánicas y electrónica.

Precauciones para su uso:

- Asegúrese primero del error máximo permitido de lo que desea pesar
- elija la balanza adecuada a tal fin. Asegúrese del peso máximo permitido de cada balanza, no debe ser superado. En caso que por error lo superó, comuníquelo a su superior.
- aquellas balanzas que tienen QC (Mettler de apreciación 0,0001 g) el mismo debe ser pesado dos veces y calculado el UDS y CV%
- deje las balanzas limpias, tapadas o cerradas en los casos que corresponda.

Elección de la balanza adecuada.

En la tabla siguiente se indican tres situaciones de pesadas, indicadas como pesada 1, 2 y 3, el valor en gramos de cada una y el error máximo aceptable. La tabla también tiene las balanzas disponibles, su carga máxima y su apreciación. ¿Qué balanza utiliza en cada caso?

pesada			1	2	3
valor a pesar (en gramos)			0,025	0,758	15,23
error requerido			<1%	<1%	<1%
balanza	carga máxima (g)	apreciación (g)	error con cada balanza	error con cada balanza	error con cada balanza
Ohaus	2000	1	4000	131,926121372	6,5659881812
Ohaus	500	0,1	400	13,1926121372	0,6565988181
Ohaus	200	0,1	400	13,1926121372	0,6565988181
Ohaus	100	0,001	4	0,1319261214	0,0065659882
Mettler	125	0,0001	0,4	0,0131926121	0,0006565988
Mettler	25	0,00001	0,04	0,0013192612	0,0000656599

8.3. Elección de un instrumento de medición

Reglas a tener en cuenta

Regla 1: debemos recordar que al aumentar la apreciación de un instrumento, aumenta su precio y su fragilidad. Por lo tanto, no tenemos que utilizar siempre el de mejor apreciación, sino el acorde al trabajo.

Regla 2: La elección de una pipeta está en función en primer lugar de la disponibilidad, luego del volumen a medir y finalmente de la apreciación (que surgirá del análisis de errores).

Regla 3: la elección de una balanza está en función de los mismos elementos a tener en cuenta en la regla 2.

8.3.1. Elección de micropipetas

1- Tengo que medir un volumen de 0,275 ml

Dispongo de las siguientes pipetas

marca	volumen	código
Boeco	5ul	9080102
Boeco	1-5ml	10005210
Boeco	200-1000	C053284
Boeco	100-1000	CS52628
Gilson	2-20	R66425A
Boeco	10-100	CS67723
Boeco	5-50	CQ45944
Boeco	50-200	CRO1927
Boeco	10-100	CQ29258
Paralwall	10-100	0113918
Paralwall	100-1000	O113900
Paralwall	100-1000	0103403
Eppendorf	200ul	
Eppendorf	50ul	
Micropar	10ul	
EPA	10ul	
Paralwall	10-100	0091621
Paralwall	5-50	0152025

Paralwall 1-5 ml

Analicemos el dato a medir: 0,275 ml.

1- La pipeta tendrá que tener más de 0,275 ml= 275 ul

2- debería apreciar al menos de a 0,005 ml = 5 ml

Entonces procedemos

1- primero seleccionamos por volumen, en base a esto nos quedaríamos con las siguientes

marca	volumen	código
Boeco	200-1000	C053284
Boeco	100-1000	CS52628
Paralwall	100-1000	O113900
Paralwall	100-1000	0103403

2- deberíamos ver la apreciación. Esta la leemos en la escala móvil y veremos si puede apreciar 5 ul
 Por ejemplo si una pipeta al girar el botón superior pasa de 250 a 255, su apreciación es 5 ul, pero si pasa de 250 a 251 es 1 ul.

3- Tener en cuenta el error.

Supongamos que estamos colocando dos reactivos líquidos:

Colocamos 275 ul de una reactivo y 5 ml de otro

Para medir 5 ml utilizamos una pipeta de 1-5 ml con apreciación 0,1 ml (error absoluto).

El volumen resultante será teóricamente 5,275 ml

¿Cuál será el error en el volumen resultante ? Como el volumen final surge de la suma

error absoluto = 0,1 + error de nuestra pipeta = ??

Si tuviéramos hipotéticamente 3 pipetas para medir los 275 ml con las siguientes características

volumen(ul)	apreciación(ul)
100-1000	1
100-1000	5
100-1000	10

el error absoluto en las mediciones utilizando cada pipeta sería

error absoluto = 0,1 + 0,001= 0,101

error absoluto = 0,1 + 0,005= 0,105

error absoluto = 0,1 + 0,01 = 0,11

No ha cambiado mucho el error final del procedimiento y por lo tanto cual usaríamos. Aplicamos la Regla 1. Utilizar la acorde: en este caso es prácticamente lo mismo utilizar cualquiera por lo tanto utilizamos la tercera, es decir la de menor apreciación.

Conclusión: no aumentará la precisión de su medición final, si entre las mediciones hay una que tiene un límite de precisión. Siempre determina la elección de los materiales aquel instrumento de mayor error.

8.3.2. Elección de balanza

La tabla siguiente muestra las balanzas de nuestro laboratorio

balanza	carga máxima (g)	apreciación (g)
Ohaus	2000	1
Ohaus	500	0,1
Ohaus	200	0,1
Ohaus	100	0,001
Mettler	125	0,0001
Mettler	25	0,00001

Ejercicio

Supongamos que tiene que pesar cenizas óseas obtenidas en un proceso de calcinación y las mismas estarán en el rango 0,01-0,1 g. ¿Que balanza utilizaría?

Primer pregunta que me hago: ¿Con qué error lo quiero hacer?

Pues bien: lo quiero hacer con un error relativo del 1%

Entonces recuerdo la fórmula de error relativo

$$E_R \% = \frac{\text{apreciación instrumento} * 100}{\text{medida a realizar}}$$

para nuestro caso, dado el intervalo de medida, por ejemplo tomo un valor intermedio: 0,05 g.

$$1 \% = \frac{\text{apreciación instrumento} * 100}{0,05 \text{ g}}$$

apreciación instrumento = 0,0005 g

¿Cual uso?

La balanza tendrá que poder soportar más de 0,1 g y tener una apreciación igual o menor que 0,0005 g. Por ende la más adecuada es la Mettler de 125 g de capacidad y apreciación 0,0001 g.

Sería un derroche utilizar la mettler de 25 g apreciación 0,00001g y cometeríamos un error mayor si utilizáramos cualquiera de las de apreciación mayor a 0,0001.

8.4. Centrífugas

Una centrífuga es un instrumento utilizado para aumentar la fuerza de gravedad sobre las partículas aumentando su velocidad de sedimentación.

8.4.1. Calculo de la fuerza centrífuga.

La fuerza centrífuga se expresa habitualmente en g, es decir cuantas veces mayor que la aceleración de la gravedad es esta fuerza. Habitualmente cualquier cuerpo está sometido a una aceleración de la gravedad y por lo tanto una fuerza (el peso) que hace que el cuerpo se acelere y caiga hacia la tierra.

En las centrífugas se origina una fuerza sobre las partículas libres, alejándolas del eje de la centrífuga. Así, al colocar un tubo con una solución, las partículas tienden a acelerarse y dirigirse hacia el fondo del tubo.

Esta fuerza se calcula con la Ecuación 8.3

$$xg = 0,00112 * \text{radio (en metros)} * \text{rpm}^2$$

Ecuación 8.3.

xg: es la cantidad de veces mayor que es la fuerza centrífuga respecto de la fuerza de gravedad.

radio. Es la distancia desde el centro (eje de la centrífuga) al tubo de centrífuga, medido de manera perpendicular al radio. Debe tener en cuenta que la fuerza centrífuga siempre es mayor en la base del tubo que la superficie del líquido.

rpm: son las revoluciones por minutos que usted fija al realizar el procedimiento.

Ejemplo:

si tenemos una centrífuga cuyo radio es 10 cm (0.1 m) y centrifugamos a 5000 rpm, ¿Cuántas veces mayor es la aceleración de una partícula comparado con la gravedad?

$$n^{\circ} g = 0,0012 * 0,1 \text{ m} * 5000^2 = 3000 \text{ g}$$

Este valor indica que cuando se realice la centrifugación se aplicarán fuerzas 3000 veces mayor que la aceleración de la gravedad.

8.4.2. Tipos de centrífugas

Por el tipo de tubos

1. Tubos Eppendorf
2. b- Tubos de centrífuga
3. c- Tubos de 50 ml
4. d- microhematocrito

Por el ángulo

1. fijo: el tubo permanece en la misma posición y el precipitado se deposita en pared-fondo
2. móvil: el tubo se pone horizontal y el precipitado se deposita en el fondo.

Por la refrigeración

1. refrigerada: permite fijar la temperatura.
2. sin refrigeración.

8.4.3. Precauciones y modo de uso

1. Infórmese a cuantas rpm o g debe centrifugar.
2. haga el cálculo de rpm o g según corresponda.
3. Coloque el selector de velocidad en 0.
4. equilibre los tubos. Utilice balanza para centrífuga o balanza acorde al peso. Use tubos para contrapeso con agua.
5. cargue y descargue con la centrífuga apagada y en lo posible desenchufada.
6. Coloque los tubos de igual peso diametralmente opuestos.
7. cierre la centrífuga antes de encender. La mayoría no anda si no están cerradas.
8. enchúfelas en fuentes eléctricas seguras con disyuntor y térmica.
9. Coloque el timer en el tiempo deseado de centrífuga.
10. de arranque a la centrífuga con el botón on-off (si lo tiene), en caso contrario suba la velocidad lentamente hasta el valor deseado (la velocidad está expresada en rpm).
11. Espere a que termine el tiempo de centrifugado y se detenga la centrífuga. Nunca abra la centrífuga en funcionamiento! Las partes móviles se mueven a cientos de Km/h!!! Puede sufrir accidentes fatales y amputaciones.
12. apague y desenchufe.
13. Abra la centrífuga.
14. retire los tubos con cuidado para que no se resuspenda el precipitado.
15. seque y limpie interna y externamente la centrífuga después de usarla.
16. Nunca llene los tubos hasta el borde, deje un espacio razonable entre el límite del líquido y la boca del tubo.
17. Si el tubo no es suficientemente grande pase a una centrífuga más grande.

8.5. Centrífugas disponibles en el laboratorio

Sorvall tubos 1 ml, 3 ml, 10 ml, 50 ml. ángulo móvil.

Microhematocrito cavour: microhematocrito, ángulo fijo.

Eppendorf: ángulo fijo.

Para tubos de centrífuga ángulo fijo.

Refrigerada: tubos Eppendorf, 10 ml y 50 ml ángulo fijo.

ultracentrífuga: Eppendorf, 3 ml, 10 ml y 50 ml.
Eppendorf y microhematocrito: ángulo fijo.

9. PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

Todo trabajo de investigación tiene al menos los siguientes pasos

- 1- fenómeno natural que llama nuestra atención y reclama el entendimiento y explicación.
- 2- formulación de una hipótesis
- 3- planteo de objetivos
- 4- diseño de los materiales, métodos y experimentos para probar nuestra hipótesis
- 5- realización de los experimentos y obtención de datos
- 6- visualización de los datos
- 7- análisis de los resultados
- 8- elaboración de conclusiones aceptación de la hipótesis o refutación de la misma
- 9- Conclusiones y discusión de los resultados en el entorno del conocimiento existente.

En este capítulo veremos la forma de visualizar los resultados. La forma que utilizaremos para presentar los resultados experimentales dependerá de los propios resultados.

En general se utilizan estadísticas descriptivas para mostrar nuestros resultados y asociamos a ellas el significado estadístico de la diferencia, si lo hubiere, utilizando el error de tipo I.

Puntos a tener en cuenta:

- 1- ¿Los datos son medidas de una variable continua o categórica?

Si los datos corresponden a variables continuas deberemos primero ver si la distribución de la misma corresponde a una población normal o no (ver punto 2).

Si los datos corresponden a una distribución categórica, lo más adecuado será mostrar porcentajes, razones o proporciones.

- 2- Si los datos corresponden a una variable continua ¿tienen distribución normal o no?

Si los datos tienen distribución normal el común que representemos la media \pm desvío estándar. En cambio si la distribución no se puede afirmar que sea normal se recurre a graficar: mediana, rango y cuartiles.

supongamos las siguientes tablas de datos

- 1) medidas de la concentración de F en orina de dos grupos diferentes de animales (muestras independientes)

fluorppm1	fluorppm2
3	1
8	2
11	3
4	2
5	1
9	2
3	1
2	2
8	3
7	4
5	5

Secuencia de análisis, comparación y gráfica

- 1- test de normalidad
- 2- se pueden considerar muestras de poblaciones normales?
 - SI-
 - calcular media y SD y graficar

PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

barras con SD
puntos con SD
NO-
calcular mediana, rango y cuartiles y graficar
cajas con mediana, cuartiles y rango

3- se pueden considerar muestras de poblaciones normales? calcular diferencias entre grupos
SI- t de student datos independientes
NO- t de Mann Whitney

veamos los códigos y análisis
> shapiro.test(uno\$fluorppm1)
Shapiro-Wilk normality test
data: uno\$fluorppm1
W = 0.94937, p-value = 0.636

> shapiro.test(uno\$fluorppm2)
Shapiro-Wilk normality test
data: uno\$fluorppm2
W = 0.88654, p-value = 0.1259

> mean(uno\$fluorppm1)
[1] 5.909091
> mean(uno\$fluorppm2)
[1] 2.363636
> sd(uno\$fluorppm1)
[1] 2.879394
> sd(uno\$fluorppm2)
[1] 1.286291

> t.test(uno\$fluorppm1, uno\$fluorppm2)
Welch Two Sample t-test
data: uno\$fluorppm1 and uno\$fluorppm2
t = 3.7287, df = 13.838, p-value = 0.002288
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
1.503829 5.587081
sample estimates:
mean of x mean of y
5.909091 2.363636

hacemos la gráfica y mostramos la diferencia entre los grupos

Expresión del resultado: La concentración de flúor en el grupo 1 ($5,90 \pm 2,88$) fue significativamente mayor que la concentración de flúor en el grupo 2 ($2,36 \pm 1,29$), $p < 0,05$, t de Student datos independientes.

2) medidas de la concentración de F en orina de un mismo animal ante dos tratamiento diferentes

PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

muestra	fluorppm1	fluorppm2
1	3	1
2	8	2
3	11	3
4	4	2
5	5	1
6	9	2
7	3	1
8	2	2
9	8	3
10	7	4
11	5	5

Secuencia de análisis, comparación y gráfica

1- test de normalidad

2- se pueden considerar muestras de poblaciones normales?

SI- calcular media y SD y graficar

barras con SD

puntos con SD

NO- calcular mediana, rango y cuatilos y graficar

cajas con mediana, cuatilos y rango

3- se pueden considerar muestras de poblaciones normales? calcular diferencias entre grupos

SI- t de student datos dependientes

NO- t de Wilcoxon

```
> shapiro.test(a$fluorppm1)
```

Shapiro-Wilk normality test

```
data: a$fluorppm1
```

```
W = 0.94937, p-value = 0.636
```

```
> shapiro.test(a$fluorppm2)
```

Shapiro-Wilk normality test

```
data: a$fluorppm2
```

```
W = 0.88654, p-value = 0.1259
```

```
> mean(a$fluorppm1)
```

```
[1] 5.909091
```

```
> mean(a$fluorppm2)
```

```
[1] 2.363636
```

```
> sd(a$fluorppm1)
```

```
[1] 2.879394
```

```
> sd(a$fluorppm2)
```

```
[1] 1.286291
```

hacemos la gráfica y mostramos los resultados

PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

3) medida de la concentración de F en orina a lo largo del tiempo

t	ppm
0	3
1	8
2	11
3	4
4	5
5	9
6	3
7	2
8	8
9	7
10	5

Secuencia de análisis, comparación y gráfica

1- test de normalidad

2- grafica y vs x

3- gráfica de regresión lineal o no lineal

4- se pueden considerar muestras de poblaciones normales?

SI- correlación de Pearson

NO- correlación de Spearman

4) cantidad de animales que sufrieron fluorosis (SI – NO) de acuerdo al tratamiento que recibieron (T1 o T2)

tabla	si	no
t1	20	5
t2	2	31

Secuencia de análisis, comparación y gráfica

1- gráfico de barras o tortas

3- test de proporciones

Chi cuadrado

10. ESCRITURA DE UN TRABAJO REALIZADO

Cuando haya finalizado su trabajo seguramente lo deberá escribir en un procesador de texto. El ordenamiento y uso de los recursos es importante para ahorrar tiempo y aumentar la eficiencia. Aquí tiene algunos consejos y recursos (Un vídeo puede ayudarle al respecto [haga click aquí](#))

1- Al escribir un texto se debe seleccionar el tipo a trabajar por ejemplo Times New Roman y el tamaño del mismo, por ejemplo 12. Los formatos recomendados son arial 10 o Times New Roman 12.

2- Es conveniente no abusar del formato, solo **negrita** para algunos títulos o bien subrayado.

3- En caso de estar preparando un trabajo no utilizar justificación completa, sangrías ni tabuladores. También es recomendable trabajar a un espacio sin separación especial entre párrafos. Se debe elegir los niveles de títulos y subtítulos, los que permitirán hacer una tabla de contenidos en forma automática

4- Al presentar el trabajo finalizado: seleccionar todo el documento colocar justificación completa e introducir entre párrafos una separación mínima para su mejor lectura y aspecto.

5- Si se desea introducir número de página se debe introducir un "header" o "footer" dependiendo si el número de página irá arriba o abajo.

6- En el texto se irán introduciendo referencias bibliográficas, las que normalmente se colocan como nota al final.

7- Algunas aclaraciones que no se desean estén en el texto se pueden colocar como notas al pie.

8 -Las referencias cruzadas son una herramienta importante, permiten citar dos veces a una misma referencia bibliográfica o hacer referencia a figuras, tablas, etc.

9- Las tablas se insertan con la herramienta "insertar tabla". Se debe elegir el número de filas y columnas, pudiéndose unir algunas celdas para escribir título, detalles etc. Para numerar la tabla posiciónese sobre ella oprima botón derecho y coloque insert caption. De esta manera la tabla tendrá un número que actuará como un vínculo pudiendo hacerse referencias cruzadas.

10- Para insertar una figura, utilice insertar figura y luego haciendo click en el boton derecho coloque insert caption. Este creará un marco y colocará a la figura una leyenda con un número que actuará como un vínculo actualizable en caso que se desee hacer una referencia cruzada.

11- El anclaje de los objetos (por ejemplo figuras) es un punto importante. Existen diferentes formas de anclaje: al párrafo, a la hoja, al carácter. El anclaje al párrafo determina que el objeto se mueva con el párrafo, el anclaje a la hoja deja el objeto en el mismo lugar aun cuando se mueva el texto y el anclaje a caracter hace que el objeto se mueva con el texto sin cambiar de posición respecto de este. Es el recomendable en documentos complejos con muchas gráficas

12- bookmarks: son marcas que podemos incluir en un texto de manera de hacer hipervínculos que nos permitan volver a ese sitio a lo largo del texto

13- hipervínculos en el documento. Permite hacer vínculos a figuras, fórmulas, tablas, etc. Al hacer click en el hipervínculo nos desplazamos automáticamente a ese sitio.

14- secciones: las secciones son importantes cuando se desean hacer documentos grandes a partir de muchos más pequeños o bien para introducir en el header del documento algún texto como por ejemplo las secciones del documento.

15- niveles de títulos: Existen diferentes niveles que se fijan con la herramienta correspondiente. Son útiles ya que permiten luego hacer una tabla de contenidos, introducir en el header o footer las sección del documento.

16- índices alfabéticos. Son índices que tienen las palabras más importante de nuestro documento y la página donde se hallan, de esta manera en documentos grandes hace fácil la búsqueda

17- Tablas de contenidos: habitualmente se hallan al inicio de documentos grandes y permite visualizar los diferentes niveles de títulos y si se desea se pueden colocar como hipervínculo de

ESCRITURA DE UN TRABAJO REALIZADO

manera que al hacer click se acceda a la sección.

11. PUESTA A PUNTO DE UNA TÉCNICA DE MEDICIÓN

La medición es una práctica habitual, necesaria y elemental de un trabajo de investigación. Si lo que se estudia no se puede medir por alguna metodología carecerá de posibilidades de análisis.

A la hora de medir nos tenemos que hacer diversas preguntas y hallar rápidamente la respuesta para encarrilar el mecanismo.

Pregunta 1

¿La variable que mediremos será:

- una variable continua?. Ej. la concentración de arsénico en agua, la acidez titulable de una gaseosa, etc.
- una variable cualitativa. la cantidad de individuos que consumen coca cola de una población, la presencia o no de fluorosis, etc.

Pregunta 2

¿Disponemos de instrumento/s de medición?

Pregunta 3. Si es una variable cuantitativa tenemos diversas opciones

- concentraciones: técnicas espectroscópicas (espectrofotometría, fotometría de llama, espectroscopía de absorción atómica)
- concentraciones: áreas bajo la curva de cromatografías
- concentraciones: densidades ópticas de bandas de electroforesis
- concentraciones: titulaciones
- concentraciones: potenciometría (electrodos)
- masas: gravimetría (balanzas)
- superficies y longitudes: software manejos de imágenes

Pregunta 4. ¿Cuál es la variables que mediré de la muestra y que relación guarda con la propiedad que estoy midiendo? Por ejemplo si quiero medir la concentración de flúor en solución, mediré el voltaje desarrollado por un electrodo. Si deseo medir la concentración de fosfato en agua, mediré la intensidad de un color desarrollado por un reactivo en presencia de fosfato. Si deseo medir la cantidad de un péptido en una muestra por cromatografía mediré el área bajo la curva de un trazado de voltaje en función del tiempo, etc.

Pregunta 5. ¿La propiedad que mediré es específica de la variable que deseo estudiar? ¿En otras palabras, existen interferencias en nuestra medición?

Pregunta 6. Disponibilidad de patrón, testigo o estándar de la sustancia a medir

siempre que se realiza una medición se compara una propiedad medida en un estándar con la misma propiedad medida en la muestra.

Disponer de un estándar, implica tener una sustancia de calidad analítica reconocida y confiable. Dichas sustancias se compran o bien pueden existir en el droguero. La disponibilidad de una sustancia no garantiza que la misma pueda servir como estándar. No es necesario que sea de alta pureza, sino más bien que su grado de pureza sea perfectamente conocido y que la estabilidad de la sustancia sea alta y conocida. No puedo utilizar como patrón una sustancia que se descompone con el transcurso del tiempo.

Pregunta 7. ¿Cuál es el rango dinámico en que funciona mi equipamiento para medir la propiedad?

PUESTA A PUNTO DE UNA TÉCNICA DE MEDICIÓN

Es decir entre que valores de concentración mi equipamiento muestra valores diferentes de la propiedad medida.

Pregunta 8: ¿Cuál es el límite de detección de la técnica y cual es la concentración que deseo medir? el límite de detección es la menor concentración que puedo medir con mi metodología. En general, si deseamos medir algo que está por debajo del límite, no lo podremos hacer directamente y necesitaremos otras metodologías asociadas.

Pregunta 9: ¿Cuál es la sensibilidad de nuestra técnica y cuales son las diferencias que puedo alcanzar entre los grupos experimentales que estoy estudiando?

La sensibilidad se interpreta como el menor valor que debe tener una concentración para que el instrumento lo detecte como diferentes. Habitualmente podemos interpretarlo como el error aleatorio del instrumento. Por ejemplo si nuestro instrumento tiene un error aleatorio del 10% no podremos distinguir valores de la propiedad entre dos grupos si ellos no difieren en mas del 10%. Como se corrige este problema? Disminuyendo el error del instrumento o aumentando la diferencia entre los grupos experimentales.

11.1. Escalado de una técnica de medición

Escalar una técnica es adaptarla para medidas en la que la cantidad de muestra y reactivos utilizados varía, en general de manera proporcional. Habitualmente escalamos una técnica de manera de utilizar menores volúmenes por razones de costos, comodidad o simplicidad. Rara vez el escalado se hace de manera de aumentar los volúmenes.

El escalado habitualmente se realiza manteniendo las relaciones de volúmenes, salvo situaciones muy especiales.

A primera vista parecería no existir inconveniente, sin embargo veremos algunas situaciones en las que el escalado puede tornarse dificultoso.

Veamos una técnica comercial común hallada para la medida de glucosa. Esta técnica tiene el siguiente protocolo, planteado para un blanco, testigo y muestra

	volumen (ul)	volumen reactivo (ml)	absorbancia 505 nm
blanco	0	1	0
testigo 1 (1 g/l)	10	1	Abs testigo
muestra	10	1	Abs muestra

En esta situación sencilla no tendremos en cuenta el uso de una curva de calibración, sino que se realiza una regla de tres para el calculo de la concentración de la muestra.

De observar el protocolo, el volumen final es aproximadamente 1 ml.

Para la determinación requeríamos micropipetas que puedan medir volúmenes de 10 ul hasta 1000 ul y un espectrofotómetro que requiera 1 ml o menos de volumen.

Queda claro que si nuestras micropipetas no llegan volúmenes tan pequeños como 10 ul o tan grandes como 1 ml no podremos hacer la medición. Tampoco la podremos hacer si el espectrofotómetro requiere más de 1 ml.

Supongamos disponemos de un espectrofotómetro que puede medir volúmenes de 1 ml pero también puede medir con volúmenes tan pequeños como 0,2 ml y por ende deseamos ajustar la técnica a dicho equipo. El nuevo protocolo surge directamente de dividir todos los volúmenes por un divisor común.

En esta situación el protocolo resultaría

PUESTA A PUNTO DE UNA TÉCNICA DE MEDICIÓN

	volumen (ul)	volumen reactivo (ml)	absorbancia 505 nm
blanco	0	0,2	0
testigo 1 (1 g/l)	2	0,2	Abs testigo
muestra	2	0,2	Abs muestra

11.1.1. Problema 1: equipamiento

Cuales son nuestros requerimientos ahora
micropipetas que pueda medir 2 ul o más.
micropipeta que pueda medir hasta 0,2 ml
espectrofotómetro con cubeta que pueda medir 0,2 ml.
Si disponemos de dichos equipos, problema 1 solucionado.

11.1.2. Problema 2: errores y su propagación.

Análisis 1: calculo con concentraciones

En este caso no estamos teniendo en cuenta los errores de uso de micropipetas. Cosa que no es cierta!!!

Analicemos la propagación de errores suponiendo que para calcular la concentración en lugar de una curva de calibración utilizamos solo regla de tres simple directa

Para calcular la concentración de la muestra se puede hacer el siguiente cálculo

Abs testigo 1 g/l

Abs muestra $x = 1 \text{ g/l} * \text{abs muestra} / \text{abs testigo}$

En un calculo de este tipo, cuando el valor surge solo de productos y cocientes el error relativo (E) se calcula como la suma de los errores relativos de los valores involucrados

$$E_R[muestra] = E_R[testigo] + E_R \text{ Absorbancia muestra} + E_R \text{ Absorbancia testigo}$$

Ecuación 11.1

El error relativo del testigo será el mismo independiente del volumen utilizado

El error relativo de las absorbancias será el mismo ya que depende de la apreciación del instrumento y del valor medido. Si tenemos volúmenes mayores o menores no se vería afectado.

Por lo tanto parece ser que el E_R de la medición no estaría sujeto a problemas de escalado.

Sin embargo, esta apreciación surge de pensar que no estamos cometiendo errores en el uso de las micropipetas.

Análisis 2: cálculo con cantidades considerando los volúmenes de muestra y testigos

En la realidad la curva de calibración se debería realizar con las cantidades de testigos y no con las concentraciones.

Realicemos nuevamente el cálculo simplemente por regla de tres .primero para el protocolo con volumen final de 1 ml

PUESTA A PUNTO DE UNA TÉCNICA DE MEDICIÓN

	volumen (ul)	volumen reactivo (ml)	absorbancia 505 nm
blanco	0	1	0
testigo 1 (1 g/l)	10	1	Abs testigo
muestra	10	1	Abs muestra

resolvámoslo de manera general

1000 ml de testigo..... 1 g/l

vol testigo gramos de testigo = $1 \text{ g/l} * \text{vol testigo} / 1000 \text{ ml}$ (1)

Con las absorbancia de testigo y muestra obtengo los gramos de muestra en el tubo

abs testigo gramos de testigo

abs muestra gramos de muestra = $\text{gramos de testigo} * \text{abs muestra}/\text{abs testigo}$ (2)

con el volumen de muestra hallo la concentración de la muestra

vol muestra gramos de muestra

1000 ml de muestra concentración muestra = $\text{gramos de muestra} * 1000 \text{ ml}/\text{vol muestra}$ (3)

combinando todas las ecuaciones anteriores

el cálculo (3) dice

concentración muestra = $\text{gramos muestra} * 1000\text{ml}/\text{vol muestra}$

según el cálculo (2)

gramos de muestra = $\text{gramos de testigo} * \text{abs muestra}/\text{abs testigo}$

reemplazando (2) en (3) resulta

concentración muestra = $(\text{gramos de testigo} * \text{abs muestra}/\text{abs testigo}) * 1000\text{ml}/\text{vol muestra}$ (4)

según el cálculo (1)

gramos de testigo = $1 \text{ g/l} * \text{vol testigo} / 1000 \text{ ml}$

reemplazando (1) en (4) resulta

concentración muestra = $((1 \text{ g/l} * \text{vol testigo} / 1000 \text{ ml}) * \text{abs muestra}/\text{abs testigo}) * 1000\text{ml}/\text{vol muestra}$ (5)

reacomodando la ecuación resulta

concentración muestra = $(1 \text{ g/l} * \text{vol testigo} * \text{abs muestra})/(\text{abs testigo} * \text{vol muestra})$ (6)

Es decir que para calcular la concentración de la muestra involucramos valores de

concentración de testigo

vol testigo

abs muestra

abs testigo

vol muestra

El error de la concentración surgirá de propagar el error. Como la concentración de la muestra surge solamente de productos y cocientes, el error relativo (ER) de la concentración de la muestra será la suma de los errores relativos de los términos involucrados en el cálculo

$ER(\text{conc muestra}) = ER(\text{conc testigo}) + ER(\text{vol testigo}) + ER(\text{abs muestra}) + ER(\text{abs testigo}) + ER(\text{vol muestra})$

Si en ambas determinaciones utilizamos el mismo testigo y el mismo espectrofotómetro los ER de dichos términos será iguales. Pero, qué ocurre con el los ER de los volúmenes.

Supongamos que la concentración del testigo la consideramos con $ER=1$

El espectrofotómetro mide valores que van de 0,000-1,000 . La apreciación sería 0,001 por ende el $ER= 0,001*1000/\text{Abs medida}$

Supongamos que para el testigo medimos $\text{Abs testigo} = 0,250$ y para la muestra $\text{Abs muestra} = 0,500$ los ER sería

$ER \text{ abs muestra} = 0,001*100/0,500 = 0,2$

$ER \text{ abs testigo} = 0,001*100/0,250 = 0,4$

Si la pipeta utilizada para medir muestra y testigo fue la misma y es una micropipeta de 2-20 ul que

PUESTA A PUNTO DE UNA TÉCNICA DE MEDICIÓN

puede apreciar 1 ul

$$\text{ER vol muestra} = 1 \cdot 100 / 10 = 10\%$$

Reemplazando en la ecuación

$$\text{ER (conc muestra)} = \text{ER (conc testigo)} + \text{ER(vol testigo)} + \text{ER (abs muestra)} + \text{ER (abs testigo)} + \text{ER(vol muestra)}$$

$$\text{ER (conc muestra)} = 1 + 10 + 0,2 + 0,4 + 10 = \mathbf{21,6\%}$$

¿Qué hubiera ocurrido si utilizabamos el protocolo escalado a 5 veces menos de volumen?

	volumen (ul)	volumen reactivo (ml)	absorbancia 505 nm
blanco	0	0,2	0
testigo 1 (1 g/l)	2	0,2	Abs testigo
muestra	2	0,2	Abs muestra

Suponiendo que utilizamos el mismo testigo y el mismo espectrofotómetro permite medir el volumen de 0,2 ml

serían los mismos errores para

concentración de testigo: 1 %

$$\text{ER abs muestra} = 0,001 \cdot 100 / 0,500 = 0,2$$

$$\text{ER abs testigo} = 0,001 \cdot 100 / 0,250 = 0,4$$

¿Qué ocurre con las micropipetas? Supongamos que utilizamos la misma micropipeta

Si la pipeta utilizada para medir muestra y testigo fue la misma y es una micropipeta de 2-20 ul que puede apreciar 1 ul

$$\text{ER vol muestra} = 1 \cdot 100 / 2 = 50\%$$

Si ahora calculamos el ER de la concentración de la muestra

$$\text{ER (conc muestra)} = \text{ER (conc testigo)} + \text{ER(vol testigo)} + \text{ER (abs muestra)} + \text{ER (abs testigo)} + \text{ER(vol muestra)}$$

$$\text{ER (conc muestra)} = 1 + 50 + 0,2 + 0,4 + 50 = \mathbf{101,6\%}$$

Conclusión

Al escalar una técnica debemos tener en cuenta al menos dos puntos

- 1- que los equipos nos permitan medir los volúmenes o cantidades involucradas
- 2- la propagación del error.

12. ESPECTROSCOPIA

Vivimos en un mundo lleno de colores: arcoíris, selvas, océanos, etc. La tierra es el lugar más colorido que conocemos, rojo, amarillo y azul son unas de las primeras palabras que aprendemos. Pero hay una razón por la que nuestro mundo se ve tan increíble. Cuando vemos colores no solo vemos belleza si no que estamos apreciando unos de los procesos más complejos de la naturaleza. En esta clase veremos una breve introducción sobre la fascinante ciencia detrás de la espectrofotometría y de su lenguaje a través de los colores del universo.

Para introducirnos en la historia de los colores debemos remontar a la antigüedad, a los griegos, desde los tiempos de Homero hace 850 a.C. quien recoge las creencias populares en los textos de la Ilíada y la Odisea. A lo largo de la historia la luz fue muchas veces concebida como un corpúsculo y otras veces como una onda. Desde la teoría GRANULAR propuesta por Platón y desarrollada por Demócrito, la teoría DINÁMICA propuesta por Aristóteles, teoría CORPUSCULAR de Newton y Einstein a la teoría ONDULATORIAS de Huygens, Fresnel y Maxwell.

Sin embargo, aunque la teoría ondulatoria gozaba de credibilidad y tenía eminentes seguidores no explicaba la polarización de la luz ni la existencia de distintos colores. Es el físico y matemático inglés Sir Isaac Newton⁵ que da un paso de gigante en su interpretación, en 1665 descompone con un prisma la luz blanca, encuentra que los colores están caracterizados por índices de refracción distintos y al atravesar al prisma se dispersan en direcciones diferentes.

¿Cómo la ciencia logra sacar información a través de la luz?

La luz visible es la única porción del espectro que podemos percibir con el sentido de la visión. Durante toda la vida, tus ojos se han basado en esta estrecha banda de radiación electromagnética para recoger información del mundo. La luz visible contiene importantes indicios científicos que revelan las propiedades ocultas de los objetos en todo el universo. Pequeños desfasajes de energía en longitudes de onda específicas pueden detectar la condición física y la composición de la materia estelar e interestelar. Los ojos humanos no son lo suficientemente sensibles para detectar estas variaciones de la onda electromagnética, pero si los instrumentos científicos. La ciencia puede conocer la composición de una sustancia por la forma en que sus partículas dispersan la luz visible. La atmósfera de la tierra, por ejemplo, normalmente se ve azul ya que contiene moléculas de nitrógeno y oxígeno que tienen el tamaño adecuado para dispersar la energía con la longitud de onda de la luz azul.

La ciencia logra obtener información de la materia a través de diversas técnicas entre ellas la espectroscopía. Esta rama de la ciencia basa fundamentalmente su funcionamiento en la capacidad que tiene la materia de absorber ciertas longitudes de onda de la luz, tanto visible como de otros sitios del espectro, como lo son la radiación infrarroja y ultravioleta.

La espectroscopía tiene diferentes formas de realizarse de acuerdo a la forma en que se mide y emite la radiación utilizada. Así, en principio y adaptado a este manual dividimos a la espectroscopía en:

visible: utiliza luz visible

ultravioleta: utiliza radiación ultravioleta

5. Entre 1670 y 1672 trabajó intensamente en problemas relacionados con la óptica y la naturaleza de la luz. Newton demostró que la luz blanca estaba formada por una banda de colores (rojo, naranja, amarillo, verde, cian, azul y violeta) que podían separarse por medio de un prisma. En 1704, Newton escribió su obra más importante sobre óptica, *Opticks*, en la que exponía sus teorías y la naturaleza corpuscular de la luz, así como un estudio detallado sobre fenómenos como la refracción, la reflexión y la dispersión de la luz.

infrarroja: utiliza radiación infrarroja

De acuerdo a la forma de generar y medir la interacción de la radiación con la materia, la espectroscopía se clasifica en:

fotocolorimetría

espectrofotometría

espectroscopía de absorción atómica

fotometría de llama

12.1. Fotometría de llama

La fotometría de llama se basa en que los átomos de numerosos elementos metálicos con suficiente energía emiten a longitudes de ondas (λ) particulares que son específicas de cada elemento.

El fotómetro de llama está compuesto por una aguja por donde se aspira la muestra en un sistema de vacío generado por una burbuja de vidrio por donde pasa aire comprimido. La muestra es conducida hasta una chimenea en donde hay fuego, que descompone la sustancia en fragmentos simples de átomos libres. Además, la reacción química de la llama es una fuente de energía electromagnética, que brinda energía al átomo el cual luego libera el exceso de la misma en forma de radiación.

Una vez que el átomo emite el exceso de energía en forma de radiación es filtrada por un monocromador el cual se encuentra incorporado en el artefacto.

12.1.1. Monocromador

Hagamos un experimento: si utilizamos un prisma y hacemos pasar un haz de luz ordinaria por él, veremos que en uno de sus extremos la luz se descompone, un experimento mundialmente conocido y apreciado a demás en la cotidianidad de la vida al observar un arcoíris el cual se produce por el mismo principio (las gotas de aguas en suspensión en la atmósfera refractan la luz descomponiéndola en sus diferentes longitudes de onda). Gracias a este fenómeno podemos aprovecharlo y sacar información.

Si tomamos el mismo prisma y descomponemos un haz de luz ordinaria y sobre las luces polarizadas colocamos hojas recién podadas, veremos que en determinado momento sólo pasaran las longitudes de ondas de color verde. Esto se debe a que las células de las hojas cuentan con moléculas llamadas clorofila A, B y carotenoides las cuales tienen la capacidad de absorber todas las longitudes de ondas y utilizarlas para generar azúcares que almacenan la energía solar mediante un proceso denominado REACCIÓN LUMINOSA. Las longitudes de ondas que no fueron absorbidas son aquellas longitudes que se corresponden a los tonos verdes y por lo tanto son reflejadas llegando a nuestros ojos y por esa razón percibimos a las hojas de color verde.

De la misma manera podemos utilizar este fenómeno para aislar las longitudes de ondas que queremos estudiar. Existen MONOCROMADORES que son sistemas ópticos que solo dejan pasar una determinada longitud de onda.

De la misma manera, el fotómetro cuenta con un monocromador que solo deja pasar una determinada longitud de onda, la cual es específica para en sodio ($\lambda = 589 \text{ nm}$) y potasio ($\lambda = 405 \text{ nm}$). De esta manera logramos filtrar toda longitud de onda que no nos interesa medir y concentrarnos en aquella que es generada por el metal en cuestión, al pasar solo los fotones de energía de sodio o potasio son captados por una fotocélula que tiene la capacidad de medir la intensidad luminosa, la cual luego es convertida a energía eléctrica y hace mover la aguja del instrumento de medida.

La energía en la fotometría de emisión de llama se suministra en forma de calor o energía térmica (llama). Una determinada cantidad o quantum de la energía térmica es absorbida por un electrón de una órbita. Ese electrón excitado pasa a una órbita de energía superior más inestable, volviendo casi inmediatamente a su estado basal y emitiendo ese quantum de energía en forma de un fotón de una

λ dada. En la llama sólo el 1% de los átomos presentes experimentan esa transmisión y emisión de energía, siendo sus máximos representantes los elementos Na y K. Cada elemento emite luz de un color determinado

- **Na** --> Amarillo
- **K** ----> Violeta

Los átomos metálicos Na, K y otros emiten luz característica al ser sometidos a calentamiento. Las ondas electromagnéticas de alta frecuencia tienen una longitud de onda corta y mucha energía mientras que las ondas de baja frecuencia tienen grandes longitudes de onda y poca energía. Como se puede apreciar el sodio tiene una longitud de onda (λ) de onda de **589 nm**. Por lo tanto, al tener **mayor** longitud de onda (λ) de onda tiene **menor** frecuencia por lo que emite **menor** energía. Este fenómeno se puede demostrar utilizando la constante de PLANCK.

12.1.2. Constante de Planck y energía

La energía (E) de una radiación se puede calcular como el producto de la frecuencia (f) por la constante de Planck (h) o bien como el producto de la constante de Planck por la velocidad de la luz (c) dividido por la longitud de onda (λ). cuyas relaciones quedan expresadas en la siguiente ecuación.

$$E = hf = E = \frac{hc}{\lambda}$$

Las ondas electromagnéticas de alta frecuencia tienen una longitud de onda corta y mucha energía mientras que las ondas de baja frecuencia tienen grandes longitudes de onda y poca energía. Como se puede apreciar el potasio a diferencia del sodio, tiene una λ de onda de 405 nm. Por lo tanto, al tener **menor** λ de onda tiene **mayor** frecuencia por lo que emite **mayor** energía.

Una vez comprendido esto, recordemos algunos conceptos: La fotometría de llama es una metodología que nos permite conocer la cantidad de sustancia que existe en una solución mediante una medición INDIRECTA por lo que debemos generar testigos en concentraciones conocidas para poder cargar al instrumento y tener contra qué comparar las muestras.

12.1.3. Testigo y diluciones para medir sodio

Solución stock

3,26 g NaCl g/L. Colocar una cantidad adecuada de NaCl de calidad pro análisis durante 1 h a 105 °C. Inmediatamente pesar a partir de esta cantidad 0.326 g de NaCl y disolverlos en 100 ml de solución utilizando agua destilada.

A partir de esta solución preparar las soluciones que se indican a continuación

Diluciones

dilución a partir de solución stock	ml de stock	agua	concentración final mg Na/L
1/100	1	csp 100 ml	12.8
1/200	0.5	csp 100 ml	6.8

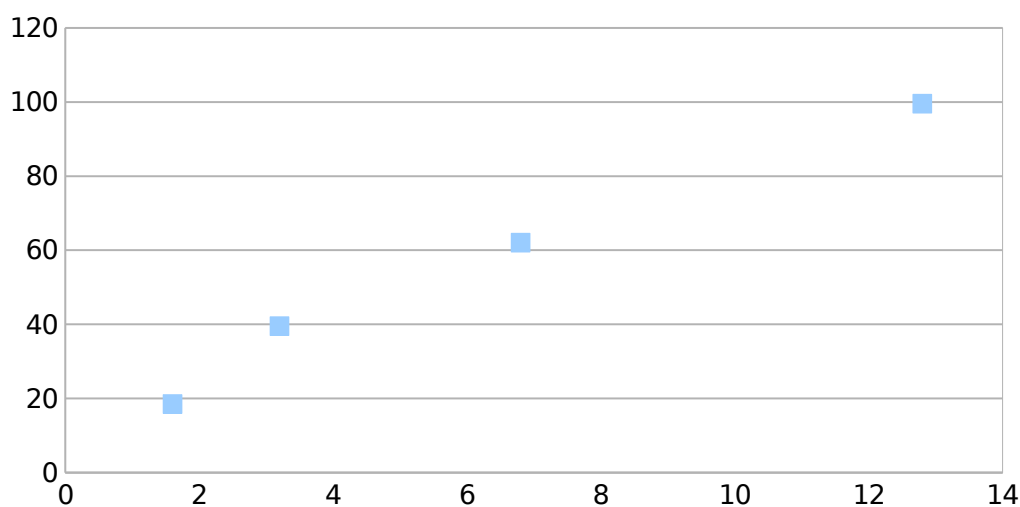
ESPECTROSCOPIA

1/400	0.25	csp 100 ml	3.2
1/800	0.125	csp 100 ml	1.6

Una vez generados estos testigos se utilizaron para calibrar el fotómetro de llama. Para ello se coloca cada testigo en el instrumento y se calibra midiendo los valores de absorbancia. La tabla siguiente muestra valores ilustrativos obtenidos en una medición. Con la absorbancia y los mg/L se construye la curva de calibración. Con su concentración de sodio en miligramos por litro, CV% correspondiente, junto con la curva de calibración de la misma.

muestra	(mg/L)	abs	abs'	abspromedio	CV%	Condición
agua d	0	0	0	0		
1/100	12,8	99	100	99,5	0,71	OK
1/200	6,8	63	61	62	2,28	OK
1/400	3,2	39	40	39,5	1,79	OK
1/800	1,6	18	19	18,5	3,83	OK
QC	6,92	61	60	60,5	1,17	OK

La curva de calibración que se muestra a continuación tiene la ecuación que nos permitirá calcular la concentración ($f(x) = 6,92 * x + 12,67$) y el coeficiente de correlación que nos indica la bondad del ajuste de los datos.



Luego para medir la concentración de una solución en particular, se procesa de la misma manera y se calcula la concentración utilizando la ecuación que arroja la curva de calibración.

Por ejemplo si para una muestra se obtuvo un valor de absorbancia promedio de 50, para calcular su concentración aplicamos la ecuación y despejamos el valor de concentración, que en nuestro caso es la "x".

$$f(x) = 6,92 * x + 12,67$$

$$50 = 6,92 * x + 12,67$$

$$x = 5.39 \text{ mg/L}$$

12.2. Espectrofotometría

12.2.1. Determinación de fosfato en agua

Introducción

El Fosfato es un componente esencial para la vida. Integra moléculas de gran importancia: ATP, ADP, ADN, ARN, fosfolípidos, etc. Interviene en diversas funciones: como en la formación y mantenimiento de los huesos y de los dientes, contracción muscular, entre otras. El fosfato lo incorporamos con los alimentos y es un componente habitual, aunque en baja concentración en el agua de consumo. El fósforo se halla en en aguas naturales y residuales como fosfatos. El ortofosfato es el principal constituyente de muchos productos de limpieza, agregándose al agua cuando se los utiliza. El ortofosfato se aplica a tierras de cultivo agrícola o residencial como fertilizantes, y son llevados luego por las aguas de lluvia. Los fosfatos orgánicos se forman principalmente por procesos biológicos, y se aportan a las aguas con los desechos corporales y residuos de alimentos. Elevadas cantidades de fosfatos favorecen el crecimiento de algas.

La ley 11.220 regula las aguas de consumo en la Provincia de Santa Fe, recomienda como límite máximo 0,53 mg de fosfato/litro y establece como límite obligatorio: 6,89 mg de fosfato/litro

La medición de fosfato en agua se realiza por un técnica colorimétrica, aunque existen técnicas espectrofotométricas ultravioleta.

Fundamentos del método

El molibdato de amonio (Reactivo I), reacciona con el fosfato para formar ácido molibdofosfórico. Luego este se reduce con cloruro de estaño (II) (Reactivo II) a azul de molibdeno. La concentración de este compuesto formado es proporcional a la absorbancia media a 630 nm. Construyendo una curva de calibración con soluciones de fosfato de concentración conocida se puede calcular la concentración de fosfato en muestras de agua.

Materiales necesarios para la medición de fosfato en agua

guantes

guardapolvo

policubetas

gradilla

micropipetas: - boeco 100-1000 ul- multicanal boeco 5-50 ul

tips: - azul (100 - 1000 ul) - de multicanal (30 – 300ul)

espectrofotómetro

Protocolo medición fosfato:

Sacar kit fosfato de la heladera, para que los reactivos tomen temperatura.

Preparar el protocolo para cargar la policubeta. La policubeta tiene 8 filas numeradas de A a la H y 12 columnas numeradas de 1 a 12. En el caso siguiente se utilizan solo 8 columnas. En cada posición se indica que solución se colocará. Por ejemplo en la fila B, columna 5 va la muestra de agua A1 y al lado su duplicado (A1')

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	B	B'	T 1	T 1'	T 2	T 2'	T 3	T 3'
B	T 4	T 4'	QC	QC'	A 1	A 1'	A 2	A 2'
C	A 3	A 3'	A 4	A 4'	A 5	A 5'	A 6	A 6'
D	A 7	A 7'	A 8	A 8'	A 9	A 9'	A 10	A 10'

ESPECTROSCOPIA

E	A 11	A 11'	A 12	A 12'	A 13	A 13'	A 14	A 14'
F	A 15	A 15'	A 16	A 16'	A 17	A 17'	A 18	A 18'
G	A 19	A 19'	A 20	A 20'	A 21	A 21'	A 22	A 22'
H	A 23	A 23'	A 24	A 24'	A 25	A 25'	A 26	A 26'

Cada pocillo de la microplaca además de la muestras o solución estándar (indicados con T) lleva además los reactivos que se indican en la tabla siguiente

	[PO ₄ ³⁻] (mg/l)	H ₂ O dest. (ul)	TESTIGOS QC (ul)	MUESTRAS (ul)	REACTIVO I (ul)	REACTIVO II diluido 1/10(ul)
BLANCO	0	250	-	-	10	12,5
T 1	0,5	-	250	-	10	12,5
T 2	1	-	250	-	10	12,5
T 3	2	-	250	-	10	12,5
T 4	5	-	250	-	10	12,5
QC	2,4	-	250	-	10	12,5
MUESTRAS	??	-	-	250	10	12,5

Colocar 10 min en agitador orbital. a temperatura ambiente.

Medir absorbancia

Lavado y guardado materiales:

Guardar Kit Fosfato en heladera

Descartar Tips Azules

Colocar en Tupper con agua Tips Multicanal

Lavar policubetas con Ultrasonico

Enjuagar policubetas 10 veces con agua de la canilla y 10 veces con agua destilada

Poner a secar las policubetas en la estufa

Cargar datos obtenidos en Software.

Puesta a punto de la técnica

Poner a punto una técnica implica encontrar la mejor combinación de materiales, reactivos, tiempos y equipamientos, entre otros, para lograr cumplir con la medición de la manera más eficiente.

Para poner a punto la técnica de medición de fosfato se realizaron los siguientes cambios:

Se reemplazó los tubos khan cortos por policubetas.

Se cambió de equipamiento. Se dejó de utilizar el espectrofotómetro Perkin Elmer, y se reemplazó por el espectrofotómetro Rayto, lector de policubetas.

Se implementó el uso de pipeta multicanal para la colocación de reactivos.

Se cambió la agitación manual, por el uso de un agitador orbital.

Mejoramos la limpieza, para evitar interferencias: comenzamos a utilizar policubetas propias (que se usen para otras mediciones), le agregamos al lavado tradicional el uso de ultrasónico, lavamos

ESPECTROSCOPIA

periódicamente las policubetascon HCl, aumentamos las medidas de higiene (ej. pelo recogido)
Se extremo el cuidado en la preparación de las soluciones y su conservación.

Soluciones a utilizar

1- Solucion stock

240mg/L PO_4^{3-}

Buscar en la base de datos (droguero), y anotar los N° de las posibles drogas a usar: KH_2PO_4

Buscar en droguero los números anotados, leer las etiquetas y seleccionar uno de buena calidad: 132.

Poner a secar una cantidad aproximada a la que necesito de KH_2PO_4 entre 12-24hs a 105°C .

Calcular cantidad de KH_2PO_4 necesaria:

$$1000\text{ml} \text{ ----- } 240\text{mg } \text{PO}_4^{3-}$$

$$100\text{ml} \text{ ----- } x = 24\text{mg } \text{PO}_4^{3-}$$

$$95\text{mg } \text{PO}_4^{3-} \text{ ----- } 136,05\text{mg } \text{KH}_2\text{PO}_4$$

$$24\text{mg } \text{PO}_4^{3-} \text{ ----- } x = 34,37\text{mg } \text{KH}_2\text{PO}_4 = 0,03437\text{g}$$

Se pesa el KH_2PO_4 que necesito: 0,03437g

Se coloca la masa pesada en un matraz aforado de 100 ml

Aforar a 100ml con agua destilada

Guardar en un frasco y rotular.

2- Solución control de calidad QC.

El QC tiene una concentración de 2,4mg/L

Para preparar la solución se diluye 100 veces la solución Stock.

13. VOLUMETRÍA

La volumetría es un tipo de técnica en que se mide la concentración de alguna sustancia en base al volumen gastado de algún reactivo. En las técnicas que describiremos los volúmenes los mediremos pesando las soluciones y asumiendo que la densidad de la solución es de 1 g/ml, aproximación bastante cierta debido a la baja concentración de los reactivos utilizados.

13.1. Determinación de cloruro en agua

13.1.1. Introducción

El cloruro es una de las sales presentes en mayor cantidad en el agua de consumo y drenaje. Cuando el cloruro se encuentra en forma de NaCl se detecta un sabor salado en concentraciones por encima de 250 ppm. La máxima concentración permisible de cloruros en el agua potable es de 250 ppm, este valor se estableció más por razones de sabor, que por razones sanitarias.

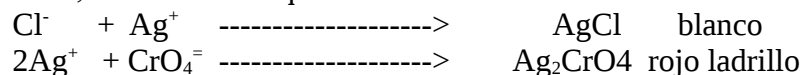
Para esta medición utilizaremos una técnica volumétrica, y para su comprensión requiere un esfuerzo algo mayor.

En una técnica volumétrica, añadiremos a la muestra un volumen de una sustancia que reaccionará el componente que deseamos medir ("X"). Este volumen adicionado puede ser medido, y de esta manera calcular el valor del componente "X" de nuestra muestra. Para entenderlo mejor, lo explicaremos con el cloruro:

13.1.2. Fundamento de la técnica

Supongamos que tenemos una muestra con una cantidad desconocida de cloruros disueltos en ella. A esta muestra le añadiremos un indicador, que nos servirá durante el proceso (en este caso, cromato de potasio- K_2CrO_4). A esta solución le añadiremos nitrato de plata ($AgNO_3$), que es la solución titulante. La plata presente en el nitrato de plata reaccionará primero con los aniones cloruros presentes en la muestra formando un precipitado de color blanco. Cuando se haya terminado el cloruro la plata agregada reaccionará con el cromato y se producirá un cambio de coloración en la solución, indicando que se ha terminado el cloruro. A medida que añadimos nitrato de plata, el color de la muestra se va tornando rojizo, pero el color no perdura. Si seguimos añadiendo nitrato de plata toda la muestra se tornará rojiza y este color no se revertirá. Esto significa que todo el cloruro se encuentra ahora unido al nitrato de plata y el mismo ha comenzado a reaccionar con el cromato de potasio. La cantidad adicionada de nitrato de plata nos permitirá estimar la cantidad de cloruro presente en la muestra.

Resumiendo, las reacciones que ocurren en la solución son



El pH óptimo para llevar a cabo el análisis de cloruros es de 7.0 a 8.3, por lo cual debemos ajustar el pH antes de realizar esta técnica.

13.1.3. Precauciones

La determinación utiliza material volumétrico y drogas potencialmente tóxicas. Utilice guantes, lentes y propipetas. Evite mancharse con nitrato de plata ya que da manchas muy difíciles de eliminar. No se asuste si se mancha la piel y esta se pone negra, no es nada grave.

Controle el valor del pH de la titulación ya que es determinante en la exactitud y precisión de la medición

13.1.4. Materiales y reactivos:

- Na_2CO_3 0.05 M
- H_2SO_4 0.05 M
- Fenolftaleína al 0.25 %
- Solución AgNO_3 0.01 M
- Solución NaCl 0.01 M
- Indicador de K_2CrO_4 al 5 %
- Vasos plásticos de medida
- Bureta
- Embudo
- Propipeta 1-5ml
- Tips
- Agitador magnético
- Mosquita
- Balanza con precisión máxima 0.001 g
- Agua destilada

13.1.5. Procedimiento:

- Estandarización de la solución de AgNO_3 : Colocar 5 ml de la solución de NaCl 0.01M en un vaso plástico de medida, agregar 3 gotas de K_2CrO_4 . La muestra adquiere un color amarillo. Tomar el peso con una balanza de apreciación 0,001 g, a este valor lo llamamos p1. Titular con solución de AgNO_3 hasta que aparezca el vire color rojo ladrillo, pesar el recipiente a este valor lo llamamos p2. Con los valores p1 y p2 calculamos la molaridad del AgNO_3 .

$$\text{Molaridad AgNO}_3 = \frac{(\text{Molaridad NaCl} * \text{volumen NaCl})}{(p2 - p1)}$$

La molaridad del NaCl de sodio es conocida ya que es preparada a partir de una droga de pureza conocida y siguiendo técnicas para preparación de un estándar.

- Colocar 5 ml de la muestra de agua en un vaso plástico de medida. Puede utilizar otro volumen pero tenga la precaución de registrarlo.
- Ajustar el pH entre 7.0 a 8.3:
 - añadir 2 gotas de Na_2CO_3 0.1 M
 - añadir 2 gotas de Fenolftaleína (0.25 %), tiene que producirse un color rosa.
 - añadir gotas de H_2SO_4 0.05 M necesarias hasta que vire a incoloro.
- Agregar 3 gotas K_2CrO_4 al 5 % (indicador)
- pese en una balanza con precisión máxima 0.001 g, este valor es g1.
- Agregar mosquita y agitar con el agitador magnético.
- Agregar AgNO_3 0.01 M con bureta hasta el viraje de amarillo a rojo ladrillo. Cuando el color rojo persiste, detenerse.
- Retirar mosquita
- Pesar nuevamente. Este valor es g2
- Con los valores V1 y V2 gastados

$$\text{Cl meq/litro} = \frac{\text{molaridad AgNO}_3 * (g2 - g1) * 1000}{\text{ml muestra}}$$

13.2. Determinación de carbonato y bicarbonato

Es importante conocer la concentración de estos compuestos en el agua de consumo porque de ellos depende el pH de dicha sustancia. Se sabe por ejemplo que a una elevada alcalinidad el agua adquiere un sabor amargo. Cuando las aguas tienen alcalinidades inferiores se vuelven muy sensibles a la contaminación, ya que no tienen capacidad para oponerse a las modificaciones que generen disminuciones del pH.

La alcalinidad del agua normal como tratada, es causada usualmente por la presencia de carbonatos (CO_3^{2-}) y bicarbonato (HCO_3^-) asociado a otros iones (como Na, K, Ca, Mg)

El rango óptimo aproximado del pH es entre 7 y 8.

En el siguiente apartado comentaremos el fundamento de la técnica de medición de las concentraciones de carbonato y bicarbonato en aguas de consumo humano.

A través de una técnica de medición volumétrica, la alcalinidad se determinara por titulación de las muestras de agua con una solución valorada como ácido fuerte (el HCl), mediante dos puntos sucesivos de equivalencia indicados por medio del cambio de color utilizando dos indicadores ácido-base adecuados.

Los indicadores disponibles en nuestro kit de medición (Ver más adelante) son la Fenolftaleína y el Naranja de metilo.

Campo de aplicación de la técnica: Este método, es aplicable para la determinación de la alcalinidad de carbonatos y bicarbonatos, en aguas naturales, domésticas, industriales y residuales.

13.2.1. Fundamentos de la determinación

Los carbonatos y bicarbonatos tienen un comportamiento básico en disolución y se pueden valorar frente a la presencia de un ácido como el HCl. La técnica es simple, pero requiere ser cuidadoso.

Lo que la técnica hace, es a través del uso de estos indicadores, informarnos el valor del Ph de la muestra y, con este, la presencia o no de carbonatos y bicarbonatos.

Hay 2 pasos a seguir fundamentales:

Estandarización del HCl.

Medición de las aguas.

13.2.2. Procedimiento

Estandarización del HCl.

La estandarización se lleva a cabo antes de comenzar las mediciones. Este será nuestro QC y nos ayudara a valoración la solución de HCl. Es importante mencionar que las determinaciones tanto de la estandarización como de las mediciones de las muestras de aguas, deben realizarse siempre por duplicado. El objetivo de hacer la prueba por duplicado es reforzar la confianza en que la prueba dio resultados confiables, disminuyendo el error.

Procedimiento: Se le agregara a 1ml de carbonato de Sodio 0.05M, 1 gota de naranja de metilo tornándose de color naranja. Por último se titulara con HCl hasta que la solución adquiriera color rojo intenso.

13.2.3. Medición de las aguas.

El análisis se lleva a cabo en una serie de pasos, pero se nos presentaran dos escenarios al medir. Hemos conseguido hacer una técnica más efectiva, económica y ágil al utilizar recipientes de plástico reutilizables en las mediciones en lugar de un matraz Erlenmeyer. Es importante reconocer lo que ocurre en cada escenario que se nos va a presentar al medir para saber cómo proseguir. Estos escenarios serán dos:

En un primer momento, en una muestra de 5ml de agua de consumo, agregaremos 1 gota del indicador de fenolftaleína, y nos puede aparecer coloración rosa/lila, indicador de que la muestra tiene un pH mayor que 8.3 y de que hay presencia de carbonatos. Antes de proseguir debemos pesar el recipiente en una balanza 0.001 g precisión (registrar como g1, en gramos)

Posteriormente, se procederá a titular con HCl, de manera cuidadosa a través de una bureta de a gotas (Ver imagen) y con la ayuda de un agitador magnético, hasta que el color rosa vire a incoloro, titulando así la mitad del $\text{CO}_3^{=}$. Pesaremos nuevamente en la balanza (colando g2 al valor, en gramos)

Inmediatamente se agregan 1 gota de indicador naranja de metilo, apareciendo una coloración amarilla/naranja clara y lo volveremos a pesar (g3, en gramos)

Por último, se continúa titulado con HCl hasta la aparición de una coloración naranja oscura. El cambio se evidencia muy bien a la vista, así que recomendamos tener cuidado con el uso de la bureta y no titular la muestra de forma excesiva (Por ejemplo, no dejar que torne se torne de color rojo intenso)

Registramos el peso final (g4 en gramos)

Con esto, se titula los bicarbonatos (HCO_3^-) y la mitad restante de los carbonatos ($\text{CO}_3^{=}$).

El segundo escenario que se nos presentara es cuando, en una muestra de 5ml de agua de consumo, luego de agregar la gota de fenolftaleína, la muestra puede que no cambie de color (siga incolora), indicativo de ausencia de carbonatos y de que la muestra de agua tiene un pH menor que 8.3. Se debe pesar el recipiente poniendo G2 al valor obtenido. (Al no encontrar Carbonato el valor $g1=g2$)

En este caso, la titulación se lleva a cabo en una sola etapa. Luego de pesarlo, se agregara 1 gota de indicador naranja de metilo, apareciendo una coloración amarilla/naranja claro. Volvemos a registrar su peso (g3 en gramos)

Por último, se procederá a titular con solución de HCl hasta la aparición de un color naranja más oscuro, con eso se titula los HCO_3^- .

Registrar peso (g4 en gramos)

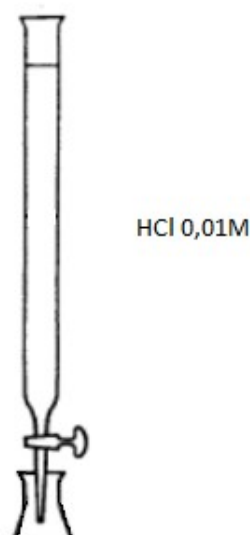


Figura 13.1. Bureta con HCl 0,01M y vasito de plástico.

Elementos del Kit de medición indispensables.

¿Qué indicadores usamos en nuestro kit para la determinación de carbonatos y bicarbonatos?

Fenolftaleína 0.25%

Naranja de metilo 0.1 %

Además de los indicadores, nuestro kit de medición tiene:

HCl 0.01M

Solución de carbonato de sodio 0.005 M

Instrumentos necesarios para la medición son:

Guantes

Guardapolvo

Kit carbonato y bicarbonato.

Micropipetas

Vasitos de plástico

Agitador magnético

Bureta

Balanza Ohaus (0.001 g precisión)

Una vez comprendidos los fundamentos básicos de la técnica, debemos estudiarla paso por paso como se indica en el protocolo correspondiente (POE.80). Como hemos visto, al ser una técnica volumétrica, cada vez que se altere la concentración total de la muestra, se requerirá que la misma sea pesada en balanza. Estos datos deben ser registrados detalladamente y cargados al final del procedimiento en el software del laboratorio. El software calculará la concentración en mmol/L de Carbonato y bicarbonato y la alcalinidad total. Tanto la información del QC como de cada medición debe quedar registrada.

13.2.4. Como calcular las concentraciones.

A continuación explicaremos como el software calcula las concentraciones de carbonatos y bicarbonatos.

Primero debemos conocer el volumen gastado de HCl en la primera mitad de la titulación. Para hacer utilizaremos los datos obtenidos que anteriormente llamamos g1 y g2.

$$V1(\text{ml}) = g2 - g1$$

Luego debemos calcular el resto de HCl utilizado.

$$V2(\text{ml}) = g4 - g3$$

Calcular contenido de Carbonatos.

$$\text{meq/L Carbonato} = M \text{ HCl (0,01M)} * (V1 - V2) * 1000$$

V H₂O (5 ml)

Calcular contenido de Bicarbonato

$$\text{meq/L Bicarbonato} = M \text{ HCl (0,01M)} * (V2 - V1) * 1000$$

V H₂O (5 ml)

Ejemplo: Calcularemos a modo de ejemplo la concentración de Bicarbonato de una muestra donde se informó presencia de carbonatos.

5 ml de agua a medir

M HCl 0,01

g1= 5,091 ml

g2= 7,637 ml

g3= 7,700 ml

g4= 10,321 ml

V1= 2,546ml y V2= 2,621 ml

$$\text{meq/L Bicarbonato} = \frac{\text{M HCl (0,01M)} * (\text{2,621} - \text{2,546}) * 1000}{\text{V H}_2\text{O (5 ml)}} = 0,15 \text{ meq/L}$$

La muestra tiene 0,15 meq/L de Bicarbonato.

Otro cálculo importante es el de la M del HCl. Para ello usaremos la siguiente ecuación:

$$\text{M HCl} = \frac{\text{M sin carbonato} * \text{Volumen de carbonato de Na} * 2}{\text{V HCl (Que se obtiene: p2 - p1)}}$$

A tener en cuenta antes de medir.

Trabjará con soluciones corrosivas. Por lo tanto, es importante recordar las medidas de seguridad:

Usar guantes, guardapolvo y anteojos.

Tener siempre el protocolo

Rotular bien las muestras

Ante alguna duda SIEMPRE recurrir a un superior

Dejar todas las cosas en el lugar

Ser cuidadoso y responsable con el material. Una vez concluido el trabajo: Lavar el material utilizado.

14. GRAVIMETRÍA

La gravimetría es un conjunto de técnicas en la cual la concentración o cantidad de una sustancia en una muestra es conocida por medidas de masas a través de una balanza.

14.1. Medición de sólidos solubles totales en agua

14.1.1. Introducción

Con esta técnica podemos estimar cuantos sólidos están disueltos en nuestra muestra. Para ello nos valemos de una técnica gravimétrica, que se basa simplemente en calcular una diferencia de pesos. Esto se podrá entender mejor luego de analizar la presente técnica.

14.1.2. Materiales:

- Pipeta
- Propipeta
- Recipientes de medida de papel aluminio
- la balanza Mettler de 0.1 mg de sensibilidad.
- Estufa 105°C

14.1.3. Precauciones

Se utilizará una estufa a 105°C, por lo cual hay que ser cuidadosos a la hora de manipularla para evitar accidentes.

14.1.4. Procedimiento:

- Pesar los recipientes de medida de papel de aluminio en la balanza.
- Con ayuda de la pipeta y la propipeta, colocamos 20 ml de muestra en cada uno de los recipientes de aluminio.
- colocar el recipiente con agua en una estufa a 105 °C y dejar hasta que toda el agua se haya evaporado (aprox 3 h).
- Dejar enfriar a temperatura ambiente y pesar nuevamente los recipientes.

14.1.5. Cálculo y registro de datos:

Restar al peso de cada recipiente luego de secado el peso obtenido en el punto 1 y multiplicar por 1000 para pasar a mg. Así obtendrá los mg de sales en cada recipiente.

La diferencia de pesos entre el recipiente vacío y el recipiente en el cual se encuentran los sólidos totales nos permite calcular cuántos sólidos totales había presentes en el volumen de muestra analizado.

14.2. Medidas de sustancias en suelos

14.2.1. Introducción

El Laboratorio de Biología Ósea trabaja en la medición de sustancias en suelos en un proyecto conjunto con CIFASIS – CONICET. Describiremos como es la preparación de la muestra, la determinación de agua, sólidos totales y materia orgánica. La determinación de pH y conductividad para las muestras de tierra se analizan en el capítulo correspondiente, junto al procedimiento para

las muestras de agua. La mayoría de las técnicas aplicadas son del tipo gravimétricas.

14.2.2. Preparación de la muestra

Las muestras de tierra ingresan al laboratorio en bolsas de nylon cerradas herméticamente. El objetivo de la preparación de la muestra es su homogeneización para ser usada en los análisis químicos y físicos. Comienza con el secado de la muestra a una temperatura de 40 ± 2 °C, lo que constituirá el llamado “suelo seco al aire”. Las ventajas de este suelo consisten en que posee un contenido de humedad óptimo para su manipulación al mismo tiempo que la actividad microbiana permanece baja durante el almacenaje.

Procedimiento

- Rotular el contenedor plástico y colocarlo 10 minutos en la estufa a 40°C. Así eliminaremos la humedad y evitaremos que interfiera con el procesamiento de la muestra. Pesar (cont).
- Llenar el contenedor destapado con la muestra de suelo y pesar (m).
- Llevar el contenedor destapado a estufa a 40 °C durante 48 h. Sacar de la estufa, dejar 1-5 minuto hasta que tome temperatura ambiente. Pesar (a).
- Moler la muestra con un mortero hasta que quede uniforme. Colocar en una bolsa de nylon con cierre hermético y rótulo claro.

m: masa de muestra tal cual se recibió + cont

a: masa de muestra seca a 40 ± 2 °C + cont

cont: masa del contenedor de orina

Cálculos y registro datos:

Los datos obtenidos deben quedar registrados en el “cuaderno de suelos” del laboratorio y posteriormente se pasan en limpio en una planilla.

M: masa del suelo tal cual se recibió: m – cont

A: masa de suelo seca a 40 °C: a – cont

14.2.3. Medida de humedad

Una porción de la muestra de suelo secado a 40 °C se seca a una temperatura de 105 °C hasta masa constante. La fracción remanente corresponde al contenido de sólidos totales y la fracción evaporada, al contenido de agua.

Procedimiento:

- Colocar un crisol a 105 °C durante 10 minutos. A diferencia de los contenedores plásticos los crisoles no se rotulan. Por eso, para poder identificarlos, cuentan con un número que debe ser registrado.
- Colocar en el crisol aproximadamente 20 g de tierra seca a 40 °C. Registrar el valor (b).
- Colocar en la estufa y secar destapado a 105 °C durante 90 minutos.
- Retirar de la estufa, dejar enfriar el tiempo suficiente como para que no quemé al manipularlo con las manos. Pesar (c).
- Guardar el residuo obtenido a 105 °C en una bolsa de nylon con buen cierre. Esta muestra se utilizará para la medida de sólidos volátiles y materia orgánica.

b: masa de muestra seca a 40 °C + cont

c: masa de muestra seca a 105°C + cont

cont: masa del crisol

B: muestra seca a 40 °C : b - cont
C: muestra seca a 105 °C : c – cont

Cálculos y registro datos

Los datos deben quedar registrados en el “cuaderno de suelos” del laboratorio y posteriormente se pasan en limpio en una planilla. A partir de los datos obtenidos se calcula el porcentaje de agua y sólidos de la muestra secada a 40 °C.

14.2.4. Sólidos volátiles

La denominación “sólidos volátiles” corresponde a la porción de la materia orgánica que puede eliminarse o volatilizarse cuando una materia orgánica se quema en un horno mufla a una temperatura de 550°C. Los sólidos volátiles a 550 °C son predominantemente materia orgánica y carbonatos.

Debemos ser extremadamente cuidadosos al utilizar la mufla ya que trabaja con temperaturas muy altas.

Para la muestra de sólidos volátiles se calcina a 550 °C una porción del sólido seco a 105 °C.

Procedimiento

1. Colocar un crisol a 105 °C durante 10 min. Dejar enfriar 5 minutos en desecador y obtener el peso del crisol (cont).
2. Colocar en el crisol aproximadamente 10 g de suelo seco a 105 °C, pesar (e)
3. Llevar a 550 °C durante 6 h. Habitualmente lo que hacemos en el laboratorio es utilizar un temporizador que hace que la mufla se encienda durante la noche y se apague transcurridas las 6 horas, por lo que el último paso lo realizamos al día siguiente.
4. Sacar de la mufla. Pesar una vez alcanzada la temperatura ambiente (f).

e: masa de muestra seca a 105 °C + cont
f: masa de muestra calcinada a 550 °C + cont
cont: masa del crisol

E: muestra seca a 105 °C : e - cont
F: muestra calcinada 550 °C : f – cont

Cálculos y registro datos

Los datos deben quedar registrados en el “cuaderno de suelos” del laboratorio y posteriormente se pasan en limpio en una planilla.

14.2.5. Materia orgánica

Para medir materia orgánica primero debemos detectar la presencia de carbonatos en la muestra de suelo. Si la muestra no tiene carbonato es el porcentaje de materia orgánica corresponde al porcentaje de sólidos volátiles a 550 °C.

Para detectar la presencia de carbonato debemos agregar una gota de HCl 4 mol/l sobre una pequeña alícuota de muestra seca a 40 °C, la liberación de dióxido de carbono indica presencia de carbonatos. Lo que hacemos en el laboratorio es colocar con una espátula una pequeña cantidad de la muestra sobre una superficie plástica y luego agregamos una gota de HCl mientras observamos si

se producen cambios en la muestra con una lupa. Como verán, en este paso es muy importante el ojo del investigador, ya que será nuestra herramienta de trabajo.

Materia orgánica en ausencia de carbonatos

En ausencia de carbonato, las muestras secadas a 40 ± 2 °C se calcinan a 550 °C. Se asume que el material volatilizado es la fracción orgánica o como dijimos anteriormente, el porcentaje de materia orgánica corresponde al porcentaje de sólidos volátiles a 550 °C.

Materia orgánica en presencia de carbonatos

- Colocar un crisol en estufa a 105 °C por 10 min, dejarlo enfriar y pesarlo: cont
- Colocar en el crisol aproximadamente 10 g de suelo seco a 105 °C y pesar el conjunto: g
- Agregar HCl 4 mol/l hasta que cese el burbujeo luego secar a 105 °C por 4 h.
- Enfriar en desecador y tomar el peso seco: h (tierra + cont).
- Luego colocar a 550 °C 4 h, dejar enfriar y pesar (i).

g: peso tierra seca a 105 °C + cont

h: peso tierra luego de tratamiento con HCl y seca a 105 °C + cont

i: peso tierra calcinada + cont

G= muestras seca a 105 °C. g - cont

H= muestra tratada con HCl y seca a 105 °C - cont

I= muestra tratada con HCl, seca a 105 y finalmente calcinada: i – cont

Cálculos y registro datos

Los datos deben quedar registrados en el “cuaderno de suelos” del laboratorio y posteriormente se pasan en limpio en una planilla.

H - I: materia orgánica, contenida en masa de tierra G seca a 105 °C.

15. CONDUCTIMETRÍA

La conductimetría es una técnica en la cual se mide la capacidad de conducir la corriente eléctrica por un muestra y esta conductividad guarda alguna relación con la concentración o cantidad de una sustancia. La conductividad eléctrica de una solución se define como la capacidad de la misma para transmitir la corriente eléctrica. Esta depende directamente de dos factores: la cantidad de iones presentes en la solución y de la viscosidad de la misma. Hay que considerar además que si hablamos de soluciones acuosas, la viscosidad varía con la temperatura, por lo cual este es otro factor a tener en cuenta a la hora de realizar mediciones.

En el laboratorio, efectuamos mediciones de conductividad en tierras y agua, siguiendo un procedimiento basado en los mismos fundamentos. Este tipo de técnicas se basan en la interacción de un electrodo y la carga eléctrica presente en una solución. Utilizamos en esta medición un instrumento llamado conductímetro, que consta de un electrodo capaz de medir el flujo de iones de la solución. La unidad de medida para la conductividad eléctrica es el Siemens (Sm). El instrumento utilizado mide la conductividad en mSm/cm^2 .

15.1. Medida de la conductividad eléctrica del agua

Materiales y reactivos:

- Conductímetro Hanna 98304
- Vasos plásticos para colocar la muestra (aproximadamente 30 ml)
- Agua destilada
- Termómetro
- QC conductividad.

Precauciones

El conductímetro es un instrumento muy costoso. Debemos cuidar que ninguna solución acuosa sobrepase el límite máximo indicado en el instrumento.

Procedimiento:

- Previo a realizar las mediciones medir la temperatura ambiente con el termómetro y registrarla.
- En un recipiente plástico colocamos agua destilada.
- Encendemos el conductímetro con el botón superior y lo sumergimos en el agua destilada.
- El valor indicado en el conductímetro debe ser de 0.0 mSm, ya que el agua destilada no posee iones. Si no fuese de 0.0 mSm, se debe calibrar el instrumento.
- En un vaso plástico colocamos el estándar de conductividad y lo medimos por duplicado. Anotamos estos valores en el cuaderno correspondiente y en la planilla de control de calidad dispuesta en el protocolo.
- Lavamos el electrodo del conductímetro y vasos plásticos con agua destilada.
- Colocamos ahora una de las muestras en un vaso plástico de medida y sumergimos el conductímetro una vez más. Haremos esto por duplicado. En caso de tener el volumen de muestra suficiente debe hacerse en dos vasos de medida distintos. En caso de no tenerlo, puede repetirse la medición en el mismo volumen de muestra.
- Anotamos el valor obtenido y su duplicado, dejándolo registrado en el cuaderno correspondiente.
- Lavamos el electrodo del conductímetro y vaso con agua destilada entre muestra y muestra.

- Repetir el procedimiento para la cantidad de muestras a medir.
- Al finalizar, lavar correctamente los vasos de medida y el electrodo del conductímetro.
- Apagar el conductímetro y proceder al guardado de los materiales utilizados.

15.2. Conductividad eléctrica en suelos

No es posible medir la conductividad eléctrica así como el pH de los suelos directamente sobre la muestra de suelo seco. Ambos procedimientos requieren de la preparación de una suspensión con agua destilada.

Procedimiento para preparar la suspensión:

- Pesar 5 g de suelo seco a 40 °C en un tubo de centrifuga de 50 ml.
- Agregar agua destilada a temperatura ambiente hasta 25 ml.
- Agitar 5 min, dejar reposar entre 40 min

Una vez obtenida la suspensión, como se explica al comienzo del capítulo, el procedimiento es el mismo que para las mediciones de agua.

16. POTENCIOMETRÍA

La potenciometría o técnicas potenciométricas se basan en la medida de una diferencia de potencial, valor que guarda alguna relación con la concentración de una determinada sustancia en la solución.

16.1. Medida de pH

Definimos al pH como el logaritmo inverso de la concentración de hidrogeniones. El pH depende entonces de la concentración de iones hidrogeno que posea una solución. Los distintos valores de pH se organizan en una escala del 0 al 14, siendo el punto medio (pH=7) el punto denominado “pH neutro”. Para determinar la acidez o alcalinidad de una solución debemos analizar su pH: si el mismo está por debajo de 7 se considerará una sustancia ácida, en cambio si se encuentra por encima de 7, la consideraremos básica o alcalina. Mientras más cercanas den las mediciones a los extremos de la escala, más ácida o más básica será la solución según corresponda.

16.1.1. Medición de pH en agua

Para tener un valor de referencia, el pH del agua de consumo oscila entre 6 y 8. Para medir esta propiedad en una solución utilizamos una técnica potenciométrica, por lo cual necesitamos el uso de un electrodo que nos permita medir la concentración de hidrogeniones presentes en solución.

Materiales y reactivos:

- pH metro “Methrom 632”
- Termómetro
- Piseta con agua destilada
- Solución de calibración pH 7 y 4 (no deben tener más de un mes de uso)
- KCl (para la conservación del electrodo mientras no se esté utilizando).
- Solución control de calidad (QC) de pH 4.
- Recipientes de aproximadamente 30 ml para colocar las muestras.

Precauciones

El electrodo del pH metro es sumamente frágil, por lo cual debemos ser cuidadosos en su manipulación. Mientras no se utiliza debe sumergirse en solución de KCl 3M. Siempre que lavemos el electrodo con agua destilada, cuidar que esta solo moje al electrodo y no a otras partes del aparato.

Procedimiento:

- Comenzar encendiendo el pH-metro oprimiendo el botón rojo de la parte frontal. Retirar el electrodo de la solución en la que se encuentra suspendido y lavar con agua destilada.
- El segundo paso es la calibración del instrumento. Es muy importante ya que de esto condicionará el análisis de las muestras. Para calibrar el pH-metro se utiliza soluciones patrones de pH 7 y 4 y un QC, al mismo tiempo que se manipulan las perillas (los pasos los encontrará con más detalle en el protocolo correspondiente).
- Sumergir el electrodo en la solución a medir (en el caso de tierras se utiliza la suspensión de suelo seco a 40° y agua destilada)
- Oprimir “meas”, deje estabilizar unos segundos (trate que el tiempo que espera para la lectura sea igual para estándares, QC y muestras)

- Tomar el valor del pH, oprima “stand by” y retire y lave el electrodo con la pisseta.
- Realice el duplicado repitiendo estos dos últimos pasos.
- Medir el valor de pH de la solución QC pH 4
- Al finalizar apague el equipo.
- Dejar el electrodo sumergido en KCl 3M
- Registrar en la tabla control soluciones, el valor de QC, la fecha y si hubo cambios de soluciones estándar y QC

Previamente conviene familiarizarse con las perillas y botones del instrumento.

16.1.2. Medición de pH en suelo

Como ya se anticipó en el capítulo de conductimetría, para ambas mediciones (conductividad y potenciometría en tierra) requieren del preparado de una suspensión con agua destilada.

Procedimiento para preparar la suspensión:

Pesar 5 g de suelo seco a 40 °C en un tubo de centrifuga de 50 ml.

Agregar agua destilada a temperatura ambiente hasta 25 ml.

Agitar 5 min, dejar reposar entre 40 min

Una vez obtenida la suspensión el procedimiento es el mismo que para las mediciones de agua.

Aclaración: Se prepara una suspensión por cada muestra y se utiliza para realizar ambas mediciones.

17. EXPERIMENTACIÓN CON ANIMALES

17.1. Medida del metabolismo glucídico, aprendizaje y memoria in vivo

Es conocido que el metabolismo glucídico es afectado por la presencia de fluoruro, un contaminante normal del agua de consumo. Aun cuando muchos países tiene controlado el contenido de fluoruro en aguas de red, la alta concentración de fluoruro en aguas de pozo puede pasar desapercibida por no causar sabor desagradable. En la provincia de Santa Fe es elevado el porcentaje de pozos que superan 1.5 ppm, límite establecido por la Organización Mundial de la Salud y el Código Alimentario Argentino. Otro serio efecto del fluoruro, aun en etapa de estudio, es su efecto sobre la capacidad de aprendizaje y memoria. En algunos trabajos se ha demostrado que niños de zonas de elevado contenido en el agua de consumo tienen menor coeficiente intelectual que otros de zonas libres de fluoruro. Por otra parte se ha demostrado que el cerebro consume menos glucosa ante la administración de fluoruro, lo cual podría ser la causa del efecto sobre memoria y aprendizaje. Se realizaron experimentos en ratas en los cuales se midió in vivo la captación de glucosa por el sistema nervioso y el aprendizaje y memoria.

En este trabajo se evaluó la relación entre la captación de glucosa por tejidos independientes de insulina y el aprendizaje y memoria en ratas tratadas con fluoruro.

Se realizaron dos experimentos en ratas: en el primero (experimento agudo) se administró una dosis de fluoruro por sonda orogástrica y en el segundo (experimento crónico) se suministró el fluoruro a través del agua de bebida durante 30 días. Se utilizaron dosis de fluoruro que afectan el metabolismo glucídico (8 mg F/kg de peso corporal). Los datos obtenidos se utilizaron en un modelo matemático que permite evaluar *in vivo* (sin efectos sedantes o anestésicos) los efectos del fluoruro sobre los componentes del sistema homeostático de la glucosa (consumo de glucosa por tejidos dependientes e independientes de insulina, consumo o producción hepática de glucosa, secreción de insulina y consumo de la hormona). En estos mismos animales se evaluó la capacidad de aprendizaje y memoria utilizando el test de nado (test de Morris).

17.1.1. Técnicas que se llevaron a cabo en este trabajo:

Sobrecarga oral de glucosa
Medición de glucosa
Medición de insulina por RIA
Perfusión de cerebro
Test de nado

Sobrecarga de glucosa

La sobrecarga de glucosa se realiza para medir glucemia e insulinemia en ratas tratadas y control. De esta manera se obtienen parámetros para emplearlos luego en un modelo matemático, una herramienta que consta de ecuaciones matemáticas a través de las cuales se miden parámetros cinéticos (velocidades) de formación y consumo de glucosa y secreción y consumo de insulina a través de diversas constantes, entre ellas un parámetro mide la velocidad de consumo de glucosa por tejidos independientes de insulina, que se asume mayormente representa al tejido nervioso. Una disminución en esta constante estaría indicando una menor captación de glucosa por el sistema nervioso.

Pasos para la sobrecarga de glucosa:

Se utilizan 10 ratas Sprague Dawley sanas con un ayuno 8-12hs.

EXPERIMENTACIÓN CON ANIMALES

Se les administra 1,5ml/100g de peso corporal de solución de glucosa por sonda orogástrica. Se toman muestras de sangre durante 6hs, cada 5-10-15-30-60 minutos. Para la extracción se realiza un corte longitudinal de 1-2cm en el extremo caudal de la cola, lateral a la vena. De esas muestras obtenemos 100 ul de sangre, que se colocan en capilares con heparina. Se centrifuga la muestra a máxima velocidad durante 20 minutos y se obtienen 50ul de plasma aproximadamente. De esos 50ul de plasma, 25 se utilizan para la medición de glucemia y 25 para la medición de insulinemia.

Medición de glucemia:

La medición de glucemia se realiza por **espectrofotometría**: método utilizado para medir cuanta luz absorbe una sustancia química, midiendo la intensidad de la luz cuando un haz luminoso pasa a través de la muestra. Para dicha medición se utiliza un KIT comercial.

Pasos

Se realiza una curva de calibración que tiene como toda curva de calibración un blanco (B) y soluciones estándar (S1-S3) de concentración conocida.:

Blanco

S1: 2,5ul

S2: 5ul

S3: 7,5ul

También se procesa una solución control de calidad de concentración conocida (QC) y que indicará si la medición es correcta o no

QC: 5ul

Se le coloca el reactivo

Se deja 10 minutos en incubación a 37°C

Se coloca en el lector de microplaca que es un instrumento que permite medir la absorbancia de cada muestra.

La determinación es específica ya que la glucosa que se halla en los estándares y en las muestras es oxidada específicamente por una enzima que la transforma en ácido glucónico y en H₂O₂. Luego los productos de la primera reacción son oxidados por la POD y forman quinonimina roja, que es un compuesto de color rojo, cuya absorbancia se mide con el equipo mencionado. Por lo que podemos decir que a mayor color, mayor concentración sanguínea de glucosa.

Medición de insulina por ria:

La insulina es una hormona peptídica sintetizada en las células beta del páncreas. Participa principalmente en la regulación de la glicemia, aumentando en períodos posprandiales (efectos hipoglucemiantes).

El método de medición utilizado en este trabajo es un radioinmunoensayo (RIA) estima la cantidad de hormona que contiene una solución en función de la radiación emitida. Para esta determinación se requiere un laboratorio específico y habilitado para tal fin.

Componentes del KIT:

Insulina de rata estándar de concentraciones 10, 5, 2.5, 1.25, 0.635 ng/ml (estándar)

Anticuerpos:

1° o Antihormona: se genera en cobayo administrándole insulina de rata como antígeno.

2° o Antianticuerpo: se genera en cabra administrándole IgG de cobayo.

Hormona marcada con un isótopo radioactivo: I¹²⁵, el cual emite radiación electromagnética de tipo gamma que puede ser medida.

EXPERIMENTACIÓN CON ANIMALES

Reactivo precipitante: hace que la hormona unida al anticuerpo quede adherida al fondo del tubillo.
Buffer, como amortiguador de pH.

Pasos

Extracción de sangre del animal en estudio con heparina como anticoagulante en tubos capilares para hematocrito, aproximadamente 100 ul de sangre y 50 ul de plasma.

Centrifugar la muestra sanguínea para la obtención de plasma, en el cual se encuentra la insulina que mediremos. Se cortan los capilares a la altura del "buffy coat" (asi se llama la zona donde quedan los leucocitos, entre el plasma y los eritrocitos), utilizando un disco diamantado motorizado.

Cargar 20ul de agua destilada en tubillos.

Cargar 25ul de plasma.

Cargar reactivos según el orden mostrado en la siguiente tabla:

	Cant (ul)	Buffer	Insulina marcada I¹²⁵	Anticuerpo	vortex	4°C 24hs	Precipit	Vortex	4°C 20'
NSB	-	50	25	-	SI	SI	250	SI	SI
BO	-	25	25	25			250		
S0	25	-	25	25			250		
S1	25	-	25	25			250		
S2	25	-	25	25			250		
S3	25	-	25	25			250		
S4	25	-	25	25			250		
S5	25	-	25	25			250		
QC1	25	-	25	25			250		
QC2	25	-	25	25			250		
Muestra	25	-	25	25			250		

Centrifugar las muestras durante 20' a máxima velocidad.

Se decanta el sobrenadante.

Se dejan los tubos invertidos sobre una gradilla con plástico y papel absorbente para eliminar restos de material radiactivo. Antes de medir si quedara liquido eliminarlo con el uso de un hisopo.

Se miden las muestras en el Contador de centelleo sólido.

Contador de centelleo sólido: determina la energía de radiación γ (gamma). Produce destellos luminosos por interacción con el centellador, que se encuentra en el fondo del equipo, estos destellos luminosos son convertidos en pulsos eléctricos en el fotomultiplicador.

El número de fotones emitidos y la energía son directamente proporcionales a las cuentas por minuto (radiación).

Contamos con dos insulinas: una es la que se encuentra en el plasma, llamada insulina fría y, la otra, es la insulina marcada con I125. Ante la presencia de anticuerpos (anti-insulina de rata) las insulinas competirán para unirse a éstos.

Primero, se agrega (en este kit el anticuerpo permanece en solución. En otros kit el anticuerpo puede estar fijado al tubillo) el anticuerpo al tubillo que ya tiene la insulina fría y, luego, agregamos insulina marcada. La radiación que emite el tubillo será proporcional a la cantidad de insulina marcada que se unió previamente al anticuerpo. Por lo tanto:

Una muestra con baja concentración de hormona es debido a que es poca la cantidad de hormona fría que se une al anticuerpo y es mucha la hormona radioactiva.

Una muestra con alta concentración de hormona se debe a que hay mayor cantidad de hormona fría unida al anticuerpo que hormona radioactiva.

EXPERIMENTACIÓN CON ANIMALES

Antes de medir las muestras en el contador de centello, se agrega reactivo precipitante, cuya función es que la hormona unida al anticuerpo quede adherida al fondo del tubillo y, luego, por decantación se descarta el sobrenadante.

Test de nado

Cuidado de animales:

Todos los experimentos que involucran animales se llevan a cabo bajo las normas internacionales de cuidado y uso de animales de laboratorio.

Se utilizaron ratas hembras Sprague-Dawley de 21 días. Durante los experimentos los animales se mantuvieron con ciclo luz-oscuridad (12h-12h) y con temperatura entre 23-25°C en contenedores con cama de viruta de madera y extracción de aire. Semanalmente se controló el peso corporal y estado general del animal, registrándose: movilidad, agresividad, consumo de alimento y agua, hábitos de limpieza y letargia. El peso corporal se determinó semanalmente con una balanza de 1 g de apreciación y el crecimiento se evaluó por comparación con curvas de crecimiento de ratas normales de la misma línea y sexo. El consumo de alimento se determinó con una balanza de 0,1 g de apreciación.

Evaluación de aprendizaje y memoria:

Se utilizó el test de nado para evaluar el efecto del tratamiento con fluoruro en el aprendizaje de referencia espacial y la capacidad de memoria. El sistema consiste en un tanque de 200 cm de diámetro, 35 cm de profundidad con agua a 25 °C. El tanque se dividió en cuatro cuadrantes iguales y fue ubicado en una habitación siempre en la misma posición. Una plataforma de escape (de 10 cm de diámetro, 2 cm por debajo de la superficie del agua) fue colocada en un cuadrante constante del tanque. Las ratas fueron controladas por una cámara digital mediante la cual se registraron una serie de vídeos sobre los que se realizaron mediciones de tiempo en arribar a la plataforma. Se realizaron ensayos de aprendizaje cada 20 minutos 4 veces por día durante 5 días consecutivos. En estos ensayos las ratas se colocaron en un punto fijo de un cuadrante que no contiene la plataforma y se permitieron 90 segundos por nado para que la rata encuentre la plataforma y se dejó 20 segundos de permanencia en ella. En cada ensayo se midió el tiempo empleado para hacerlo, denominado tiempo de latencia. Al sexto día se retiró la plataforma y se midió la cantidad de tiempo que permaneció la rata en el cuadrante en que se hallaba originariamente la plataforma. La cantidad de veces que cruza la rata por encima del sitio de la plataforma, el tiempo necesario para hallarlo y el tiempo relativo de permanencia en cada cuadrante son medidas de la capacidad de memoria. El test se realizó con grupos de animales tratados con y sin fluoruro en los 5 días de aprendizaje. El tiempo necesario para hallar la plataforma y la permanencia en cada cuadrante son medidas del aprendizaje.

Técnicas estadísticas y control de calidad:

Las determinaciones se realizaron por duplicado y se sometieron a control de calidad. Los errores aleatorios fueron estimados por el coeficiente de variación. Los errores sistemáticos fueron controlados a través de las unidades de desvío estándar de una muestra “control de calidad”.

El análisis estadístico de los resultados se realizó con diferentes paquetes estadísticos del software R 3.2.3. En todos los ensayos se utilizó un nivel de significación del 5%. Se realizó además con el mismo software los estudios correspondientes de normalidad e igualdad de variancias con el fin de determinar si se trabajó con las variables o sus transformaciones. Se utilizaron pruebas paramétricas o no dependiendo de los resultados de los ensayos mencionados. Los resultados se expresan como

EXPERIMENTACIÓN CON ANIMALES

mediana [rango]. La unidad de tiempo de latencia y permanencia fue segundos (s).

17.2. Radioactividad:

En el laboratorio la radiación que se maneja es mínima y por lo tanto no se requiere de un uso de vestimenta específica, excepto la utilización de guantes y guardapolvo.

El kit total tiene una actividad de 5uCi, 1uCi equivale a 7×10^{10} desintegraciones por segundo (dps) o becquerel (Bq).

La responsabilidad por la seguridad radiológica de una instalación recae en la entidad responsable (Laboratorio de Biología Ósea) y el responsable designado por ella (Dr. Alfredo Rigalli).

Las instalaciones se clasifican en clase I-II-III, esta diferencia se hace en base al riesgo radiológico y a la complejidad tecnológica asociada.

Todo eso está regulado por el ARN: autoridad regulatoria nuclear.

I¹²⁵:

Cuentas al inicio: 3000

Vida media: 60 días

Tiene 8 vidas medias.

Tiempo de medición: 1 minuto.

El kit se debe utilizar con cierta urgencia porque el isótopo a medida que pasa el tiempo pierde radioactividad. Al tener menos cuenta aumenta el error, aunque podemos medir más tiempo, pero sería poco práctico. Además se produce radiólisis de la insulina marcada, lo que puede alterar la competencia.

Descarte de material radioactivo:

Todo material que estuvo en contacto con material radioactivo debe descartarse en un contenedor específico para tal fin.

Los tubos en el container de decaimiento y el sobrenadante se tira a la pileta

Los tubos se guardan en el container de decaimiento porque, si bien, la radiación es mínima, todos juntos pueden generar un riesgo para el ambiente y las personas. En cambio, el sobrenadante se descarta en la pileta debido a que se diluye en el agua del río.

18. EXPERIMENTOS IN VITRO

18.1. Efecto de fracciones proteicas sobre la desmineralización del esmalte

18.2. Fundamentacion del tema

La caries dental es una enfermedad que junto con la erosión dental representan a las patologías orales cuya prevalencia sigue en aumento (Hammissi 2008).

Los productos lácteos son fuente de péptidos con actividad benéfica para la salud oral, cuyo efecto es atribuido al alto contenido de iones calcio y fosfato y de péptidos derivados de la caseína (Koch 2014).

Los caseinofosfopéptidos (CPP) son fracciones peptídicas derivadas de las caseínas de la leche con actividad anticariogénica debido a que tienen la capacidad de estabilizar el fosfato de calcio en la superficie del esmalte dental, previniendo así la desmineralización y promoviendo la remineralización del mismo (Moynihan 2000). La mayoría de ellos, contienen una secuencia con tres residuos fosforina seguida de dos ácidos glutámicos. Las cadenas laterales negativas correspondientes a los grupos fosfato son las responsables de la unión a minerales, especialmente al calcio.

El kéfir es una masa biótica simbiótica que combina bacterias probióticas, levaduras, lípidos y proteínas. Se encuentra envuelto en una matriz polisacárida (Glucosa-Galactosa 1:1) denominada kefirán. Posee una riqueza variada de microorganismos, siendo los más destacados: *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus* y *Saccharomyce Kéfir* (Beshkova 2002, Guzel-Seydim 2011). Al kéfir se le han atribuido numerosos beneficios como: regeneración parcial de la flora intestinal (acción probiótica), participación en la digestión de lactosa, pre-digestión de proteínas de la leche con la consecuente formación de CPP con importante acción biológica, regulación del tránsito intestinal, estimulación y regulación del sistema inmune y estimulación de la remineralización dental, entre otros (Koch 2015). Son escasos los estudios que investigaron la presencia y acción de los CPP generados en la leche tratada con kéfir sobre procesos como la caries dental, la erosión dental y la absorción de calcio.

Experimentos recientes llevados a cabo en nuestro laboratorio demostraron que la exposición in vitro del esmalte dental a leche tratada con kéfir previno la desmineralización del esmalte. El efecto protector del kéfir se evidencia por una superficie menos erosionada que la tratada con solución de pH 4.5, aún a igualdad de pH (Koch 2015).

Debido a los beneficios atribuidos al producto, decidimos enfocarnos en la identificación de los CPP y su papel en la desmineralización dental.

Los objetivos de este trabajo fueron

- Identificar el peso molecular de las fracciones peptídicas presentes en leche tratada con kéfir.
- Identificar la o las fracciones proteicas que tienen efecto protector sobre el esmalte dental en condiciones de desmineralización.

18.3. Materiales y métodos

A continuación se realiza una breve descripción de los experimentos realizados. Luego del tratamiento de leche con kéfir, se obtuvo el sobrenadante del preparado y se realizó un fraccionamiento proteico utilizando cromatografía de exclusión molecular. Se obtuvieron diversas fracciones proteicas y se compararon las mismas con las obtenidas con el sobrenadante de leche sin tratar con kéfir. A tal fin se expusieron molares de rata a diversas soluciones: saliva artificial (SA:

EXPERIMENTOS IN VITRO

control negativo de desmineralización), ácido láctico (AL: control positivo), las fracciones obtenidas: fracción 1 (F1), fracción 2 (F2) y fracción 3 (F3) y el sobrenadante de leche tratada con kéfir (SK). Para evaluar el proceso de desmineralización se evaluó el cambio en la densidad mineral de los molares.

A continuación se describen en detalle las técnicas y procedimientos utilizados.

18.3.1. Obtención de fracciones peptídicas

El tratamiento de la leche con kéfir se realizó durante 150 minutos a 37 °C (Fina 2016). Se utilizó kéfir obtenido en locales de ventas de este tipo de productos y de consumo libre. Se separaron los péptidos y proteínas presentes en el sobrenadante de leche de vaca tratada con kéfir utilizando cromatografía de exclusión molecular con una columna de Sephadex G25. El equipo utilizado dispone de un detector UV que mide la absorbancia producida al fluir la muestra, valores que fueron procesados en el software BAS1.0. Luego, a partir de los datos obtenidos se calcularon los volúmenes de elución de cada fracción, el peso molecular y el porcentaje que representa cada fracción respecto del total utilizando un software de diseño propio que funciona en el entorno R. De la misma manera se separaron las fracciones proteicas del sobrenadante de leche sin tratamiento con kéfir.

Las fracciones obtenidas fueron guardados a -20°C para su análisis. Utilizando la misma columna se procesaron patrones de peso molecular que permitieron calcular los pesos moleculares (albúmina sérica bovina, tripsina, insulina, fenilalanina) de cada fracción de péptidos de los sobrenadantes. Con el volumen de elución (V_e) y el volumen muerto de la columna (V_0) se calculó la constante de elución (K_{av}) y a partir de la regresión entre el logaritmo del peso molecular de los patrones y el valor de K_{av} se obtuvo el peso molecular de cada fracción peptídica. Se obtuvieron cinco fracciones proteicas en el sobrenadante de leche tratada con kéfir (SK) y seis fracciones en la leche sin tratamiento. En SK las fracciones se denominaron: F1, F2, F3, F4 y F5 (ilustración 2). En el sobrenadante de leche sin tratamiento se hallaron fracciones coincidentes en peso molecular con las mencionadas (que se nombraron de la misma manera: F1, F2, F3, F4, F5) y una fracción proteica diferente: Fd (ilustración 1). El efecto de algunas de estas fracciones sobre el proceso de desmineralización del esmalte se evaluó sobre molares de rata como se detalla a continuación.

18.3.2. Efecto de los péptidos sobre el esmalte dental

Para evaluar el efecto de los péptidos sobre el proceso de desmineralización dental se utilizaron molares de ratas Sprague Dawley hembras provenientes de grupo controles de experimentos realizados con anterioridad. Las muestras fueron divididas aleatoriamente en 6 grupos. Cada espécimen se sumergió en 500 ul de solución durante 72 h a 4 °C con 15 minutos de agitación cada una hora. Cada solución se evaluó sobre 6 dientes y el experimento se repitió 2 veces en idénticas condiciones. Todas las soluciones utilizadas (excepto SA) tuvieron ácido láctico 0,1 M para garantizar que tengan la misma acidez. La tabla siguiente muestra las características de cada solución y su abreviatura.

Grupo	Abreviatura
saliva artificial: control negativo de desmineralización	SA
ácido láctico 0,1 M: control positivo de desmineralización	AL
fracción 1	F1
fracción 2	F2
fracción 3	F3

sobrenadante de leche tratada con kéfir

SK

Se midió la densidad mineral (dm) de los molares antes (t_0) y después (t_F) del tratamiento con las soluciones descritas. Con dichos valores se calculó la razón de desmineralización (R) entre la dm a t_F y la dm a t_0 . Se interpreta un valor de $R < 1$ como desmineralización y $R \geq 1$ ausencia de desmineralización. Para la medida de la dm se tomaron radiografías de los molares simultáneamente con un patrón conteniendo 8, 19, 29, 41, 52 mg Ca/cm². Las mediciones se realizaron con un software específico (ImageJ) utilizando imágenes digitales de las radiografías obtenidas con un equipo de rayos X de 70KV (Moreno 2009).

18.3.3. Análisis estadístico

la comparación de los valores de R entre los grupos se realizó con ANOVA a un criterio, con un nivel de significación del 5% y el post test LSD Bonferroni. Previamente se evaluó la homocedasticidad y la normalidad de las muestras utilizando test de Bartlett y Shapiro Wilk, respectivamente. Experimentos previos permitieron anticipar que 6 molares por cada solución serían suficientes para el ensayo (test de potencia, pwr, R).

18.4. Resultados

Las Figura 18.1 muestran cromatogramas representativos de leche y leche tratada con kéfir, respectivamente. Se observa la ausencia de la fracción Fd en el sobrenadante de leche tratada con kéfir y un incremento de la fracción F1.

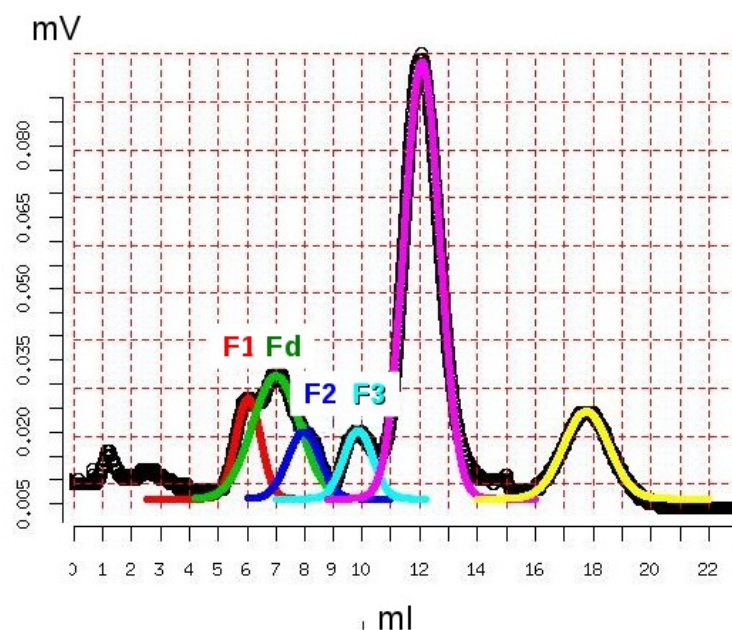


Figura 18.1. Cromatograma de sobrenadante de leche. Las líneas continuas muestran la función de ajuste de cada fracción obtenida como se detalló en materiales y métodos.

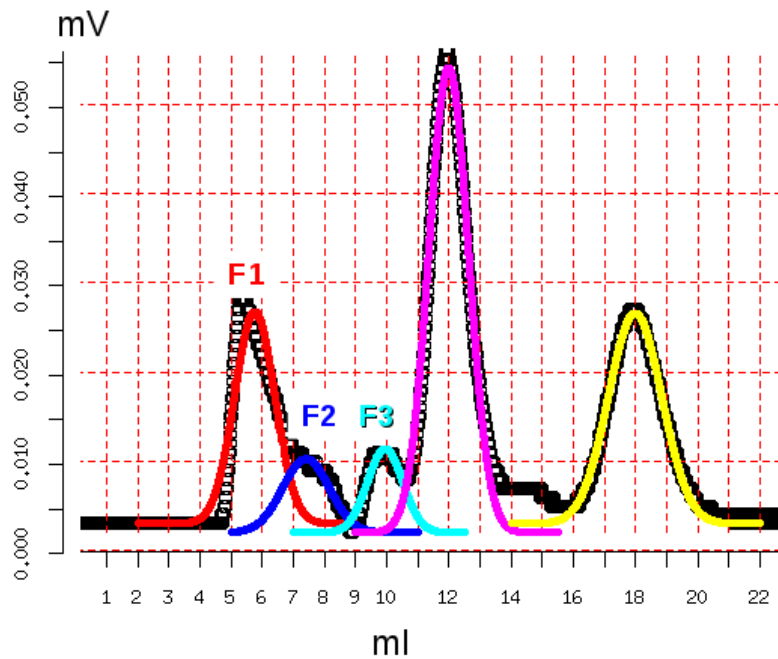


Figura 18.2. Cromatograma de sobrenadante de leche tratada con kéfir. Las líneas continuas muestran la función de ajuste de cada fracción obtenida como se detalló en materiales y métodos.

La tabla I muestra los valores de los pesos moleculares de cada una de las fracciones obtenidas. No se hallaron diferencias significativas en los pesos moleculares de las fracciones halladas. Sin embargo, una de las fracciones encontradas en la leche sin tratar (Fd) no se halló en la leche tratada con kéfir.

Tabla I: pesos moleculares (KDa) de las fracciones obtenidas de leche y leche tratada con kéfir luego de fraccionarlas por FPLC (media±SD)

Tabla I: pesos moleculares (KDa) de las fracciones obtenidas de leche y leche tratada con kéfir luego de fraccionarlas por FPLC (media±SD)		
fracción	leche	leche + kéfir
F1	96,5±16,0	95,2±8,9
Fd	53,0±5,8	-----
F2	28,8±0,8	30,8±2,2
F3	9,7±0,5	9,8±0,8
F4	2,7±0,2	2,8±0,2
F5	0,1±0,01	0,1±0,01

Se observó un efecto desmineralizante del AL y F2 con respecto a la SA. Contrariamente las fracciones F1, F3 y SK no mostraron diferencia respecto de SA y demostraron tener efecto inhibitorio de la desmineralización provocada por el medio ácido. La tabla II muestra los valores de R obtenidos.

Tabla II: Razón de desmineralización (R) en los diferentes grupos experimentales. Los resultados se muestran como $\text{media} \pm \text{SD}$. * indica diferencia $p < 0,05$ respecto de SA, # indica diferencia $p < 0,05$ respecto de AL, ANOVA, post test LSD Bonferroni.

Grupo	R
SA: saliva artificial: control negativo de desmineralización	$0.95 \pm 0.30\#$
AL: ácido láctico 0,1 M: control positivo de desmineralización	$0.64 \pm 0.12^*$
F1	$1.01 \pm 0.39\#$
F2	$0.72 \pm 0.16^*$
F3	$1.04 \pm 0.13\#$
SK: sobrenadante de leche tratada con kéfir	$0.98 \pm 0.24\#$

18.5. Discusión y conclusiones

Las leches fermentadas poseen péptidos a los cuales se les atribuyeron diferentes propiedades biológicas (Koch 2014) entre ellas la inhibición de la desmineralización del esmalte dental (Moynihan 2000). En la leche tratada con kéfir se identificaron péptidos (Ebner 2015) pero su efecto sobre el proceso de desmineralización no ha sido aún comprobado. En un trabajo previo de este grupo se comparó el efecto del sobrenadante de leche y el de leche tratada con kéfir sobre la desmineralización del esmalte inducida por pH ácido sobre dientes bovinos (Koch 2015). En este trabajo se demostró que si bien el sobrenadante de leche no tenía efecto inhibitorio de la desmineralización, sí presentó dicho efecto el sobrenadante de leche tratada con kéfir. Por dicha razón en este trabajo sólo se evaluó éste último y las fracciones proteicas obtenidas a partir de él.

En la leche sin tratamiento se encontraron 6 fracciones peptídicas por cromatografía de exclusión molecular, cuyos pesos moleculares se indican en la tabla I. El tratamiento de la leche con kéfir presentó 5 fracciones, no hallándose la fracción que llamamos Fd. Probablemente, la actividad biológica del kéfir consuma proteínas de esta fracción transformándolas en estructuras que se detectarían en otras fracciones. En este trabajo investigamos el efecto del SK y sus fracciones F1, F2 y F3. En este trabajo se investigaron las fracciones F1, F2 y F3 de pesos moleculares correspondiente al rango que se consideran proteínas, dejando para experimentos posteriores los estudios con las fracciones de menor peso molecular. Todas las soluciones investigadas tuvieron una concentración de ácido láctico 0,1 mol/L, excepto la saliva artificial que se utilizó como control negativo de desmineralización. Esta composición de las soluciones garantiza que de observarse algún cambio en el proceso de desmineralización no se debe a diferencias en el pH o la acidez titulable de las mismas sino a la presencia de diferentes componentes, que por el método de separación utilizado serían las proteínas de cada fracción. La medida del proceso de desmineralización puede realizarse por diferentes procedimientos como la perfilometría, cambios en el peso de los molares o cambio en la densidad mineral. La medición de R (razón de desmineralización) se realizó por el último método por disponibilidad de equipo y debido a que específicamente mide la ganancia o pérdida de calcio, mientras que el peso no estaría representando solamente dicha variación.

EXPERIMENTOS IN VITRO

Se confirma que el sobrenadante de leche tratada con kéfir tiene efecto protector sobre la desmineralización ocasionada por el medio ácido. Las fracciones F1 y F3 mostraron efecto protector ante la desmineralización, mientras que la fracción F2 no tuvo efecto protector y se comportó exactamente igual que el AL.

19. INDICE ALFABÉTICO

alícuota.....	48	cuantitativas.....	1
apreciación.....	53	dimensionales.....	1
balanzas.....	55	media.....	20
centrífuga.....	58	mediana.....	20
ángulo fijo.....	59	medición.....	
ángulo móvil.....	59	directa.....	7
microhematocrito.....	59	indirecta.....	7
precauciones y uso.....	59	micropipetas.....	53
refrigerada.....	59	muestra.....	20
Tubos de 50 ml.....	59	múltiplos.....	2
Tubos de centrífuga.....	59	patrón primario.....	48
Tubos Eppendorf.....	59	percentilos.....	20
coeficiente de variación.....	9	peso molecular.....	45
Componente.....	44	población.....	20
concentración.....	46	por exceso.....	12
densidad.....	46	pruebas estadísticas.....	
g %.....	46	anova.....	28
molaridad.....	46	chisq.test.....	30
normalidad.....	46	LSD.test.....	29
%.....	46	p-value.....	31
g/l.....	46	Pearson's Chi-squared.....	30
% P/V.....	46	Prueba de Kolmogorov-Smirnov.....	23
%P/P.....	46	Prueba de Shapiro Wilk.....	23
CV%.....	10	t de Student.....	25
Dalton.....	45	t.test.....	25
desvío estándar.....	20	tablas de contingencia.....	29
disolución.....	44	Test de Bartlett.....	23
errores.....		Test de Fligner.....	23
absoluto.....	8	test de homogeneidad de variancias.....	22
aleatorios.....	8	test de normalidad.....	22
coeficiente de variación.....	9	Var test.....	23
equivocaciones.....	17	wilcox.test.....	25
por defecto.....	11	rango.....	20
por exceso.....	11	Sistema heterogéneo.....	44
propagación.....	13	Sistema homogéneo.....	44
relativo.....	8	solución.....	44
sistemáticos.....	8	concentrada.....	46 s.
unidades de desvío estándar.....	10	diluída.....	47
escalado de técnica.....		madre.....	47
equipamiento.....	69	pasos para preparar.....	48
propagación de errores.....	69	preparación a partir de sustancia impura.....	50
Escalar una técnica.....	68	stock.....	50
estadísticas.....		solutos.....	
desvío estándar.....	20	disociables.....	44
intervalo de confianza.....	20	electrolitos.....	44
media.....	20	iónicos.....	44
mediana.....	20	no disociables.....	44
percentilos.....	20	no electrolitos.....	44
rango.....	20	no iónicos.....	44
cuartiles.....	20	submúltiplos.....	2
fuerza centrífuga.....	58	sustancia impura.....	50
intervalo de confianza.....	20	uartiles.....	20
magnitudes.....		UDS.....	10
adimensionales.....	1	unidades de desvío estándar.....	10
cualitativas.....	1		

INDICE ALFABÉTICO

FUNDAMENTOS TEÓRICO – PRÁCTICOS PARA AUXILIARES DE LABORATORIO

El laboratorio de investigaciones biológicas requiere de conocimientos generales, concretos y precisos que a la hora de la realización de tareas garanticen un resultado confiable.

Si bien la adquisición de estos conocimientos están garantizados por diversas carreras, la capacitación es necesaria para personas que no han cursado las mencionadas carreras o están en sus inicios.

Los años de trabajo en un laboratorio, los errores sistemáticos y aleatorios y desafortunadamente los accidentes y equivocaciones no hacen más que corroborar y fundamentar la necesidad de la capacitación en conceptos básicos.

Esta obra concentra los puntos más importantes que debe tener presente un auxiliar de laboratorio, en su camino a ser un investigador. En el desarrollo se incluyeron conceptos matemáticos, físicos, químicos, estadísticos y de seguridad en el laboratorio.

ISBN 978-987-42-3143-7

