

FUNDAMENTOS TEÓRICO – PRÁCTICOS PARA AUXILIARES DE LABORATORIO

Física – Química – Matemática – Estadística – Seguridad

Editor

Alfredo Rigalli

Autores

Radenti, Juana María
Cornaglia, María Virginia
Véscovo, María Belén
Lehn, Santiago Alberto
Balmaceda, Gabriel
Ferrer, Alejo
Paleari, María Florencia

Colaboradores

Chulibert, María Eugenia
Ansaldi, Mateo
Izaguirre, Camila
Piñón, Camila
Henrich, Leandro Martín

2016

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



PRÓLOGO

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 convertido 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. Área de Investigación: efectos biológicos y ambientales del fluoruro.



AUTORES

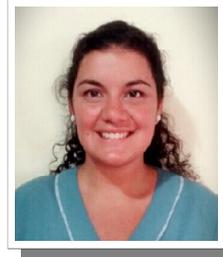
Radenti, Juana María.

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.



María Florencia Paleari.

Estudiante de Medicina en la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Rosario. Becaria del Laboratorio de Biología Ósea. Área de investigación: Análisis de la microarquitectura de huesos de ratones con diferente susceptibilidad al fluoruro.



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.



Mateo Ansaldi.

Estudiante de Medicina en la Universidad Nacional de Rosario. Tema de investigación: Evaluación del contenido de glucosa, sacarosa y fructosa en bebidas no alcohólicas de distribución en la República Argentina.



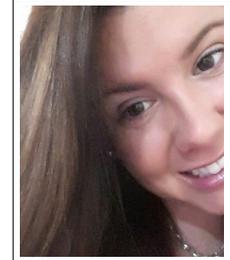
Camila Izaguirre.

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.



Camila Piñón.

Estudiante de Medicina y becaria del Laboratorio de Biología Ósea de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Rosario. Área de investigación: Efectos del flúor en tierra y agua sobre el crecimiento de cultivos de interés en la región pampeana de la Argentina.



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.



1. TABLA DE CONTENIDOS

1.TABLA DE CONTENIDOS.....	1
2.FUNDAMENTOS MATEMÁTICOS.....	3
2.1.Magnitudes.....	3
2.2.Cambio de unidades.....	3
3.MEDICIONES Y ERRORES.....	6
3.1.Medición.....	6
3.1.1.Tipos de mediciones.....	6
3.2.Errores.....	6
3.2.1.Tipos de errores.....	7
3.3.Control de calidad.....	8
3.3.1.Coeficiente de variación.....	8
3.3.2.Unidades de desvío estándar.....	9
3.4.Errores por exceso y defecto.....	10
3.5.Propagación de errores.....	12
3.6.Detección de equivocaciones.....	16
4.ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA BÁSICA.....	19
4.1.1.Población.....	19
4.1.2.Muestra.....	19
4.2.Estadísticas descriptivas.....	19
4.2.1.Media.....	20
4.2.2.Mediana.....	20
4.2.3.Rango.....	20
4.2.4.Desvío estándar.....	20
5.ESTADISTICA INFERENCIAL.....	22
5.1.Pruebas de normalidad.....	23
5.1.1.Prueba de Kolmogorov Smirnov.....	23
5.1.2.Prueba de Shapiro Wilk.....	23
5.2.Pruebas de homogeneidad de variancias.....	23
5.2.1.Prueba de Bartlett.....	24
5.3.Comparación de dos muestras de datos.....	25
5.3.1.Comparación medias dos muestras (normales) independientes	25
5.3.2.Comparación medias dos muestras (normales) dependientes.....	25
5.3.3.Comparación medianas dos muestras (no normales) independientes.....	25
5.3.4.Comparación medianas dos muestras (no normales) dependientes.....	25
5.4.Comparación de más de dos muestras de datos.....	26
5.4.1.ANOVA a un criterio con aov y LSD.test.....	28
5.5.Tablas de contingencia.....	29
5.6.Test Chi cuadrado.....	30
6.CURVA DE CALIBRACIÓN.....	32
6.1.Regresión lineal.....	32
6.1.1.Obtención de recta de regresión con lm.....	32
6.1.2.Obtención de recta de regresión con lsfit.....	33
6.2.Curva de calibración.....	34
6.2.1.Obtención de una curva de calibración.....	34
6.2.2.Interpolación.....	35
6.2.3.Extrapolación.....	36

TABLA DE CONTENIDOS

7.SOLUCIONES.....	39
7.1.Solución.....	39
7.2.Tipos de solutos.....	39
7.3.Peso molecular.....	40
7.4.Cantidad de soluto.....	40
7.5.Concentración.....	41
7.5.1.% P/V o g %.....	41
7.5.2.% P/P.....	41
7.5.3.Molaridad.....	42
7.5.4.Normalidad.....	42
7.5.5.ppm.....	42
7.6.Dilución.....	42
7.7.Fraccionamiento de soluciones.....	43
7.8.Preparación de una solución estándar a partir de patrón primario.....	43
7.8.1.Pasos para preparar una solución.....	43
7.9.Preparación de soluciones a partir de drogas impuras.....	45
7.9.1.Drogas impuras.....	45
8.INSTRUMENTAL.....	48
8.1.Micropipetas.....	48
8.2.Balanzas.....	50
8.3.Elección de un instrumento de medición.....	51
8.3.1.Elección de micropipetas.....	51
8.3.2.Elección de balanza.....	52
8.4.Centrífugas.....	53
8.4.1.Calculo de la fuerza centrífuga.....	53
8.5.Tipos de centrífugas.....	54
8.5.1.por el tipo de tubos.....	54
8.5.2.por el ángulo.....	54
8.5.3.por la refrigeración.....	54
8.6.Precauciones y modo de uso.....	54
8.7.Centrífugas disponibles en el laboratorio.....	54
9.PRESENTACIÓN DE RESULTADOS.....	56
10.ESCRITURA DE UN TRABAJO REALIZADO.....	60
11.PUESTA A PUNTO DE UNA TÉCNICA DE MEDICIÓN.....	62
11.1.Escalado de una técnica de medición.....	63
11.1.1.Problema 1: equipamiento.....	64
11.1.2.Problema 2: errores y su propagación.....	64
12.INDICE ALFABÉTICO.....	67

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 los tubos al realizar una medición de glucosa: incoloro – coloreado.

Una rata: joven – adulta.

una muestra: 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**

Magnitudes dimensionales: tienen un número y una unidad

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

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 algo respecto del sistema que tiene ese valor.

Otras magnitudes son adimensionales pero se les asigna arbitrariamente una unidad. No son comunes, pero puede enfrentarlas.

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

2.2. 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}
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

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

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.

1- $10^3 = 1000$

2- $1/10^3 = 10^{-3}$

3- $10^5 \cdot 10^2 = 10^7$

Realicemos unos ejercicios. Resuelva:

a- $10^5 \cdot 6 \cdot 10^{-6} =$

b- $3 \cdot 10^{-8} / 2 \cdot 10^{-3}$

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 μ L.

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!

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

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

$0,321 \cdot (10^{-3} \text{ L})$

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

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

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

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

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 $\mu\text{moles/dL}$. El procedimiento es el mismo que el explicado anteriormente, utilizando el factor 1. Veamos

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

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

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

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.

Reproducibile: 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: x1 y x2. El coeficiente de variación se calcula con la siguiente expresión

$$CV = \frac{\text{valor absoluto}(x1 - x2) * 100}{\text{media}(x1 : x2) * 1,41}$$

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

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

$$CV\% = \frac{\text{valor absoluto } (pH1 - pH2) * 100}{(pHm * 1.41)} = \frac{(5,40 - 5,10) * 100}{(5,25 * 1,41)} = 4,05\%$$

Ecuación 3.2

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 3.3.

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 3.3

para nuestro caso quedaría

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

Ecuación 3.4

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:

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 es 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 los 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.

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. Aquí 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 estándares 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 influenciado 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 es 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 calcular 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.

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 3.5

El error absoluto se calcula con la fórmula

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

Ecuación 3.6

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

$$c = a - b$$

Ecuación 3.7

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

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

Ecuación 3.8

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 g = 0,4 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 g

Qué error relativo estamos cometiendo entonces

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

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

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 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

Cuando realizamos un trabajo de investigación nos enfrentamos a unidades experimentales. Estas pueden ser un grupo de ratas, tubos con alguna reacción química, seres humanos, muestras de leche etc.

4.1.1. Población

Todos las unidades experimentales de la misma característica que las utilizada se denomina población.

4.1.2. Muestra

El conjunto de unidades experimentales que seleccionamos para realizar nuestro experimento se conoce como muestra. En base a esa muestra sacaremos conclusiones respecto de la población que estamos estudiando.

Ejemplo

Si queremos conocer el peso corporal de ratas Sprague Dawley machos adultos, tomaremos un número de ratas de esas características (ya veremos como se selecciona el número deseado), pero sería imposible tomar todas las ratas de esas características, ya que están distribuidas en diferentes lugares del mundo. Una vez que tenemos una muestra, haremos la o las mediciones correspondientes y luego calcularemos una serie de estadísticas descriptivas. Las estadísticas descriptivas son números que se calculan a partir de una muestra y permiten tener una idea de la población e inferir sobre la población.

4.2. Estadísticas descriptivas

Veremos hoy algunas estadísticas: media, mediana, desvío estándar, rango, cuartiles, percentiles, intervalo de confianza. Para entender definición e interpretación de las mismas nos basaremos en la siguiente tabla. Supongamos que medimos la concentración de fluoruro de un grupo de soluciones y obtuvimos los siguientes resultados. En la columna 1 vemos el nombre de la muestra, en la segunda columna el valor medido y en la tercer columna, los mismos valores de la columna 2 pero ordenados de menor a mayor (esta columna es de utilidad para el cálculo de ciertas estadísticas).

numero muestra	concentración de fluor (ppm)	ppm ordenada de menor a mayor
1	3	2
2	8	3
3	11	3
4	4	4
5	5	5
6	9	5
7	3	7
8	2	8
9	8	8
10	7	9

11	5	11
sumatoria	65	
rango	[2,11]	
media	5,9	
mediana	5	

4.2.1. Media

Si llamamos $x_1, x_2, \dots, x_i, \dots, x_n$ a las n mediciones realizadas. La media se calcula con la siguiente ecuación

$$media = \frac{\sum x_i}{n}$$

Ecuación 4.1.

En otras palabras la media se calcula, sumando todos los valores y dividiéndolos por el número de datos. En este caso $n=11$ y el valor de la media es 5.9.

4.2.2. Mediana

La mediana surge de ordenar los datos de menor a mayor y buscar el valor que toma la posición central dejando la mitad hacia un lado y la mitad hacia el otro. Cuando el número de datos es par se toma el promedio de los dos que ocupan la posición central. Para este caso el valor de la mediana es 5.

4.2.3. Rango

El 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. En este caso el rango es [2,11]

4.2.4. Desvío estándar

El desvío estándar se calcula utilizando una fórmula (que no discutiremos en este caso) que se halla incluida en cualquier planilla de cálculo.

Para calcular estas estadísticas es común utilizar funciones que vienen incluidas en las planillas de cálculo. Para el caso de la planilla Calc de libreOffice las funciones son

media = AVERAGE(...)

desvío estándar= STDEV(...)

mediana= MEDIAN(...)

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

rango = [MAX(), MIN()]

los ... en el paréntesis hace referencia a las celdas de la planilla de cálculo

para cálculo con R utilice las siguientes funciones

mean(...)

sd(...)

median(...)

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

range(...)

los de cada función indican el nombre de la tabla y la columna que deseamos calcular. Por ejemplo: tabla1\$medicion.

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.

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 en otra muestra.

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 por que 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 dice que se utilizarán pruebas paramétricas.

Si no se cumple al menos uno, se aplicarán otros pruebas, conocidos como pruebas no paramétricas.

5.1. Pruebas de normalidad

Podemos utilizar dos pruebas

- 1- Prueba de Kolmogorov-Smirnov
- 2- Prueba de Shapiro Wilk

5.1.1. 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 las cosas que nos indica el test figura

p-value = 0.3104

¿Como se interpreta?

Si p-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 grupoI se cumple el supuesto de normalidad

aplicamos el test para el grupoII de la misma manera, pero utilizando media y variancia de este grupo

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

p-value = 0.4005

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

5.1.2. Prueba de Shapiro Wilk

Este test sirve para probar supuesto de normalidad a semejanza del test de Kolmogorov Smirnov, aunque el segundo 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.

`shapiro.test(grupoI)`

p-value = 0.9276

`shapiro.test(grupoII)`

p-value = 0.1458

¿Qué opina? ¿Tienen el grupoI y el grupoII distribución normal?. Efectivamente, ya que en ambos casos el p-value fue mayor a 0.05.

5.2. Pruebas de homogeneidad de variancias.

podemos aplicar 3 tests

- 1- Test de Bartlett
- 2- Var test
- 3- 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 a R y el valor de p-value para los grupos I y II

5.2.1. Prueba de Bartlett

`bartlett.test(list(grupoI,grupoII))`
 p-value = 0.4024

`var.test(grupoI,grupoII)`
 p-value = 0.4032

`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.

Ejercicio

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? Respuesta al pie de la página¹
- 2- ¿Por qué?²

Ahora veremos como 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 deberemos preguntarnos si las muestras son apareadas o no.

Supongamos que tenemos mediciones de glucemias (g/L) en 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

1 no paramétrica

2 ya que no se cumple el test de normalidad, la p fue menor a 0.05

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 grupo I 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 a 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.

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.

5.3. Comparación de dos muestras de datos

5.3.1. Comparación medias dos muestras (normales) independientes

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

codigo en R:

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

5.3.2. Comparación medias dos muestras (normales) dependientes

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

código en R

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

5.3.3. Comparación medianas dos muestras (no normales) independientes

Si no se cumple algunos de los supuestos de normalidad y homocedasticidad, pero los datos son independientes, se utiliza el test de Mann Whitney

Código R

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

5.3.4. Comparación medianas dos muestras (no normales) dependientes

Si no se cumple algunos de los supuestos de normalidad y homocedasticidad y los datos son apareados, se utiliza el test de Wilcoxon

Código R

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

Veamos nuestros datos.

Supongamos que los datos de glucemias (g/L) de la tabla siguiente. Estos provienen de dos grupos

de ratas independiente. Por lo tanto el test sera 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 podemos considerarlos normales 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.

vemos ahora homogenidad 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 homogeneas

Entonces: datos independientes, distribuciones normales y variancias homogéneas, aplicamos t de student para datos independientes

`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 es menor que la media del grupo II:

alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0

95 percent confidence interval:

-0.6226997 -0.1373003

sample estimates:

mean of x mean of y

1.22 1.60

5.4. Comparación de más de dos muestras de datos

Ahora veremos como comparar si tres o mas muestras de datos son diferentes o no. Como vimos en

la clase 3, primero se deberían 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 solo aplicable a dos muestras de datos).

Además deberemos preguntarnos si las muestras son apareadas o no.

Supongamos que tenemos mediciones de glucemias (g/L) en 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
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 a 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 son diferentes 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 II y los restantes del III.

Entonces para ver si difieren los grupos aplico

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

Utilizando R, aplicamos el siguiente código

```
anova<-aov(glucemia~grupo,data=glucemias)
```

quiero 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), como es menor de 0.05, decimos que los tres grupos no son iguales.

Ahora para ver cuales son los grupos entre los que hallamos diferencias. Para ello utilizamos la prueba LSD.test

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

el test nos da la siguiente salida, de la cual explicamos las partes más importantes

Mean Square Error: 0.1763333

La tabla siguiente da para grupo su glucemia media, el error estándar, el número de ratas (r), el intervalo de confianza LCL-UCL y el rango (Min, Max)

grupo, means and individual (95 %) CI

	glucemia	std.err	r	LCL	UCL	Min.	Max.
I	1.22	0.08602325	5	1.032571	1.407429	1.0	1.5
II	1.60	0.05477226	5	1.480662	1.71933	1.5	1.8
III	2.08	0.30886890	5	1.407032	2.752968	1.2	3.1

alpha: 0.05 ; Df Error: 12

Critical Value of t: 2.178813

Least Significant Difference 0.5786516

Means with the same letter are not significantly different.

Esta tabla indica que 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.

Groups, Treatments and means

a	III	2.08
ab	II	1.6
b	I	1.22

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.

5.5. 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

unidadexperiment al	condicionmetabol ica	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

Tabla 5.1.

queremos ver si existe una asociación entre la condición metabólica y la condicion 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.

Los datos anteriores que obtuvimos contando lo podemos obtener con R con el siguiente código

```
> table(a$condicionmetabolica,a$condicionedad)
```

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

para ver asociación hacemos una prueba chi cuadrado

5.6. Test Chi cuadrado

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

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

```
data: table(a$condicionmetabolica, a$condicionedad)
```

$X\text{-squared} = 3.7309$, $df = 1$, $p\text{-value} = 0.05342$

El valor $p\text{-value}$, 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. Enontes ¿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 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 es riesgo de ser anormal entre los adultos: $6/7 = 0.86$ o sea 86 %

¿Cuàl 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.

6. CURVA DE CALIBRACIÓN

Una curva de calibración es un procedimiento que nos permite hallar una función o ecuación que relaciona dos variables. En general la utilizamos cuando realizamos mediciones del tipo espectroscópicas y potenciométricas. Pero también puede ser utilizado para otros fines. Habitualmente se utiliza 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 si el más común.

Ejemplos comunes de curva de calibración son la relación entre la absorbancia de diferentes concentraciones de un estándar y la concentración de una sustancia en dicha solución. También es el caso de la relación entre los milivoltios medidos a diferentes soluciones estándar y la concentración de la sustancia en dichas soluciones.

A continuación veremos la forma de obtener dicha ecuación.

6.1. Regresión lineal

La regresión lineal 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.

El método más utilizado para obtener los parámetros a y b se conoce como método de los mínimos cuadrados. Veamos como se obtienen dichos parámetros con R

6.1.1. 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 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.

6.1.2. 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`)

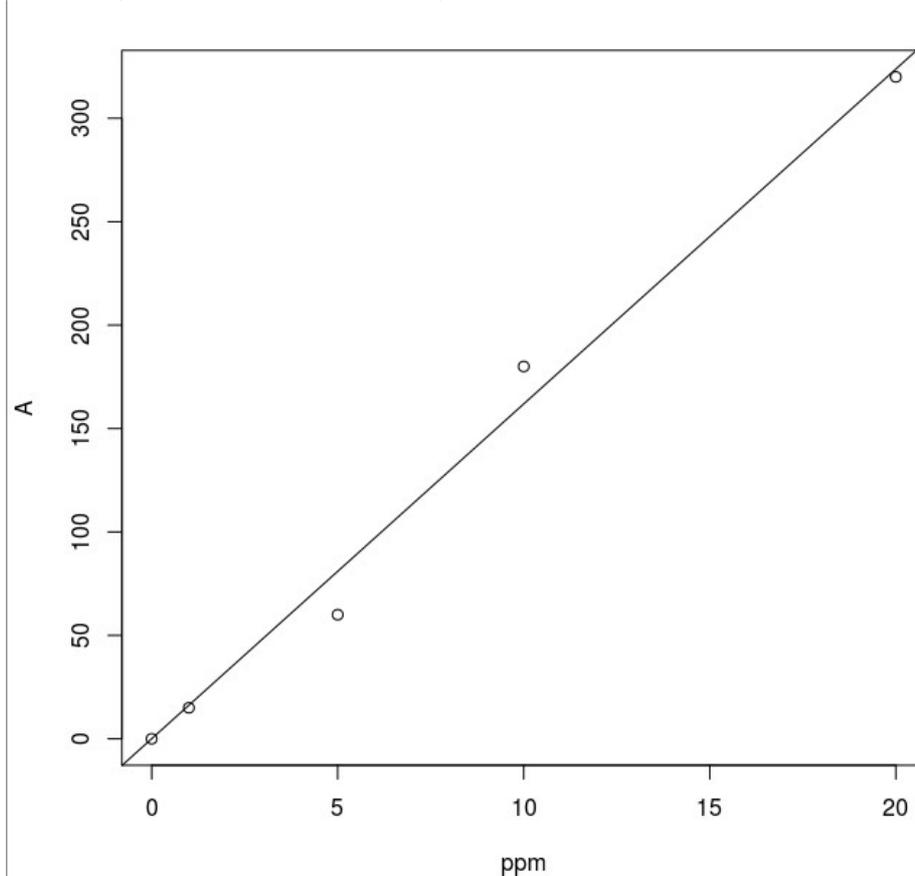
```
> cc
```

```
  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)`



6.2. Curva de calibración

Se entiende por curva de calibración una función entre dos variables, habitualmente una medida (variable dependiente) y otra conocida de estándares o patrones (variable independiente).

Por ejemplo.

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: transmitancia 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.

6.2.1. Obtención de una curva de calibración

1- se preparan soluciones de concentración conocida

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.

Veamos un ejemplo

La tabla siguiente muestra una curva de calibración para la medición de calcio

La primer columna muestra la propiedad conocida de los estándares: cantidad de ug/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 ug/ml a través de una función lineal

ug/ml	T%	abs	REGRESIÓN LINEAL
0	100	0	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 ug/ml y la recta de regresión

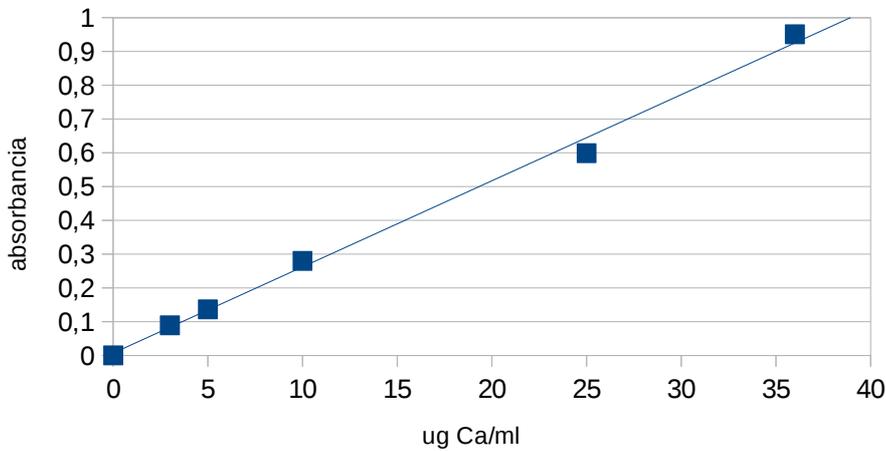


Figura 6.1

De ahora en adelante trabajaremos como variable conocida de los estándares, la concentración expresada en ug Ca/ml y variable medida absorbancia.

6.2.2. 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.

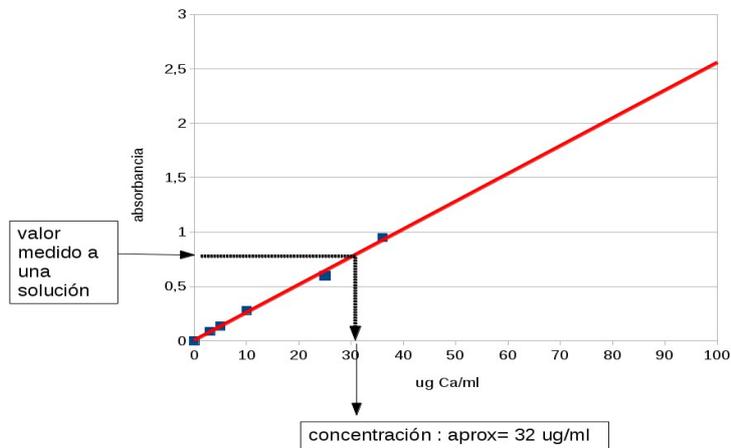


Figura 6.2

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 ug/ml

6.2.3. 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 ug/ml
 y a través de Figura 6.3 vemos el mismo resultado

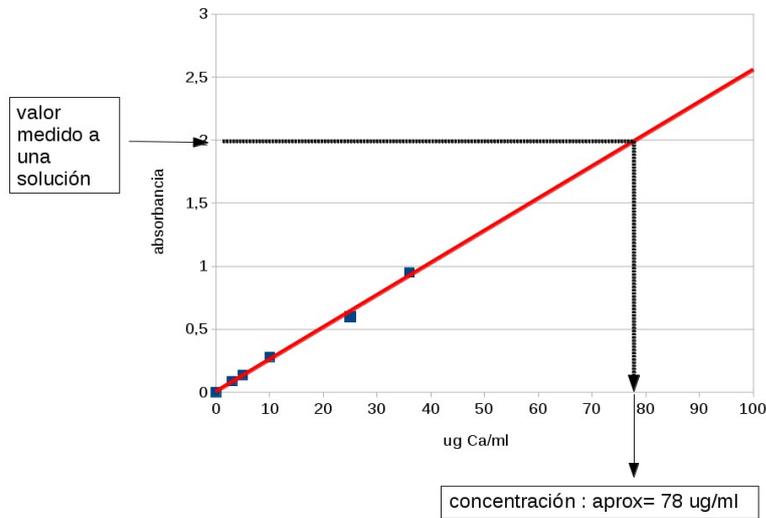


Figura 6.3

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 ug/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.

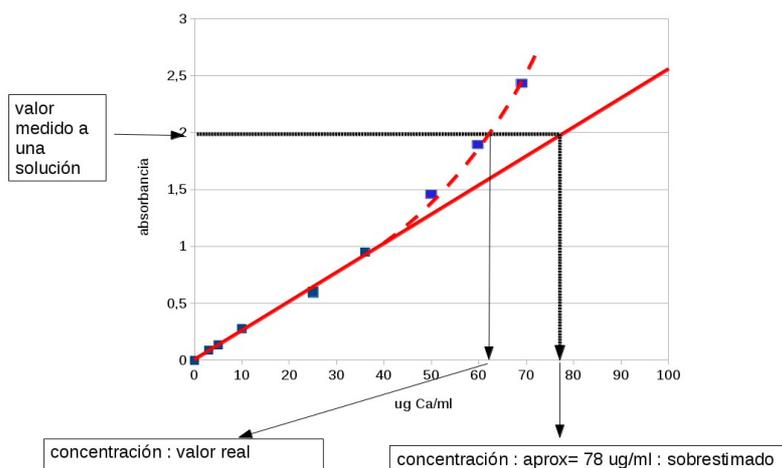


Figura 6.4

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.

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 ug/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.

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 disociables o no iónicos) y electrolitos (disociables o iónicos).

No electrolitos: son solutos que al colocarlos en agua cada molécula queda como tal sin disociarse (Figura 7.1, izquierda).

Electrolitos: se disocian, originando dos o más partículas, llamadas cationes y aniones (Figura 7.1, derecha).

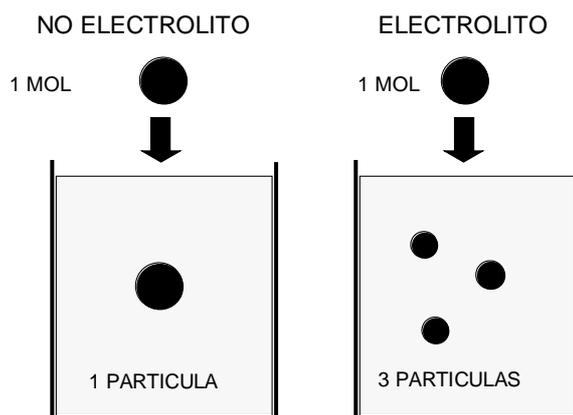


Figura 7.1

Por ejemplo: en la Figura 7.1 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 7.1, 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:

$$60 \text{ g} = 1 \text{ mol}$$

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 1

La concentración es un cociente de dos magnitudes: la cantidad de soluto y el volumen. Si es grande el numerador (muchas 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 diluída**.

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 7.1:

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

Ecuación 7.1.

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 7.2, 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.

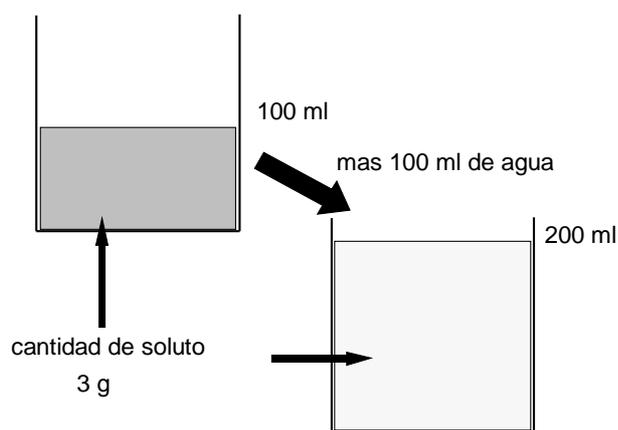


Figura 7.2

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 7.2 y la Ecuación 7.3

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

Ecuación 7.2

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

Ecuación 7.3

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.

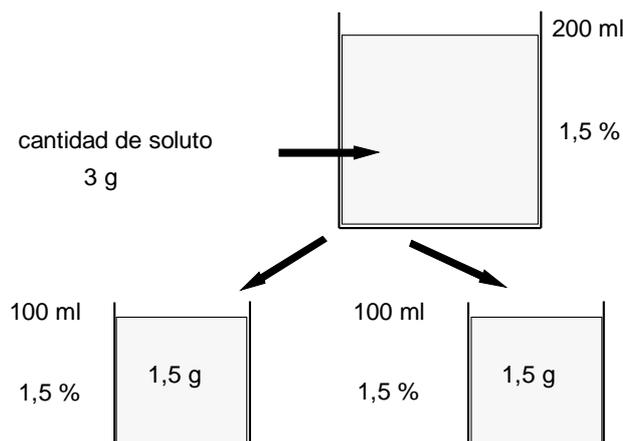


Figura 7.3

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.

7.8.1. 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 acetado 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 preparará 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 cristizador
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. afores 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.

7.9.1. 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 $MgCl_2$, y lo haremos a partir de una droga de 100% de pureza pero que la sustancia es $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$.

peso molecular del $MgCl_2$: 95

peso molecular del $MgCl_2 \cdot 6H_2O$: 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 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$

5 g de $MgCl_2$ estarán contenidos en $x = 10,68$ g de sal hexahidratada

Por lo tanto colocaremos 10,68 g de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 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.

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 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 si. 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:

- asegurarse de haber elegido la pipeta adecuada al volumen y apreciación
- asegurarse de haber elegido el tip adecuado y que esté bien colocado. No debe quedar flojo
- destapar el recipiente de donde se pipeteará
- sin haber sumergido el tip en la solución, oprimir el botón hasta el primer toque
- sumergir el tip en la solución
- observando la posición del tip en la solución, soltar suavemente el botón de manera de absorber la solución, que quedará en dentro del tip
- 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)
- colocar el tip en el recipiente que recibirá el volumen. No tocar la solución existente en el recipiente (Hay situaciones especiales donde si debe hacerse esto). Puede descargarse tocando la pared del recipiente o no, dependiendo de la situación. Asegurarse en cada caso.

- oprimir lentamente el botón hasta el primer tope. Cuando más viscoso el líquido más lento se debe oprimir el botón.
- oprimir rápidamente el botón hasta el segundo tope, eliminando el líquido remanente en la punta del tip.
- 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

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

y la inexactitud con la fórmula

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

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	

Analícemos 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 = ??

fijese que si tuvieramos 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?

Pués 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 8.1

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

Ecuación 8.1.

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.

8.5. Tipos de centrífugas

8.5.1. por el tipo de tubos

- a- Tubos Eppendorf
- b- Tubos de centrífuga
- c- Tubos de 50 ml
- d- microhematocrito

8.5.2. por el ángulo

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

8.5.3. por la refrigeración

- a- refrigerada: permite fijar la temperatura.
- b- sin refrigeración.

8.6. 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. Espero 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 limite del líquido y la boca del tubo.
17. Si el tubo no es suficientemente grande pase a una centrífuga más grande.

8.7. 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

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

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

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 video 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 la 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

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? 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

	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 g/l * vol testigo / 1000 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 = gramos de testigo * abs muestra/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 = gramos de muestra * 1000 ml/vol muestra (3)

combinando todas las ecuaciones anteriores

el cálculo (3) dice

concentración muestra = gramos muestra * 1000ml/vol muestra

según el cálculo (2)

gramos de muestra = gramos de testigo * abs muestra/abs testigo

reemplazando (2) en (3) resulta

concentración muestra = (gramos de testigo * abs muestra/abs testigo) * 1000ml/ vol muestra (4)

según el cálculo (1)

gramos de testigo = 1 g/l * vol testigo / 1000 ml

reemplazando (1) en (4) resulta

concentración muestra = ((1 g/l * vol testigo / 1000 ml) * abs muestra/abs testigo) * 1000ml/ vol muestra (5)

reacomodando la ecuación resulta

concentración muestra = (1 g/l * vol testigo * abs muestra)/(abs testigo * 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/Abs medida

Supongamos que para el testigo medimos Abs testigo = 0,250 y para la muestra 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. INDICE ALFABÉTICO

absorbancia.....	39	intervalo de confianza.....	24
alícuota.....	48	límite de detección.....	43
apreciación.....	53	magnitudes.....	
balanzas.....	56	adimensionales.....	8
centrífuga.....	59	cualitativas.....	8
ángulo fijo.....	59	cuantitativas.....	8
ángulo móvil.....	59	dimensionales.....	8
microhematocrito.....	59	media.....	24
precauciones y uso.....	60	mediana.....	24
refrigerada.....	59	medición.....	
Tubos de 50 ml.....	59	directa.....	11
Tubos de centrífuga.....	59	indirecta.....	11
Tubos Eppendorf.....	59	micropipetas.....	53
coeficiente de variación.....	13	muestra.....	24
Componente.....	44	múltiplos.....	8
concentración.....	46	patrón primario.....	48
densidad.....	46	percentilos.....	24
g %.....	46	peso molecular.....	45
molaridad.....	47	población.....	24
normalidad.....	47	por exceso.....	16
%.....	46	pruebas estadísticas.....	
g/l.....	46	anova.....	33
% P/V.....	46	chisq.test.....	35
%P/P.....	46	lm.....	38
curva de calibración.....	37	LSD.test.....	34
CV%.....	14	lsfit.....	38
Dalton.....	45	p-value.....	36
desvío estándar.....	24	Pearson's Chi-squared.....	35
disolución.....	44	Prueba de Kolmogorov-Smirnov.....	28
errores.....		Prueba de Shapiro Wilk.....	28
absoluto.....	12	regresión lineal.....	37
aleatorios.....	12	t de Student.....	30
coeficiente de variación.....	13	t.test.....	30
equivocaciones.....	21	tablas de contingencia.....	34
por defecto.....	15	Test de Bartlett.....	28
por exceso.....	15	Test de Fligner.....	28
propagación.....	18	test de homogeneidad de variancias.....	27
relativo.....	12	test de normalidad.....	27
sistemáticos.....	12	Var test.....	28
unidades de desvío estándar.....	14	wilcox.test.....	30
escalado de técnica.....		cuartillos.....	24
equipamiento.....	69	rango.....	24
propagación de errores.....	69	Sistema heterogéneo.....	44
Escalar una técnica.....	68	Sistema homogéneo.....	44
estadísticas.....		solución.....	44
desvío estándar.....	24	concentrada.....	46 s.
intervalo de confianza.....	24	diluída.....	46 s.
media.....	24	madre.....	47
mediana.....	24	pasos para preparar.....	48
percentilos.....	24	preparación a partir de sustancia impura.....	50
quartiles.....	24	stock.....	50
rango.....	24	solutos.....	
extrapolación.....	41	disociables.....	44
fuerza centrífuga.....	59	electrolitos.....	44
interpolación.....	40	iónicos.....	44

INDICE ALFABÉTICO

no dissociables.....	44	sustancia impura.....	50
no electrolitos.....	44	transmitancia.....	39
no iónicos.....	44	UDS.....	14
submúltiplos.....	8	unidades de desvío estándar.....	14