



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**“Análisis comparativo de diferentes modalidades de curva de adición en
la determinación de Riboflavina en multivitamínicos infantiles por
Fluorometría.”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
Químico Farmacéutico Biológica

PRESENTA:
Pineda Peñaloza Diana

Directora: Mtra. María Isabel Garduño Pozadas
Asesor: QFB Víctor Hugo Becerra López

Octubre 2013



DEDICATORIAS

Con todo mi cariño y agradecimiento este trabajo va dedicado a todas aquellas personas que hicieron esto posible.

Ha sido un año lleno de esfuerzos y sacrificios, terminada esta etapa de mi vida solo me queda más que agradecer a Dios por permitirme llegar hasta esta instancia del camino en donde me convierto toda una profesional, tantas desveladas sirvieron de algo y aquí está el resultado.

A mis padres, que a pesar de todo estuvieron y creyeron en mí, por haber fomentado el deseo de superación y el anhelo de triunfo en la vida. Mil palabras no serían suficientes para agradecerles todo el apoyo, comprensión y sus consejos en los momentos buenos y malos ya que me sacaron adelante, los admiro y respeto, muchas gracias por lo que han hecho de mí.

A mis hermanas Perla y Yessica, que me han acompañado al paso de los años y que saben el esfuerzo que conlleva el terminar una carrera las quiero mucho.

Mis profesores que a lo largo de la carrera me enseñaron y formaron tanto profesional y personalmente, así como a mis sinodales especialmente a la profesora Isabel Garduño que aparte de cumplir con su labor es una gran persona y amiga con una enorme calidad humana que se preocupa por los demás y siempre tiene palabras alentadoras que decir y que es un ejemplo a seguir, muchas gracias por ser mi directora, el apoyo y las facilidades que me brindó. Al profesor Víctor Becerra que es una excelente persona, por la paciencia que tuvo, por compartir sus conocimientos y el tiempo dedicado a este proyecto.

Todos mis amigos, gracias por tantos momentos que pasamos juntos me llevo gratos recuerdos, aprendí algo de cada uno de ustedes no los olvidaré.

Por último a Mauro mi compañerito de la carrera, quien lloró y rió en cada momento junto a mí y que fue capaz de contenerme en todo momento, de verdad gracias por tu paciencia.

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|------------------------------------------------------------------------------|----|
| RESUMEN | 1 |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 2 |
| 2. MARCO TEÓRICO..... | 3 |
| 2.1 VITAMINAS | 3 |
| 2.2 MULTIVITAMÍNICOS | 3 |
| 2.3 TIPOS DE SUPLEMENTOS ALIMENTICIOS | 4 |
| 2.4 RIBOFLAVINA..... | 5 |
| 2.5 FARMACOCINÉTICA Y FARMACODINAMIA | 6 |
| 2.6 FUNCIONES, USOS Y BENEFICIOS DE LA VITAMINA B ₂ | 6 |
| 2.7 CONTENIDO, DOSIS Y VÍA DE ADMINISTRACIÓN | 7 |
| 2.8 TEORÍA DE LA FLUORESCENCIA | 7 |
| 2.9 RELACIÓN ENTRE INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA Y CONCENTRACIÓN | 9 |
| 2.10 ESPECTROS DE EXCITACIÓN Y EMISIÓN | 9 |
| 2.11 FACTORES QUE AFECTAN A LA FLUORESCENCIA | 10 |
| 2.12 FLUORÓMETRO | 13 |
| 2.13 MÉTODOS LUMINISCENTES EN RELACIÓN CON LOS MÉTODOS ABSORCIOMÉTRICOS..... | 15 |
| 2.14 LEY DE ADITIVIDAD DE LAS ABSORBANCIAS | 16 |
| 2.15 CURVAS DE ADICIÓN | 17 |
| 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 21 |
| 4. OBJETIVO GENERAL..... | 22 |
| 4.1 OBJETIVOS PARTICULARES | 22 |
| 5. HIPÓTESIS | 22 |
| 6. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN..... | 22 |
| 6.1. TIPO DE ESTUDIO..... | 22 |
| 6.2. POBLACIÓN DE ESTUDIO | 22 |
| 6.3. CRITERIOS..... | 23 |
| 6.4. MATERIALES | 23 |
| 7 MÉTODO..... | 24 |
| 8. RESULTADOS | 28 |
| 9. ANÁLISIS DE RESULTADOS..... | 34 |
| 10. CONCLUSIONES | 35 |

| | |
|-----------------------|----|
| 11. COMENTARIOS | 35 |
| 12. ANEXOS | 36 |
| 13. REFERENCIAS..... | 41 |

TÍTULO

Análisis comparativo de diferentes modalidades de curva de adición en la determinación de Riboflavina en multivitamínicos infantiles por Fluorometría.

RESUMEN

Se realizó un estudio Experimental, prospectivo, comparativo y transversal por medio de un análisis fluorométrico a través de las modalidades de curva de adición que en este caso fueron: adición de estándar en cantidades variables (Muestra fija), adición de muestra variable (Estándar fijo) y Volumen constante (donde el estándar y la muestra se modifican a la vez, obteniéndose así un volumen final constante.

Se eligieron tres multivitamínicos infantiles en distintas presentaciones farmacéuticas; tabletas, jarabe y gomitas para determinar riboflavina, ya que está tiene la capacidad de fluorecer permitiendo así representar el efecto matriz deseado.

Los datos recabados fueron examinados por medio de un análisis estadístico para determinar si existe alguna interacción entre la presentación farmacéutica y el método a utilizar. La revisión de dicho estudio permitirá la comparación con algunos otros métodos analíticos así como de las técnicas a usar y cuáles podrían ser las mejoras para su aplicación.

1. INTRODUCCIÓN

A pesar de los enormes avances que ha experimentado México en los últimos años, la desnutrición por un lado y la obesidad infantil por otro, siguen siendo un problema a solucionar en el país, teniendo como manifiesto la necesidad de aumentar los esfuerzos en promover una dieta saludable y equilibrada, ya que informes aseguran que la falta o ausencia de vitaminas y minerales tiene una consecuencia directa en la economía de los países en desarrollo. La mala nutrición se traduce directamente en peor calidad de vida, malos resultados en educación, menos productividad, más enfermedades y mayor mortalidad. Por lo cual, se ha difundido el consumo de suplementos multivitamínicos como complemento a los niños, los cuales proporcionan todos los elementos necesarios para garantizar un óptimo y sano desarrollo. Aunque se ha reiterado que estos productos no reemplazan una alimentación balanceada, su uso es ampliamente divulgado.

Actualmente existen suplementos desarrollados pensando plenamente en los gustos infantiles, las tabletas masticables tienen formas y colores atractivos, cápsulas, grageas o en jarabe, así como gomitas en forma de animalitos con sabores agradables imitando los de alguna golosina e incluso se pueden encontrar en forma de chicle.

En dichos suplementos se encuentran las vitaminas del complejo B que son esenciales para el buen funcionamiento del sistema de defensa, entre ellas se halla la riboflavina la cual oscila en concentraciones de 0.05 mg a 23 mg, por lo que puede ser determinada por medio de métodos poco sensibles.

Por lo general, el análisis de estos compuestos se lleva a cabo por el método de adición estándar en distintas modalidades. Una de ellas se lleva a cabo adicionando estándar en cantidades diferentes y el volumen de muestra permanece constante; mientras que una segunda modalidad es el estándar el que perdura en una cantidad fija y la muestra está en un incremento de volúmenes y por otro lado una tercera modalidad donde, tanto el estándar como la muestra varían a la par, transformándolo a un volumen final que es constante. Por lo que es importante realizar un estudio que nos permite evaluar una diferencia significativa que pueda existir entre las diferentes modalidades de Adición de estándar y las tres distintas formas farmacéuticas de multivitamínicos dirigidos hacia la población infantil.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 VITAMINAS

Las vitaminas son ingredientes vitales llamados también micronutrientes que se encuentran en pequeñas cantidades en todos los alimentos naturales de origen animal y vegetal. Resultan fundamentales ya que ayudan a canalizar los macronutrientes, logrando así una alimentación óptima. ⁽¹⁾

Con unas cuantas excepciones, el cuerpo no puede elaborar sus propias vitaminas, estas deben proporcionarse en la dieta o en suplementos, pero no se debe dejar de subrayar la importancia de la ingestión de alimentos. ⁽²⁾

Todos necesitamos vitaminas, ya que ayudan a liberar energía desde nuestros alimentos y ayudan a construir los músculos, los huesos, la sangre y otros tejidos vitales. Sin una fuente regular de vitaminas, no podemos mantener una buena salud y un crecimiento normal.

Durante los años de crecimiento de la niñez es importante asegurarse de que los niños reciben todas las vitaminas que necesitan cada día, puesto que el cuerpo no almacena todas las vitaminas esenciales durante períodos de tiempo largos, algunos tienen que ser provistos. ⁽³⁾

2.2 MULTIVITAMÍNICOS

Son suplementos que contienen una combinación de vitaminas y minerales, a veces, otros ingredientes. Se los conoce por diferentes nombres, como *vitaminas múltiples*, *polivitamínicos* o simplemente *vitaminas*. Las vitaminas y los minerales incluidos en los suplementos multivitamínicos cumplen funciones únicas en el organismo. ⁽⁴⁾

Tomar suplementos de vitaminas y minerales puede ser deseable, porque, aunque cada vez existe más conciencia, muchas personas aun no consumen comidas adecuadamente balanceadas de manera constante.

El contenido de nutrientes del suelo en que crecen los alimentos afecta la calidad y cantidad de las vitaminas que se encuentran en los alimentos. Niveles insuficientes de nutrientes dan como resultado alimentos con deficiencia de nutrientes (otra razón para los suplementos). Las vitaminas también se pierden en alimentos de la dieta hoy en día debido al procesamiento y almacenamiento de éstos. Además, los nutrientes se pierden mediante la cocción.

Las necesidades nutricionales de un niño en crecimiento son de considerable importancia, especialmente durante sus primeros años.

Los nutrientes esenciales como vitaminas, antioxidantes, minerales y otros importantes co-factores juegan un papel crucial en el crecimiento y el desarrollo de estructuras esqueléticas, la función cerebral, órganos internos y en muchas otras áreas de la salud. ⁽⁵⁾

La mayoría de las personas no se alimentan con una dieta lo suficientemente balanceada para proveerlos con todas las vitaminas que necesitan y esto ha traído un boom en la industria de los suplementos multivitamínicos. Los suplementos multivitamínicos están disponibles en un número variado de presentaciones, incluyendo tabletas, cápsulas de gel e incluso líquidas. Desde luego que los beneficios más obvios de tomar suplementos multivitamínicos es la practicidad. Es mucho más fácil para una persona tomar una dosis de un suplemento multivitamínico que contiene todas las vitaminas necesarias a tener que consumirlas individualmente. Esto es especialmente el caso de los niños que se les dificulta tomar un gran número de suplementos vitamínicos, y en lugar de ello tomar una dosis de un suplemento multivitamínico es más fácil.

Desde luego, un suplemento multivitamínico líquido es la mejor opción para los niños así como también puede beneficiar a cualquiera que tenga dificultad tomando suplementos en forma sólida.

El incremento en la disponibilidad de los suplementos multivitamínicos ha dejado una gran variedad en las marcas y también en el contenido actual de los suplementos multivitamínicos. Los nombres de algunos nutrientes en estos suplementos pueden ser un poco desconcertantes ya que muchas personas simplemente no saben cuáles necesitan.

Para hacer la decisión más simple existen ahora un número de suplementos creados para personas específicas. Por ejemplo, hay suplementos que son diseñados para niños; estos contienen los nutrientes específicos que los niños necesitan para su crecimiento y desarrollo. Así mismo también para los adultos de la tercera edad tienen diferentes requerimientos nutritivos y los suplementos para este grupo de personas son productos populares.⁽⁶⁾

2.3 TIPOS DE SUPLEMENTOS ALIMENTICIOS

Existen muchos tipos de suplementos multivitamínicos en el mercado, entre los más comunes se encuentran los productos básicos diarios que contienen todas o casi todas las vitaminas y minerales, la mayoría en cantidades que se aproximan a las recomendadas.

Los suplementos, sean de vitaminas o minerales, deben tomarse con los alimentos, a menos que se establezca de otra manera en el envase.

Las tabletas también pueden estar recubiertas con jarabe de azúcar o una proteína que llega a causar reacciones en ciertos individuos. La presentación en cápsulas puede ser líquida o en polvo, y es deseable porque es mucho más probable que se disuelva y absorba que en tableta, sobre todo por parte de quienes tienen un sistema digestivo débil. Una ventaja de la cápsula en polvo es que puede abrirse y espolvorearse en alimentos o bebidas para quienes tienen dificultad para tragar o quienes desean una rápida asimilación. Tanto las tabletas como las cápsulas están disponibles en las mismas potencias. Los nutrientes en forma líquida son fáciles de tomar y resultan especialmente adecuados para los niños.⁽⁷⁾

2.4 RIBOFLAVINA

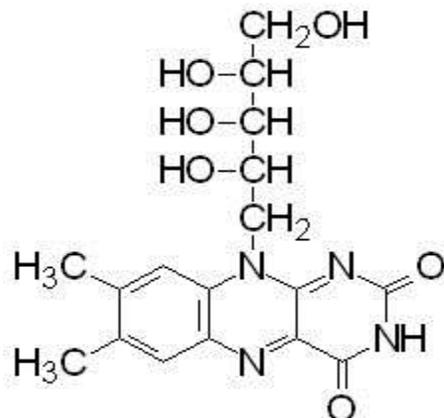


Figura 1. Estructura de la riboflavina ⁽⁸⁾

Sinónimos: isoalloxazine 7.8 dimethyl-10 (de 1' - D-ribityl), vitamina B-compleja, Dolo-Neurotrat, flavin, flavina, lactoflavina, riboflavina, vitamina B₂, vitamina G.

Fórmula molecular: C₁₇H₂₀N₄O₆

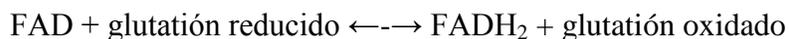
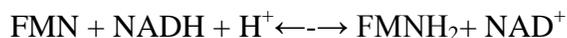
Peso molecular: 376.37

En forma sólida, la riboflavina es de color amarillo anaranjado intenso. En solución acuosa, tienen una fluorescencia amarillo-verdosa muy intensa.

La vitamina B₂ es una vitamina hidrosoluble de color amarillo, constituida por un anillo de isoaloxazina dimetilado al que se une el ribitol, un alcohol derivado de la ribosa. Los tres anillos forman la isoaloxacina y el ribitol es la cadena de 5 carbonos en la parte superior.

Esta vitamina es sensible a la luz solar y a ciertos tratamientos, como la pasteurización, proceso que hace perder el 20% de su contenido. ⁽⁹⁾

Los derivados de la riboflavina que son biológicamente activos son el flavin mononucleótido (FMN) y el flavín adenina dinucleótido (FAD), que son las forma en la que actúa como coenzima. Ambos pueden interconvertirse reversiblemente en sus formas oxidadas o reducidas:



2.5 FARMACOCINÉTICA Y FARMACODINAMIA

Esencial para el metabolismo de carbohidratos, aminoácidos y lípidos, a través de su función como coenzima dinucleótido y mononucleótido de adenina y flavina (FAD y FMN), por lo que es indispensable en tejidos de alto recambio celular y más, durante etapas de crecimiento y desarrollo, como en la infancia y adolescencia.

Se absorbe en forma libre en la parte proximal del intestino delgado, mediado por un transportador. Va unida a la albumina en forma libre o como FMN y no se almacena, por lo que debe administrarse con regularidad.

Se metaboliza en el hígado por glicosilación, puede catalizarse por oxidación, desmetilación e hidroxilación ya que se excreta principalmente en orina. ⁽¹⁰⁾

2.6 FUNCIONES, USOS Y BENEFICIOS DE LA VITAMINA B₂

La vitamina B₂ es un componente integral de las coenzimas que participa en diferentes vías metabólicas, produciendo energía. Al igual que su pariente cercano la vitamina B₁ (tiamina), la riboflavina juega un papel crucial en ciertas reacciones metabólicas, en particular la conversión de carbohidratos en azúcar, que son "quemados" para producir energía. El metabolismo de algunas vitaminas y minerales también requieren de riboflavina.

También es esencial para la respiración de los tejidos y la generación de energía procedente de los hidratos de carbono, ácidos y grasas. Es importante para el crecimiento corporal y la producción de glóbulos rojos y ayuda en la liberación de energía de los carbohidratos.

Otro beneficio de la vitamina B₂ es que ayuda a prevenir y tratar dolores de cabeza o migraña, cataratas, artritis reumatoide, y una serie de trastornos de la piel como el acné (acné rosácea) y dermatitis. ⁽¹⁰⁾

En el tratamiento de la anemia, la adición de vitamina B₂ en los suplementos de hierro ha demostrado que aumenta su eficacia. Vital para mantener un metabolismo adecuado, la riboflavina también ayuda a reforzar el sistema inmunológico mediante el fortalecimiento de las reservas de anticuerpos, la primera línea de defensa del cuerpo contra la infección.

Junto con el hierro, la riboflavina es esencial para la producción de los glóbulos rojos que transportan oxígeno por todo el cuerpo.

En conjunto con otras vitaminas del complejo B, como la vitamina B₆ y la niacina, la riboflavina protege el sistema nervioso. Por tanto, puede tener un papel que desempeñar en el tratamiento de las condiciones del sistema nervioso, como entumecimiento y hormigueo, el Alzheimer, epilepsia, esclerosis múltiple, ansiedad, el estrés y la fatiga. El síndrome del túnel carpiano puede mejorarse de un programa de tratamiento, incluyendo esta vitamina cuando se combina con la vitamina B₆.

La riboflavina es vital para la reproducción normal, el crecimiento, la reparación y el desarrollo de los tejidos del cuerpo incluyendo la piel, cabello, uñas, tejido conectivo y el sistema inmunológico. La vitamina B₂ trabaja con las otras vitaminas del complejo B. ⁽¹¹⁾

2.7 CONTENIDO, DOSIS Y VÍA DE ADMINISTRACIÓN

| PRESENTACIÓN | CONTENIDO | DOSIS | VÍA DE ADMINISTRACIÓN |
|-----------------------------|--------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Centrum Junior Tabletas | cada tableta contiene 1.7 mg de riboflavina. | Niños de 2-12 años: 1 tableta masticable al día. | Oral |
| Kiddi Pharmaton Jarabe | cada 100 mL contienen 23 mg de Fosfato sódico de riboflavina | Niños de 1-5 años: 7.5 ml al día. Escolares y adolescentes: 15 mL al día. | Oral |
| Simi Gomititas Gomititas | cada 2 gomitas contienen: 0.5 mg de riboflavina. | Niños de 1-12 años: 2 gomitas al día. | Oral |

(12)

2.8 TEORÍA DE LA FLUORESCENCIA

La fluorescencia es un proceso de fotoluminiscencia en el que los átomos y moléculas se excitan con la absorción de la radiación electromagnética. Después la especie excitada se relaja al estado fundamental y emite su exceso de energía como fotones. La característica más atractiva de la fluorescencia es su sensibilidad inherente, habitualmente de uno a tres órdenes de magnitud mayor que con la espectroscopia de absorción. De hecho, con este método se ha detectado una sola molécula de especies seleccionadas y en condiciones controladas. Otra ventaja de los métodos de fluorescencia es su amplio intervalo de concentración lineal, significativamente mayor que en la espectroscopia de absorción. Sin embargo, los métodos de fluorescencia tienen menos aplicaciones que los métodos de absorción, dado el número relativamente limitado de sistemas químicos que presentan fluorescencia apreciable. Además, esta última se ve sujeta a muchos más efectos de interferencia ambiental que los métodos de absorción. ⁽¹³⁾

El análisis por fluorescencia es un método analítico relacionado con la espectrofotometría. Muchas moléculas son capaces de emitir esta energía como radiación, con lo cual vuelven al estado fundamental, la radiación emitida se conoce como fluorescencia.

Origen de la fluorescencia

En una molécula, un electrón se comporta como si estuviera girando. El electrón puede girar en dos posibles formas, y esta característica de un electrón se describe asignándole un número cuántico de spin de $+1/2$ o $-1/2$. Dada la complejidad de las moléculas de los productos farmacéuticos, deberán contener muchos electrones.

Los spines de todos los electrones de las capas internas están apareados; es decir, Por cada electrón con un spin de $+1/2$ existe otro electrón con spin $-1/2$. Por lo que se compensan sus componentes de spin. Se calcula el spin resultante, S , de una molécula sumando sus spines de todos los electrones situados fuera de las capas completas.

Si el número total de electrones es par, S será cero o entero, mientras que si el número total de electrones es impar, S será un número impar de semienteros.

La multiplicidad de un estado de energía molecular es igual a $2S+1$, donde se toma el valor absoluto de S . la mayoría de las moléculas orgánicas contienen un número par de electrones; además, las transiciones electrónicas de interés espectroscópico suelen ser del estado fundamental hasta los estados excitados inferiores y, por lo general, solo interviene un par un par de electrones.

Estos pueden ser los electrones de un orbital π o de un orbital n . El valor de S para tales moléculas es, por tanto, 0 (o sea, $+1/2 - 1/2$) o $1(+1/2 + 1/2$ o $-1/2 - 1/2)$, y las multiplicidades correspondientes serán 1 y 3. El estado energético de multiplicidad 1 se conoce como estado singlete, y el estado de multiplicidad 3, como estado triplete. ⁽¹⁴⁾

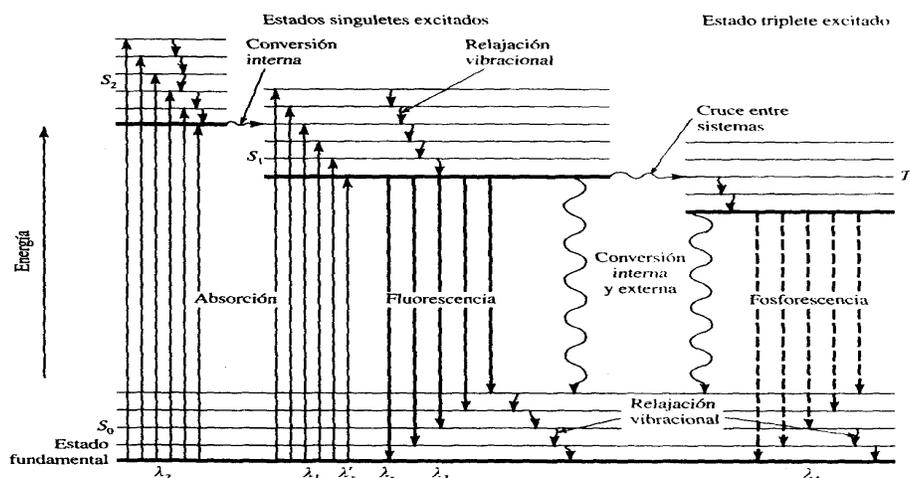


Figura 2. Diagrama de energía para la Fluorescencia ⁽¹⁵⁾

2.9 RELACIÓN ENTRE INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA Y CONCENTRACIÓN

La intensidad de fluorescencia (I_f), es directamente proporcional a la concentración (C), de la sustancia absorbente, pero solo a concentraciones relativamente bajas, lo cual puede demostrarse como sigue: la fracción de radiación transmitida, según la Ley de Beer, es:

$$P/P_0 = 10^{-\epsilon b C}$$

Donde P_0 = potencia del haz incidente

P = potencia del haz transmitido

ϵ = absorptividad

b = espesor de la cubeta

C = concentración

La fracción de radiación absorbida es:

$$1 - P/P_0 = 1 - 10^{-\epsilon b C}$$

Y la cantidad de radiación absorbida es:

$$P_0 - P = P_0 (1 - 10^{-\epsilon b C})$$

La intensidad de la radiación está relacionada con la cantidad de radiación absorbida de la forma siguiente:

$$I_f = k \phi_f (P_0 - P)$$

Donde k es una constante de proporcionalidad, que depende de parámetros instrumentales (eficacia del sistema detector y geometría) y ϕ_f es el rendimiento cuántico de la fluorescencia (relación entre el número de fotones emitidos y los absorbidos por unidad de tiempo).⁽¹⁵⁾

El término $1 - 10^{-\epsilon b C}$ puede desarrollarse como:

$$1 - 10^{-\epsilon b C} = 1 - e^{-2.3 \epsilon b C}$$

2.10 ESPECTROS DE EXCITACIÓN Y EMISIÓN

Se selecciona una longitud de onda de excitación (λ_{ex}) mediante un filtro, y se observa la luminiscencia a través de un segundo filtro, colocado de ordinario a 90° respecto a la luz incidente, si se mantiene la longitud de onda de excitación fijación, y se registra la radiación emitida, se obtiene un espectro de emisión. Un espectro de emisión es la representación de la intensidad de emisión frente a la longitud de onda.

Un espectro de excitación se obtiene seleccionando la longitud de onda de excitación, y midiendo la luz emitida a una longitud de onda determinada (λ_{em}). Un espectro de excitación es la representación de la intensidad de emisión frente a la longitud de onda de excitación. Un espectro de excitación se parece muchísimo a un espectro de absorción, porque cuanto mayor es la absorbancia a la longitud de onda de excitación, más moléculas pasan al estado excitado, y mayor es la emisión que se observa.

En la espectroscopia de emisión se mide la intensidad de la radiación emitida, y no la fracción de irradiancia que llega al detector. Puesto que la respuesta del detector varía con la longitud de onda, el espectro de emisión registrado no es un verdadero perfil de la intensidad de emisión frente a la longitud de onda de emisión. En medidas analíticas que utilizan una única longitud de onda de emisión, este efecto no tiene importancia. Si se precisa el verdadero perfil, es necesario calibrar el detector teniendo en cuenta la influencia que tiene en la respuesta la longitud de onda. ⁽¹⁶⁾

2.11 FACTORES QUE AFECTAN A LA FLUORESCENCIA

La emisión fluorescente observada en una determinada especie está condicionada por la propia estructura molecular de la sustancia y por otros factores dependientes del medio en que se trabaje tales como rigidez, influencia del disolvente, pH y temperatura.

Influencia de la estructura molecular

El primer requisito para que exista fluorescencia es que la molécula posea una estructura capaz de absorber radiación ultravioleta o visible, esto es, puedan tener lugar transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ y $n \rightarrow \pi^*$.

Sin embargo, experimentalmente se ha observado que el comportamiento fluorescente se presenta con más frecuencia en compuestos en los que la transición es $\pi \rightarrow \pi^*$ y no en aquellos en los que es $n \rightarrow \pi^*$. Esta condición elimina virtualmente los compuestos orgánicos saturados, mientras que los compuestos conteniendo dobles enlaces conjugados, especialmente aquellos con un alto grado de estabilización por resonancia serán muy prometedores.

Así, suelen presentar fluorescencia muchos hidrocarburos aromáticos, particularmente si tienen gran rigidez y estructuras multi-cíclicas.

Las características de la emisión fluorescente (longitud de onda de máxima emisión y su intensidad) de una molécula orgánica aromática suele estar muy influida por los sustituyentes en el anillo bencénico. Así, por ejemplo, cuando los sustituyentes son halógenos, se observa una disminución de la fluorescencia al aumentar el peso atómico del halógeno, lo cual parece debido al llamado efecto del átomo pesado. Este efecto aumenta la probabilidad de que se produzca el cruzamiento entre sistemas, con el consiguiente aumento de la fosforescencia. Por otra parte, la presencia de un ácido carboxílico en un anillo aromático hace que tengan lugar transiciones $n \rightarrow \pi^*$ con menos energía que $\pi \rightarrow \pi^*$, lo cual generalmente inhibe la fluorescencia.

Rigidez

Experimentalmente se observa que la fluorescencia está particularmente favorecida en moléculas que poseen estructuras rígidas, es decir, este efecto se debe a que las estructuras más rígidas limitan las vibraciones, lo cual minimiza la degradación por colisiones y el cruzamiento de sistemas.

El aumento de fluorescencia de ciertos agentes orgánicos cuando forman quelatos con iones metálicos parece también producir un incremento en la rigidez del sistema.

Otros factores de tipo estructural que influyen son:

La presencia de grupos donadores de electrones, como —NH_2 y —OH favorece la fluorescencia, puesto que aumentan la probabilidad de transición entre el estado singulete de menor energía vibracional y el estado fundamental.

La introducción de un átomo de número atómico elevado en un sistema de electrones π suele aumentar la fosforescencia, en disminución de la fluorescencia.

Los grupos aceptores de electrones, como —COOH , —NO_2 , —N=N— y X disminuyen y en ocasiones inhiben la fluorescencia.

Influencia del disolvente

En muchas ocasiones se observa que al aumentar la polaridad del disolvente se produce un desplazamiento en el espectro de fluorescencia hacia mayores longitudes de onda. Este hecho puede explicarse de la forma siguiente:

Las transiciones electrónicas entre diferentes niveles energéticos ocurren muy rápidamente, de forma que cuando una molécula en estado fundamental absorbe un fotón, pasa a un estado excitado meta-estable (estado excitado Franck-Condon), en el cual la geometría molecular y la configuración del disolvente son todavía las características del estado fundamental.

La reorientación del disolvente tiene lugar aproximadamente 10 a 12 segundos después de la excitación, originando un estado excitado de "equilibrio", en el cual la configuración del disolvente es óptima para la geometría y configuración electrónica de la molécula. La emisión ocurre desde ese estado excitado de "equilibrio", hasta un estado fundamental meta-estable, teniendo lugar posteriormente la relajación del disolvente, para conducir hasta el verdadero estado fundamental.

En la mayoría de las moléculas polares el estado excitado es más polar que el estado fundamental; por ello, al aumentar la polaridad del disolvente se tiende hacia una estabilización del estado excitado, en mayor grado que lo hace el estado fundamental (figura 3 .A, B y C). En consecuencia, al aumentar la polaridad del disolvente tiene lugar un desplazamiento hacia mayores longitudes de onda (menor energía).

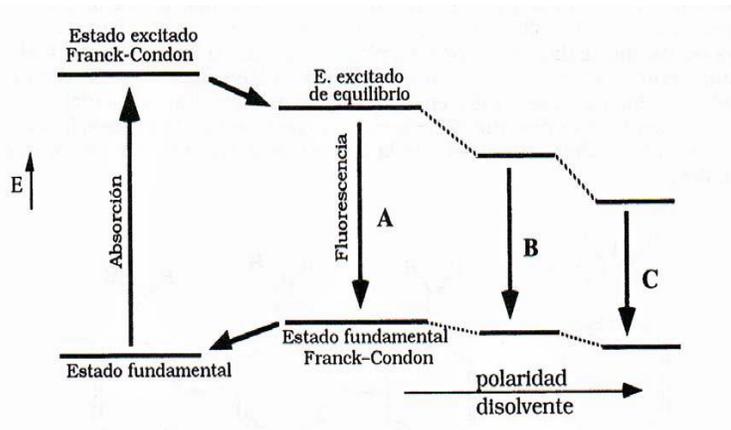


Figura 3. Influencia de la polaridad del disolvente sobre la emisión de fluorescencia.

Influencia del pH

El espectro de fluorescencia de muchos compuestos aromáticos conteniendo grupos funcionales ácidos o básicos es sensible al pH. Los cambios en la emisión de los compuestos de este tipo provienen del número de especies resonantes diferentes que están asociadas con las formas ácidas o básicas de las moléculas.

Estas formas resonantes adicionales proporcionan una mayor estabilidad al primer estado excitado, y la consecuencia es una emisión fluorescente a mayor longitud de onda.

La fluorescencia de ciertos compuestos en función del pH ha sido utilizada para la detección de puntos finales en volumetrías ácido-base. Sin embargo, es realmente curioso el hecho de que el cambio de comportamiento espectral se produzca a un pH diferente del que puede predecirse de su constante de disociación. La explicación de este hecho reside en que la molécula excitada (el primer estado singulete excitado) posee un carácter ácido diferente del estado fundamental.

Influencia de la temperatura

La temperatura es una variable importante en Fluorometría analítica, observándose una disminución de la fluorescencia al aumentar aquella. El cambio en la fluorescencia es normalmente del 1 % por °C. La disminución de la emisión fluorescente con la temperatura se debe a que el aumento de la frecuencia de choques a temperatura elevada incrementa la probabilidad de desactivación en forma de energía no radiante. Por otra parte, el aumento de temperatura hace disminuir la viscosidad del disolvente, lo cual, también aumenta la probabilidad de desactivación mediante colisiones. ⁽¹⁷⁾

2.12 FLUORÓMETRO

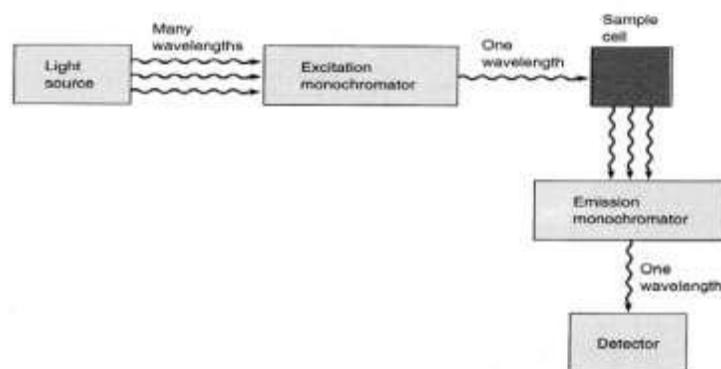


Figura 4. Componentes de un Fluorómetro ⁽¹⁸⁾

Los componentes de un fluorómetro o espectrofluorómetro son muy similares a los de un espectrómetro Visible- UV.

El diagrama de doble haz es sumamente útil para compensar por las fluctuaciones en la intensidad de la fuente de excitación. El haz de referencia pasa a través de un atenuador de radiación y se ajusta éste hasta hacer que la intensidad de este haz sea igual a la intensidad del haz de fluorescencia que pasa por el recipiente de muestra cuando se encuentra en éste un blanco.

El haz de radiación dirigido al recipiente de muestra pasa por un filtro (fluorómetro) o por un monocromador (espectrofluorómetro), donde se selecciona la longitud de onda de la radiación que va a incidir en la muestra. La radiación fluorescente emitida por la muestra es en todas direcciones pero es más convenientemente medida a un ángulo de 90° con respecto al haz incidente ya que la radiación dispersada por la solución y por la celda misma puede interferir con la radiación emitida por la especie fluorescente.

Tanto el haz de referencia como el haz de muestra son dirigidos a un sistema de foto tubos y posteriormente a un amplificador diferencial que se encuentra conectado a un sistema de lectura, tal como una escala digital o de aguja. ⁽¹⁹⁾

Fuentes de radiación: la lámpara de tungsteno ordinaria no da suficiente intensidad para ser utilizada en fluorescencia. Son comunes las lámparas de Xenón y de Mercurio.

La lámpara de xenón es más versátil que la lámpara de mercurio, ya que la lámpara de xenón produce una intensa radiación por el paso de corriente en una atmósfera de xenón; el espectro de este tipo de lámpara es continuo de 250 a 600 nm. Con un pico de máxima intensidad a 470 nm.

Filtros y monocromadores: se utilizan frecuentemente filtros de absorción y filtros de interferencia, la mayor parte de los fluorómetros usan monocromadores de red. Las redes tienen la ventaja de dar dispersiones lineales, una mejor dispersión en la región visible y tienen menor pérdida de luz en comparación con los prismas.

Los prismas de cuarzo dan mejor dispersión en la región ultravioleta y no poseen espectros de segundo y tercer orden. ⁽¹⁹⁾

Los filtros se utilizan para realizar dos funciones:

El primero es permitir que solamente una luz de una longitud de onda específica pueda pasar a la celda de muestra y excitar una molécula específica. Los filtros de excitación son siempre de Banda Corta (NB). Los filtros de emisión son generalmente agudos de corte (SC) que permiten que sólo la luz emitida por encima de la longitud de onda específica pueda pasar en el tubo fotomultiplicador. Puesto que el tubo fotomultiplicador es sensible a una amplia gama de longitudes de onda, un filtro permite al usuario elegir el intervalo de longitud de onda detectada por el tubo fotomultiplicador, para reducir el ruido de fondo y así aumentar la sensibilidad.

Filtro de paso de banda estrecha (NB)

Este filtro se utiliza cuando las longitudes de onda de excitación y emisión están muy juntas, los anchos de banda típicos están en el rango de 8 a 10 nm. Se requieren técnicas de fabricación de precisión y cuestan más que los otros tipos de filtros. El filtro consiste en un interferómetro miniatura en conjunción con los vidrios de bloqueo. Algunos filtros de paso de banda estrecha se componen de unas gafas especiales ópticas, o una combinación de vidrio o materiales de gelatina y tienen anchos de banda de 50 a 100 nm. Estos filtros son particularmente útiles cuando se requiere una alta sensibilidad y una resolución más baja no es un factor para distinguir entre los diferentes restos fluorescentes presentes en la solución.

Filtros Agudos de Corte SC

En este tipo de filtro pasa toda la luz de una longitud de onda a un valor dado y bloquea toda la luz de longitudes de onda más cortas. La transición de cero a la transmitancia total (aproximadamente 80-90 por ciento), por lo general tiene lugar en una región de alrededor de 40 nm. ⁽²⁰⁾

La longitud de onda característica de un filtro de Agudo de Corte SC se define como la longitud de onda a la que el filtro tiene una transmitancia de 37 por ciento. Con la mayoría de los fabricantes de filtros, no se trata de una tolerancia de 10 nm en la ubicación de las más largas longitudes de onda de la luz emitida que se puede medir. ⁽²⁰⁾

Compatibilidad de los Filtros

Dos filtros son compatibles y pueden ser utilizados como filtros de excitación y de emisión si las longitudes de onda de la luz que transmiten no se solapan significativamente.

Si una superposición de luz presente, dispersada a partir de una muestra incluso ligeramente turbia o de un defecto óptico en la cubeta, llega al tubo fotomultiplicador y es registrado como fluorescencia. ⁽²⁰⁾

Cabe mencionar que es muy importante la elección de la anchura de la rendija. Es necesario llegar a una situación de compromiso entre resolución y sensibilidad. Las anchuras de rendija grandes dan mucha sensibilidad pero poca resolución y aumentan la cantidad de luz parasita y dispersada. Normalmente lo mejor es ajustar la rendija del monocromador de excitación separadamente de la del monocromador de emisión.

Al registrar el espectro de excitación es conveniente mantener la rendija de excitación poco abierta (para que haya buena resolución) e ir ensanchando la rendija de emisión (para que la sensibilidad sea buena).

Detectores: debido a que la señal de fluorescencia es de baja intensidad se requiere de un potente sistema de amplificación. Por esto son preferidos los tubos fotomultiplicadores, aunque también se usan comúnmente los fototubos.

Es imprescindible usar detectores muy sensibles; muchos instrumentos utilizan tubos fotomultiplicadores de alta ganancia, tales como los RCA 1P28 y 2P21. El margen de respuesta espectral de estos tubos es entre 210 y 670 y entre 310 y 670 nm, respectivamente. Ambos tienen una ganancia alta y una corriente oscura baja, siendo el 1P21 ligeramente mejor en los dos aspectos. ⁽¹⁹⁾

2.13 MÉTODOS LUMINISCENTES EN RELACIÓN CON LOS MÉTODOS ABSORCIOMÉTRICOS

Sensibilidad

Los métodos fluorimétricos son más sensibles que los absorciométricos. Esto se debe, sobre todo, a que en estos métodos el detector debe distinguir una pequeña diferencia entre dos señales grandes (P_0 y P), cada una de las cuales lleva su correspondiente ruido de fondo, mientras que en Fluorimetría, el detector solo necesita poner de manifiesto una pequeña señal positiva frente a un ruido de fondo pequeño.

De hecho, la sensibilidad en Fluorimetría puede mejorarse aumentando P_0 , mientras que en absorciometría, al aumentar P_0 aumenta también P , no afectando a la absorbancia. En general, los métodos fluorimétricos suelen ser entre 10 y 100 veces más sensibles que los espectrofotométricos.

La selectividad de los métodos luminiscentes suele ser mayor que la de los absorciométricos. De hecho, hay muchas especies capaces de absorber radiación, pero el número de ellas que pueden re-emitir es mucho menor.

Además, en los métodos de fluorescencia, tanto la longitud de onda de excitación, como la de emisión, pueden seleccionarse para minimizar interferencias, mientras que en espectrofotometría solo la longitud de onda de absorción es seleccionable. Por tanto, si dos materiales fluorescentes difieren en el espectro de excitación o de emisión, es factible analizar uno selectivamente en presencia del otro. ^{(17) (19)}

2.14 LEY DE ADITIVIDAD DE LAS ABSORBANCIAS

Si varias especies químicas absorben radiación a una misma longitud de onda y no hay interacción química entre dichas especies, la absorbancia total de la solución es debida a la suma de las absorbancias individuales, lo que se conoce como Ley de Aditividad de las absorbancias.

Un sistema en donde dos componentes se absorben dentro de un mismo intervalo, los espectros de absorción de las mismas, pueden superponerse en distintos grados.

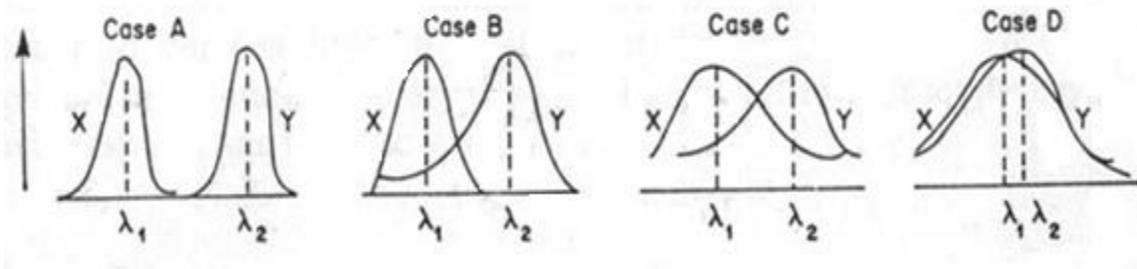


Figura 5. Análisis de un sistema binario de absorción. ⁽²¹⁾

Caso A: Las curvas no se superponen y los dos componentes (X y Y) se determinan directamente con la longitud de onda.

Caso B: Superposición parcial de los espectros de absorción. Mientras que las mediciones en λ_2 dan directamente Y, cualquier intento de medir la absorbancia de X debe incluir alguna contribución debida a la cola de absorción de Y.

Caso C: Caso general de la superposición de las curvas de absorbancia, pero con el máximo de absorción suficientemente desplazado para permitir su análisis de forma exacta.

Caso D: Materiales con curvas de absorción similares o cercanas y que no es susceptible de análisis.

Para una longitud de onda constante y paso óptico fijo, una relación lineal entre absorbancia y concentración con pendiente $\epsilon \lambda b$ e intercepto cero.

Sin embargo esta ley sólo se cumple estrictamente para soluciones diluidas, generalmente concentraciones menores o iguales que $10^{-2}M$. La suposición de que ϵ es independiente de la concentración de una sustancia para una longitud de onda dada, sólo se cumple en soluciones diluidas ya que ϵ no es constante para soluciones concentradas sino que depende del índice de refracción de la solución.

Para n componentes absorbentes en una solución, la absorbancia total de la mezcla, para una longitud de onda dada, según el principio de aditividad de las absorbancias, será:

$$A_{\lambda} = \sum A_i = A_1 + A_2 + \dots + A_n = (\epsilon_1)\lambda bC_1 + (\epsilon_2)\lambda bC_2 + \dots + (\epsilon_n)\lambda bC$$

2.15 CURVAS DE ADICIÓN

Una curva de calibrado es la representación de la respuesta de un análisis químico a cantidades conocidas (disoluciones patrón o estándar) de analito. Cuando hay una respuesta lineal, la señal analítica corregida (=señal de la muestra-señal del blanco) es proporcional a la cantidad de analito. Se preparan disoluciones de blanco (o simplemente blancos) a partir de los mismos reactivos y usados para preparar los estándares y las muestras desconocidas, pero en los blancos consistentemente no se añade analito. El blanco representa la respuesta del procedimiento a las impurezas o especies interferentes, que hay en los reactivos. El valor del blanco se resta de los valores medidos de los patrones antes de construir la curva de calibrado. El valor del blanco se sustrae también de la respuesta de una muestra problema antes de calcular la cantidad de analito que hay en ella.

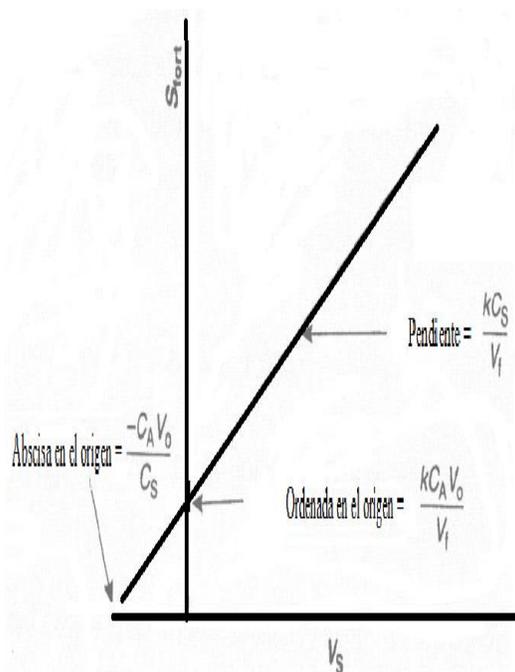


Figura 6. Ejemplo de una curva de calibración. ⁽²²⁾

Adición de patrón (o estándar)

El método de adición de patrón consiste en añadir cantidades conocidas de analito al problema, cuyo contenido en analito se requiere determinar. A partir del aumento de señal se deduce cuánto analito había en la muestra problema. Este método requiere una respuesta lineal frente al analito.

La adición de patrón es especialmente apropiada cuando la composición de la muestra es desconocida o compleja y afecta a la señal analítica. La matriz es todo lo que hay en el problema, que no sea el analito. Se define como el efecto de matriz como el cambio que experimenta una señal analítica por todo lo que hay en la muestra excepto el analito. ⁽¹⁶⁾

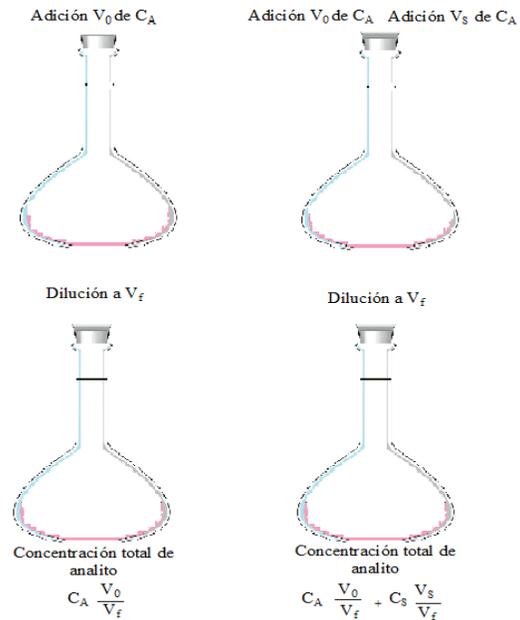


Figura 7. Método de adición de estándar donde las alícuotas de la muestra son diluidas en un mismo volumen final. ⁽²²⁾

En la técnica de adición de patrón, este se adiciona en volúmenes variables según la concentración requerida; y la muestra es adicionada en un volumen fijo, para la cual la ecuación utilizada es:

$$C_s = \frac{V_x C_x}{x}$$

Donde x será la X testada que se obtiene de la regresión lineal cuando $Y=0$, V_x es el volumen de muestra fija adicionada y C_x será la concentración de la muestra de donde se parte para la preparación de la curva. ⁽²²⁾

Un patrón interno es una cantidad conocida de un componente diferente del analito, que se añade al problema. La señal del analito se compara con la del patrón interno para hallar el analito presente en el problema. Los patrones internos son especialmente útiles cuando la cantidad de muestra analizada no es reproducible, cuando la respuesta absoluta de experiencia a experiencia varía por razones que son difíciles de controlar, o cuando ocurren pérdidas incontroladas de muestra durante su preparación.

El factor de respuesta relaciona las respuestas relativas del detector al analito y al patrón con sus concentraciones relativas. El factor de respuesta de la ecuación es la respuesta relativa del analito y el estándar. ^{(16) y (22)}

OTRAS MODALIDADES DE LA CURVA DE ADICIÓN

- Variación continua de muestra a volumen total constante y un volumen de estándar fijo.

Esta técnica se desarrolla de la misma manera que para la curva de adición de estándar pero en los roles se intercambian, pues es el estándar el que permanece fijo y la muestra la que es adicionada de manera variable.

Se elabora una solución de estándar y de muestra con concentraciones similares y posteriormente se toman las alícuotas correspondientes para la muestra variable y el mismo volumen de alícuota para el estándar. En todas las soluciones, los matraces volumétricos utilizados para la curva son todos de la misma capacidad y de esta manera la concentración de cada uno se incrementara de manera constante, obteniendo así, la curva de adición conveniente.

Para este método se utiliza la siguiente fórmula:

$$C_x = \frac{V_s C_s}{x}$$

Donde x será la X testada que se obtiene de la regresión lineal cuando $Y=0$, V_s es el volumen de estándar fijo adicionado y C_s será la concentración de estándar.

- Variación continua de muestra y estándar a un volumen final constante

En esta técnica, se prepara una solución estándar y una solución de muestra de diferentes concentraciones preferentemente en relación 1:2 y posteriormente la curva de adición, en el cual, la combinación de volúmenes de estándar y de muestra, se mantiene constante es decir la suma de los volúmenes de la muestra y el estándar siempre dará el mismo volumen y darán un volumen final constante.

La solución puede ir desde la concentración pura de estándar hasta concentración pura de muestra.

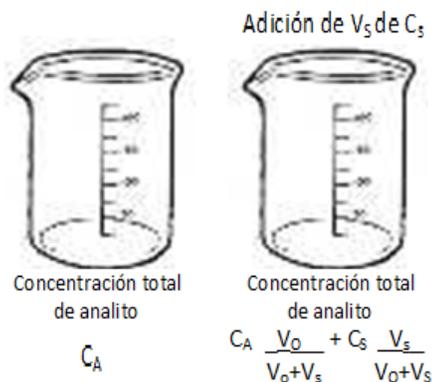


Figura 8. Método de volumen constante. ⁽²²⁾

En este método la ecuación empleada es:

$$C_x = C_s \left(\frac{V_f}{x} + 1 \right)$$

Donde x será la X testada que se obtiene de la regresión lineal cuando $Y=0$, V_f es el volumen de estándar fijo adicionado y C_s será la concentración de estándar. ⁽²³⁾

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el ramo de los productos multivitamínicos infantiles, el mercado mexicano ha llegado a posicionarse en los últimos años como el tercero más importante para farmacéuticas transnacionales y se espera que la base local de consumidores siga creciendo con el auge de las campañas contra la obesidad y la mala nutrición, ya que la población ha tomado una mayor conciencia sobre la importancia de una buena alimentación.⁽²⁴⁾

Entre los componentes principales de estos, se encuentran aquellos que forman parte del Complejo B, uno de ellos es la riboflavina (vitamina B₂) que es un componente integral que participa en diferentes vías metabólicas, produciendo energía ya que es vital para diversos procesos metabólicos. Sin embargo, aunque se ha reiterado que estos productos no remplazan a una alimentación balanceada, su uso es ampliamente difundido en varios segmentos de población mexicana, para quienes existen diversas presentaciones en cuanto a composición y precio.

Tomando en cuenta tanto las propiedades físicas y químicas, podemos aprovechar la capacidad que tiene de fluorecer ya que origina una intensa absorción que es favorecida por la rigidez de su estructura heterocíclica y altamente conjugada. Sin embargo, debido a que se encuentra en bajas concentraciones y a la complejidad de la matriz de estos multivitamínicos, se ha obligado a optar por técnicas de análisis basadas en adiciones estándar, ya que es una técnica aprobada por la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, “Que establece: las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas”: señala en el numeral 7.3.1.2 que “el método de adición de estándar se aplicará siempre y cuando en la monografía de un fármaco no se detalle el método analítico.”⁽²⁵⁾

No obstante, dicha modalidad de análisis se puede realizar de diversas formas, razón por la cual se desea evaluar tres distintas modalidades de análisis que permitan establecer la adecuabilidad del análisis de riboflavina de las diferentes presentaciones de multivitamínicos infantiles que permitan evaluar la calidad en cuanto a su contenido.

4. OBJETIVO GENERAL

Determinar riboflavina en tres diferentes presentaciones de multivitamínicos infantiles por medio de un análisis fluorométrico a través de distintas modalidades de curva de adición de estándar y permitiendo realizar un análisis comparativo.

4.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar las ventajas y desventajas que existen entre las distintas modalidades de curva de adición de estándar.
- Conocer las interacciones de cada determinación y de la técnica utilizada.
- Analizar el contenido de riboflavina de las tres presentaciones de multivitamínicos infantiles por medio de un análisis de varianza.
- Realizar la determinación fluorométrica controlando las posibles variables que pudieran afectar la obtención de riboflavina.

5. HIPÓTESIS

Considerando las características de la riboflavina y la naturaleza de distintas matrices de los multivitamínicos, así como de las técnicas de adición, se tendrán elementos que permitan evaluar las interacciones que sufren las variables en la determinación de riboflavina por medio de fluorometría.

6. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

6.1. TIPO DE ESTUDIO

Estudio experimental, prospectivo, comparativo y transversal

6.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO

- Tabletas Centrum Junior, frasco con 60 tabletas y fecha de caducidad
- Jarabe Kiddi Pharmaton, frasco con 200 ml y fecha de caducidad.
- Gomas Simi gomitas, frasco con 60 gomitas y fecha de caducidad.

6.3. CRITERIOS

| INCLUSIÓN | EXCLUSIÓN | ELIMINACIÓN |
|--------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Se incluyeron tabletas lisas y enteras, jarabe no caduco y gomitas no caducas. | Se rechazaron tabletas moteadas o rotas, jarabe que se vea en dos fases, gomitas caducas. | No se tomaron en cuenta tabletas húmedas, jarabe con cristales o con alguna otra partícula extraña y gomitas deformes o manchadas. |

6.4. MATERIALES

- Matraz volumétrico Pyrex de 250 mL
- Matraz volumétrico Pyrex de 100 mL
- Matraz volumétrico Pyrex de 50 mL
- Matraz volumétrico Pyrex de 25 mL
- Vaso de precipitados Kimax de 100 mL
- Vaso de precipitados Kimax de 250 mL
- Pipeta volumétrica Pyrex de 5 mL
- Pipeta volumétrica Pyrex de 10 mL
- Bureta con llave de teflón de 50 mL
- Bureta con llave de teflón de 25 mL
- Parrilla de agitación y calentamiento
- Soporte Universal
- Pinzas de doble presión
- Anillo metálico
- Embudo de talle corto
- Espátula
- Papel filtro
- Celdas de vidrio
- Rejilla de atenuación al 10 %

Equipo

- TURNER Model 450 Fluorometer
- Filtro de excitación NB440
- Filtro de emisión SC 535
- Balanza Analítica. Marca: Adveturer Ohaus

Reactivos

- Ácido acético 0.06 N
- Estándar de riboflavina

Software

- Statgraphics para Windows. Versión 5.0

7 MÉTODO

PREPARACIÓN DE LAS DILUCIONES

Solución estándar a 10 ppm

Para la preparación del estándar pesar en la balanza analítica 30 miligramos de estándar de riboflavina registrando su peso, llevándolo a un matraz volumétrico de 100 mL aforando con una solución de CH_3COOH (Ácido Acético) 0.06 N, se toma una alícuota de 17 mL y se transfiere a un matraz volumétrico de 50 mL aforando con CH_3COOH 0.06 N, nuevamente se toma una alícuota de 10 mL y se lleva a un matraz de 100 mL aforando de igual manera con una solución CH_3COOH 0.06 N; obteniendo una solución muestra de 10 ppm.

Solución muestra a 10 ppm

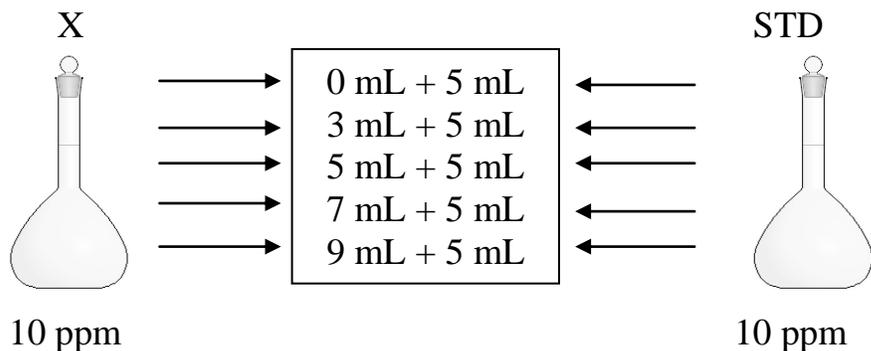
Se toman 15 tabletas del multivitamínicos en una balanza analítica registrando su peso y calculando su valor promedio por tableta, suponiendo que esta tiene 1.7 mg de Riboflavina y pesando el equivalente a 7.5 mg de la misma, para transferirla a un matraz volumétrico de 250 mL y aforar con una solución de CH_3COOH 0.06 N, se toma una alícuota de 17 mL y se lleva a un matraz volumétrico de 50 mL aforando de igual manera con una solución de CH_3COOH 0.06 N; obteniendo una solución muestra de 10 ppm.

El mismo procedimiento se lleva a cabo tanto para el jarabe y las gomitas, tomando una muestra que es equivalente a 7.5 mg de Riboflavina.

Método 2

- Adición de Estándar Fijo (Ef)

En esta técnica se lleva a cabo el mismo procedimiento tanto de la preparación del estándar como de la muestra, modificando el volumen de adición de la muestra; tal como se representa en el siguiente esquema:



Esquema 2. Volumen de alícuotas de muestra y de solución de estándar a adicionar para la técnica estándar fijo.

(Elaboración Propia)

Una vez preparada la curva se procede a leer en el Fluorómetro en sensibilidad 10 empleando un filtro de emisión SC 535 y un filtro de excitación NB 440 con una rejilla de atenuación del 10 %.

Los datos obtenidos se procesan a regresión lineal, buscando x testada igual a cero, sustituyendo en la fórmula:

$$C_x = \frac{V_s C_s}{x}$$

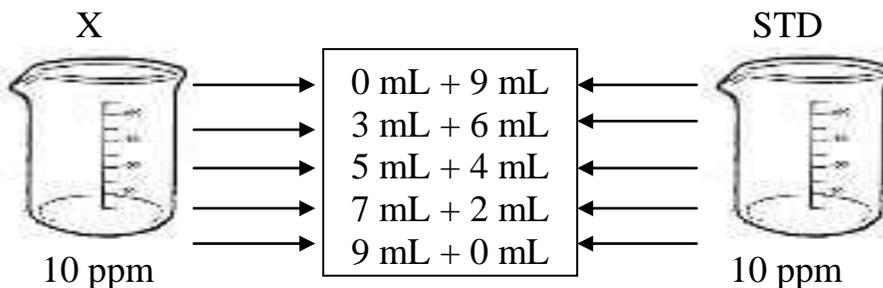
Para así obtener el contenido por tableta de riboflavina, realizando este método por triplicado.

Se lleva a cabo el mismo procedimiento para el jarabe y las gomitas, tomando el equivalente a 7.5 mg de Riboflavina realizando la técnica por triplicado.

Método 3

- Volúmenes variables de estándar y de muestra (Vcte)

Una vez que se tienen las soluciones se procede a adicionar a alícuotas a vasos de precipitados de 50 mL como se ve en el esquema:



Esquema 3. Volumen de alícuotas de muestra y de solución Estándar a adicionar para la técnica volúmenes variables.

Una vez preparada la curva se procede a leer en el Fluorómetro en sensibilidad 10 empleando un filtro de emisión SC 535 y un filtro de excitación NB 440 con una rejilla de atenuación del 10 %.

Los datos obtenidos se procesan a regresión lineal, buscando x testada igual a cero ($y=0$), sustituyendo en la fórmula:

$$C_x = C_s \left(\frac{V_f}{x} + 1 \right)$$

Para así obtener el contenido por tableta de riboflavina, realizando este método por triplicado.

Se lleva a cabo el mismo procedimiento para el jarabe y las gomitas, tomando el equivalente a 7.5 mg de Riboflavina realizando la técnica por triplicado.

8. RESULTADOS

Tabla 1. Determinación de porcentaje de contenido de riboflavina en tabletas Centrum con respecto a la etiqueta (1.7 mg).

| Método | Muestra Fija | Estándar Fijo | Volúmenes Constantes |
|-----------|--------------|---------------|----------------------|
| Muestra 1 | 82.57% | 36.98% | 78.82% |
| Muestra 2 | 85.12% | 32.02 % | 77.64% |
| Muestra 3 | 89.08% | 33.56 % | 62.35% |
| CV | 3.83 | 7.42 | 12.59 |

Tabla 2. Determinación de porcentaje de contenido de riboflavina en jarabe Kiddi Pharmaton con respecto a la etiqueta (23 mg).

| Método | Muestra Fija | Estándar Fijo | Volúmenes Constantes |
|-----------|--------------|---------------|----------------------|
| Muestra 1 | 111.17% | 137.90% | 70.95% |
| Muestra 2 | 105.60% | 139.47% | 52.55% |
| Muestra 3 | 119.51% | 149.89% | 83.25% |
| CV | 6.24 | 4.57 | 22.41 |

Tabla 3. Determinación de porcentaje de contenido de riboflavina en Simi gomitas con respecto a la etiqueta (502 mcg).

| Método | Muestra Fija | Estándar Fijo | Volúmenes Constantes |
|-----------|--------------|---------------|----------------------|
| Muestra 1 | 112.48% | 55.64% | 14.70% |
| Muestra 2 | 93.62% | 68.26% | 27.88% |
| Muestra 3 | 99.60% | 42.76% | 1.28% |
| CV | 9.45 | 22.95 | 90.97 |

Tabla 4. Análisis de varianza para la determinación de porcentaje de contenido de riboflavina.

| Fuente | Suma de cuadrados | g. l | Cuadrados medios | F | P |
|---------------------|-------------------|------|------------------|-------|--------|
| Efectos principales | | | | | |
| A: FF | 13475.4 | 2 | 6737.68 | 70.19 | 0.0000 |
| B: Método | 10248.8 | 2 | 5124.4 | 53.38 | 0.0000 |
| Interacciones | | | | | |
| AB | 13680.6 | 4 | 3420.16 | 35.63 | 0.0000 |
| Residual | 1727.92 | 18 | 95.9956 | | |
| Total | 39132.7 | 26 | | | |

Mf=Muestra fija
 Ef= Estándar fijo
 Vcte=Volumen variable

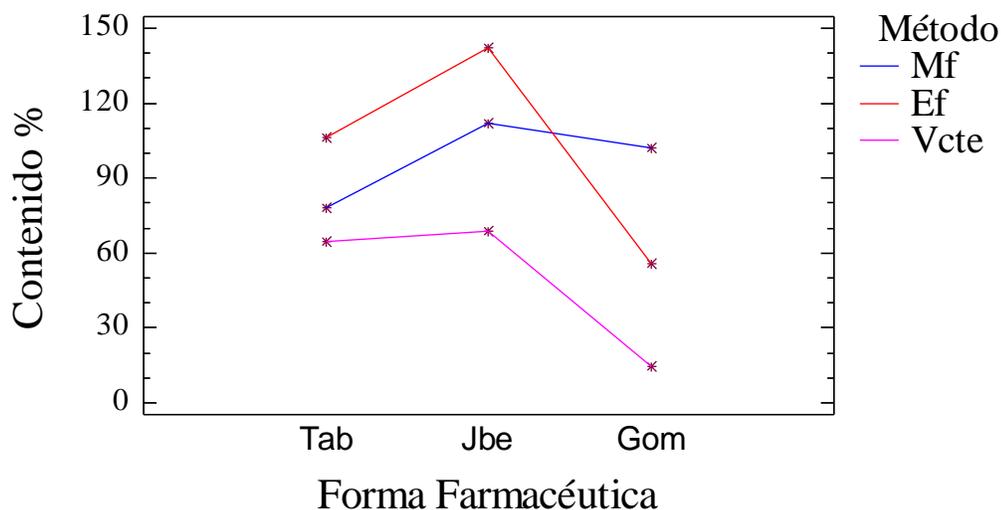


Gráfico 1. Interacción entre las formas farmacéuticas empleadas y los métodos en la determinación de porcentaje de contenido.

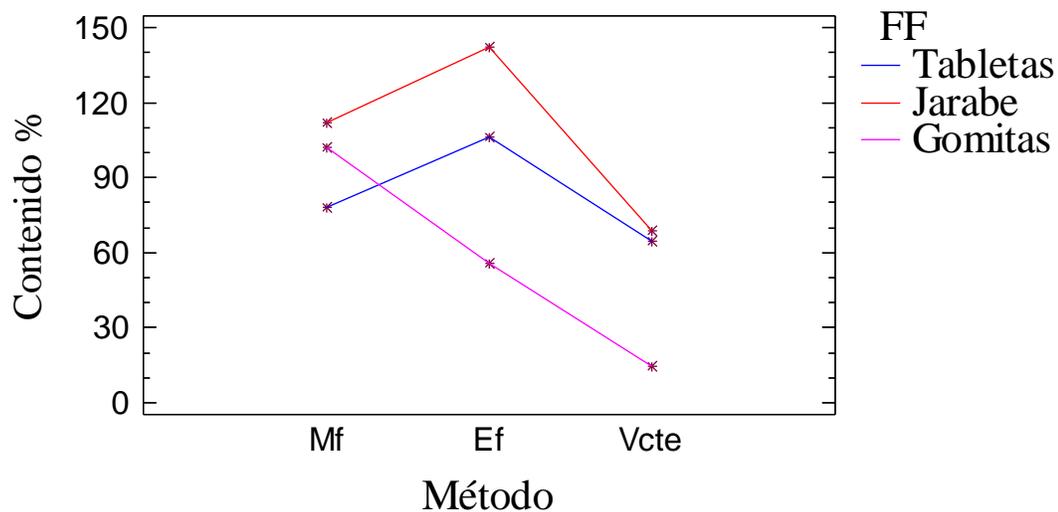


Gráfico 2. Interacción entre los métodos empleados y las formas farmacéuticas en la determinación de porcentaje de contenido.

Tabla 5. Análisis de varianza para linealidad en la determinación de riboflavina.

| Fuente | Suma de cuadrados | g. l | Cuadrados medios | F | P |
|---------------------|-------------------|------|------------------|-------|--------|
| Efectos principales | | | | | |
| A: FF | 0.000742139 | 2 | 0.000371069 | 10.86 | 0.0008 |
| B: Método | 0.000482192 | 2 | 0.000241096 | 7.06 | 0.0055 |
| Interacciones | | | | | |
| AB | 0.00116858 | 4 | 0.000292145 | 8.55 | 0.0005 |
| Residual | 0.000614753 | 18 | 0.000034153 | | |
| Total | 0.00300767 | 26 | | | |

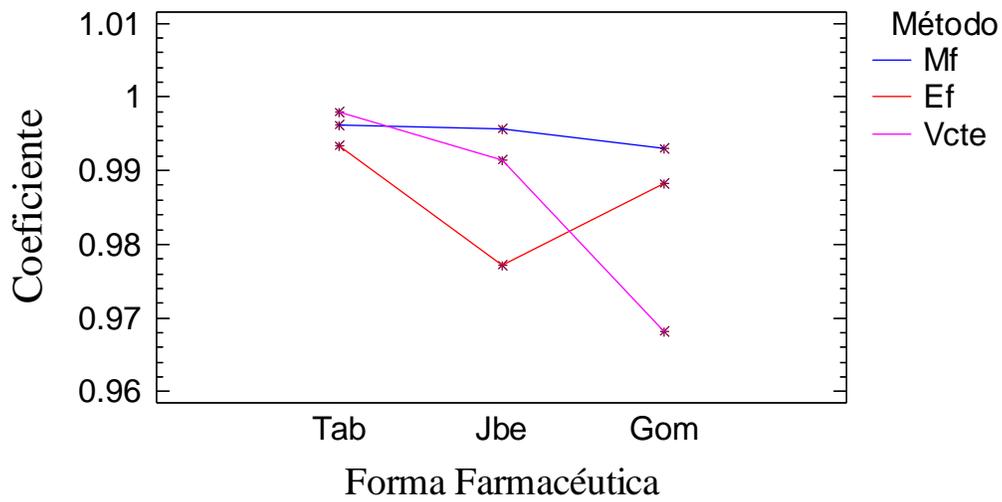


Gráfico 3. Interacción entre las formas farmacéuticas empleadas y los métodos en la determinación de linealidad.

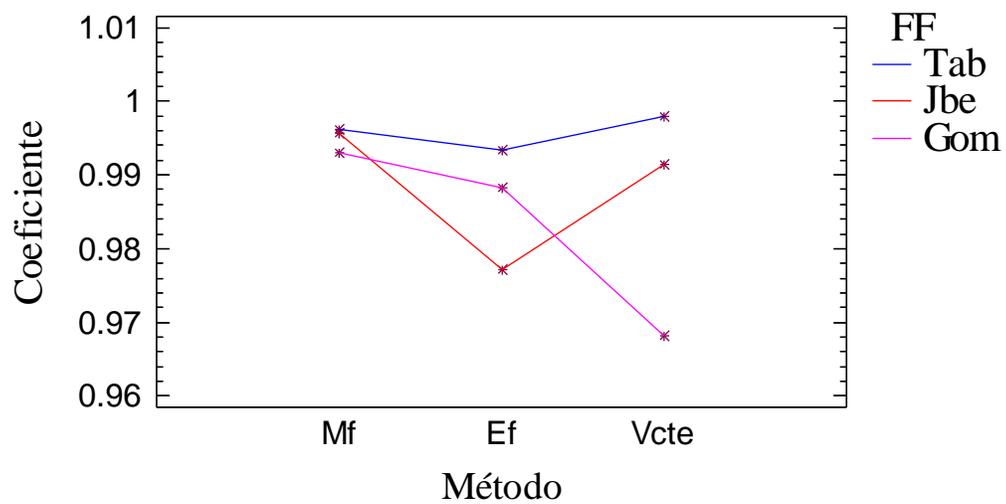


Gráfico 4. Interacción entre los métodos empleados y las formas farmacéuticas en la determinación de linealidad.

Tabla 6. Análisis de varianza para la sensibilidad en la determinación de riboflavina.

| Fuente | Suma de cuadrados | g. l | Cuadrados medios | F | P |
|---------------------|-------------------|------|------------------|-------|--------|
| Efectos principales | | | | | |
| A: FF | 54.342 | 2 | 27.71 | 46.26 | 0.0000 |
| B: Método | 47.7431 | 2 | 23.8716 | 40.65 | 0.0000 |
| Interacciones | | | | | |
| AB | 9.65316 | 4 | 2.41329 | 4.11 | 0.0154 |
| Residual | 10.5717 | 18 | 0.587317 | | |
| Total | 122.31 | 26 | | | |

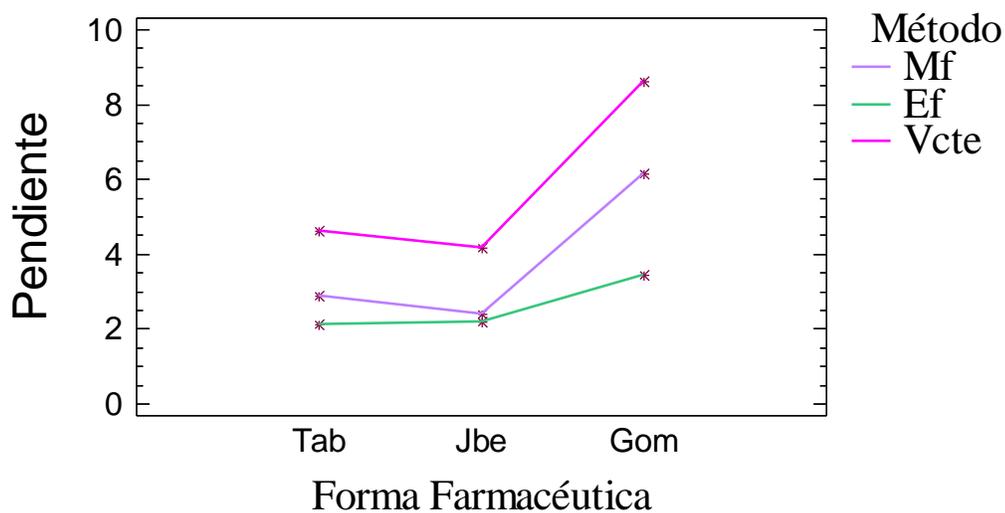


Gráfico 5. Interacción entre las formas farmacéuticas empleadas y los métodos en la determinación de sensibilidad.

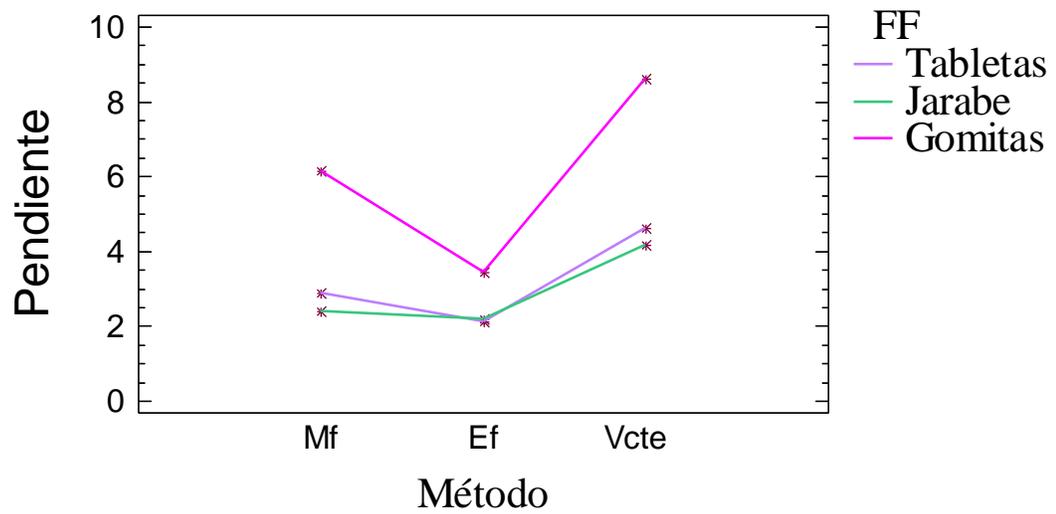


Gráfico 6. Interacción entre los métodos empleados y las formas farmacéuticas en la determinación de sensibilidad.

9. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Se llevó a cabo la determinación de riboflavina en tres multivitamínicos infantiles por medio de tres diferentes métodos de curva de adición: muestra fija, estándar fijo y volúmenes constantes por Fluorometría.

Las fluorescencias obtenidas en las determinaciones fueron tratadas en el Software Statgraphics versión 5.0 para así obtener un estudio de Análisis de Varianza Factorial (ANDEVA).

De los datos recabados se crearon gráficos de los tres diferentes métodos por cada presentación farmacéutica (tabletas, jarabe y gomas). Con los porcentajes de contenido y las r^2 se realizó el ANDEVA para conocer las posibles interacciones que existen y de los factores que depende cada una de las determinaciones.

Para el método de muestra fija, se observa que tanto para tabletas y gomas las fluorescencias inician con una lectura más baja pero después de los 5 mL terminan siendo más altas respecto al método de Estándar fijo, esto quiere decir que en el método de muestra fija hay una mejor homogeneidad ya que la muestra perdura constante tanto para tabletas como gomas. Por otro lado cabe mencionar que en este método se obtuvo un mayor porcentaje de contenido para la presentación en tabletas y para gomas.

En el método de estándar fijo debe de contrastarse contra otro método como HPLC, ya que solo se observa que las fluorescencias son más altas para la presentación en jarabe con respecto al método de muestra fija.

En el caso del método de volumen constante se aprecia que las lecturas de Fluorescencia son más altas que en los métodos de muestra fija y estándar fijo en las tres formas farmacéuticas, ya que en este método no se llevó a cabo una dilución previa, pues se realizó la adición de volúmenes en vasos de precipitados y no en matraces aforados como en el método de muestra fija y de Estándar fijo, este método indica un bajo porcentaje de contenido para jarabe y gomas.

Se realizó un análisis de varianza para el estudio de la interacción que existe en el porcentaje de contenido haciéndolo con los 27 datos que se obtuvieron de los tres métodos con sus respectivas repeticiones por cada forma farmacéutica, en donde la tabla 13 indica que los valores de P son inferiores a 0.05, por lo tanto hay un efecto significativo entre la forma farmacéutica y el método a utilizar.

En los gráficos 1 y 2 se describen las interacciones entre las formas farmacéuticas y los métodos y viceversa con respecto al porcentaje de contenido encontramos que el jarabe tiene un mayor porcentaje contra las tabletas y las gomas por medio del método de Estándar fijo, sin embargo este método presenta la mayor interacción entre los métodos usados y que para las tabletas y las gomas el mayor porcentaje de contenido se obtiene por el método de muestra fija.

El método de volúmenes constantes es el que presenta menores porcentajes de contenido para jarabe y gomas.

Cabe mencionar que a la hora de realizar las diluciones el jarabe fue más sencillo de cuantificar debido a que se encuentra en forma líquida, ya que para las tabletas y las gomitas la última alícuota a tomar se tuvo que filtrar previamente pues las muestras empezaban a sedimentarse en la bureta, además de que la agitación no fue constante.

En cuanto a las presentaciones se observa que las tabletas con el método de muestra fija tiene una menor dispersión y que las gomitas presentan un alto grado de interacción con el método de volúmenes constantes.

Respecto a la linealidad, en el gráfico 3 se encuentra que la mejor es para el método de Muestra fija, seguida del método de Estándar fijo y por ultimo volúmenes constantes que presenta una menor linealidad.

El método de muestra fija es el más homogéneo ya que no interacciona con ninguna de las formas farmacéuticas, además de que presenta una mejor linealidad con respecto a los otros 2 métodos.

El método de estándar fijo se descarta, ya que hay una mayor dispersión e interacción entre las formas farmacéuticas, también presenta una baja linealidad y con los porcentajes de contenido se puede apreciar que este método detecta a otra especie que fluoresce aparte de la riboflavina.

Para volúmenes constantes se demuestra que hay repetibilidad en tabletas y el jarabe, sin embargo no se recomienda para gomitas, también se debe tomar en cuenta que registra un bajo porcentaje de contenido para las tres formas farmacéuticas y que de los tres métodos es el que presenta una menor linealidad.

10. CONCLUSIONES

La hipótesis anteriormente planteada es válida ya que se cuenta con la evidencia que permite describir las posibles interacciones que hay entre las modalidades de curva de adición en la determinación de riboflavina.

11. COMENTARIOS

- Se recomienda que se validen los métodos a utilizar.
- Realizar el estudio con otros fármacos en diferentes presentaciones, siempre y cuando éstos tengan la capacidad de fluorescer.

12. ANEXOS

A continuación se presentan los resultados obtenidos para las tabletas Centrum con riboflavina 1.7 mg por tres repeticiones por cada uno de los diferentes métodos empleados.

Tabla 7. Determinación de riboflavina en tabletas Centrum

Muestra 1

| Método | Muestra Fija | Estándar Fijo | Volumen Constante |
|--------------|---------------|---------------|-------------------|
| Volumen (mL) | Fluorescencia | Fluorescencia | Fluorescencia |
| 0 | 13 | 17 | 26 |
| 3 | 21 | 22 | 35 |
| 5 | 27 | 26 | 45 |
| 7 | 32 | 30 | 57 |
| 9 | 39 | 35 | 72 |
| r^2 | 0.9975 | 0.9938 | 0.9982 |
| x (y=0) | -4.4418 | -8.2804 | -4.8656 |
| M | 2.85 | 1.98 | 5.18 |
| B | 12.68 | 16.45 | 25.29 |

Tabla 8. Determinación de riboflavina en tabletas Centrum.

Muestra 2

| Método | Muestra Fija | Estándar Fijo | Volumen Constante |
|--------------|---------------|---------------|-------------------|
| Volumen (mL) | Fluorescencia | Fluorescencia | Fluorescencia |
| 0 | 14 | 16 | 26 |
| 3 | 21 | 22 | 36 |
| 5 | 29 | 26 | 46 |
| 7 | 34 | 30 | 57 |
| 9 | 40 | 36 | 73 |
| r^2 | 0.9937 | 0.9924 | 0.9995 |
| x (y=0) | -4.5793 | -7.1698 | -4.8950 |
| m | 2.9426 | 2.1721 | 5.2336 |
| b | 13.4754 | 15.5737 | 25.6188 |

Tabla 9. Determinación de riboflavina en tabletas Centrum

Muestra 3

| Método | Muestra Fija | Estándar Fijo | Volumen Constante |
|----------------|---------------|---------------|-------------------|
| Volumen (mL) | Fluorescencia | Fluorescencia | Fluorescencia |
| 0 | 14 | 16 | 30 |
| 3 | 22 | 24 | 36 |
| 5 | 28 | 27 | 42 |
| 7 | 33 | 32 | 50 |
| 9 | 40 | 36 | 61 |
| r ² | 0.9975 | 0.9941 | 0.9963 |
| x (y=0) | -4.7919 | -7.5140 | -8.4326 |
| m | 2.85 | 2.19 | 3.46 |
| b | 13.68 | 16.47 | 29.23 |

A continuación se presentan los resultados obtenidos para jarabe 23 mg/100 mg en 100 ml por tres repeticiones por cada uno de los diferentes métodos empleados.

Tabla 10. Determinación de riboflavina en Jarabe

Muestra 1

| Método (mL) | Muestra Fija | Estándar Fijo | Volumen Constante |
|----------------|---------------|---------------|-------------------|
| Volumen | Fluorescencia | Fluorescencia | Fluorescencia |
| 0 | 13 | 65 | 111 |
| 3 | 21 | 72 | 119 |
| 5 | 26 | 79 | 128 |
| 7 | 30 | 82 | 135 |
| 9 | 35 | 85 | 143 |
| r ² | 0.9976 | 0.9770 | 0.9883 |
| x(y=0) | -5.5389 | -28.695 | -31.109 |
| m | 2.41 | 2.28 | 3.60 |
| b | 13.39 | 65.62 | 112.06 |

Tabla 11. Determinación de porcentaje de contenido de riboflavina en Jarabe

Muestra 2

| Método | Muestra Fija | Estándar Fijo | Volumen Constante |
|--------------|---------------|---------------|-------------------|
| Volumen (mL) | Fluorescencia | Fluorescencia | Fluorescencia |
| 0 | 13 | 65 | 98 |
| 3 | 21 | 71 | 111 |
| 5 | 26 | 74 | 122 |
| 7 | 30 | 78 | 134 |
| 9 | 36 | 86 | 145 |
| r^2 | 0.9973 | 0.9648 | 0.9879 |
| $x(y=0)$ | -5.2635 | -29.061 | -18.965 |
| m | 2.50 | 2.20 | 5.26 |
| b | 13.18 | 64.19 | 99.88 |

Tabla 12. Determinación de porcentaje de contenido de riboflavina en Jarabe

Muestra 3

| Método | Muestra Fija | Estándar Fijo | Volumen Constante |
|--------------|---------------|---------------|-------------------|
| Volumen (mL) | Fluorescencia | Fluorescencia | Fluorescencia |
| 0 | 13 | 65 | 193 |
| 3 | 21 | 73 | 201 |
| 5 | 26 | 76 | 208 |
| 7 | 29 | 81 | 214 |
| 9 | 34 | 83 | 226 |
| r^2 | 0.9922 | 0.9897 | 0.9979 |
| $x(y=0)$ | -5.9569 | -31.182 | -53.715 |
| m | 2.28 | 2.02 | 3.59 |
| b | 13.62 | 65.90 | 193.28 |

Se presentan los resultados obtenidos para gomitas 0.0502mg/30mg por tres repeticiones por cada uno de los diferentes métodos empleados.

Tabla 13. Determinación de riboflavina en gomitas

Muestra 1

| Método | Muestra Fija | Estándar Fijo | Volumen Constante |
|--------------|---------------|---------------|-------------------|
| Volumen (mL) | Fluorescencia | Fluorescencia | Fluorescencia |
| 0 | 30 | 37 | 79 |
| 3 | 48 | 50 | 86 |
| 5 | 60 | 56 | 98 |
| 7 | 68 | 62 | 115 |
| 9 | 80 | 67 | 141 |
| r^2 | 0.9960 | 0.9863 | 0.9752 |
| $x(y=0)$ | -5.6467 | -11.6480 | -10.5594 |
| m | 5.47 | 3.30 | 7.03 |
| b | 30.91 | 38.52 | 74.26 |

Tabla 14. Determinación de riboflavina en gomitas

Muestra 2

| Método | Muestra Fija | Estándar Fijo | Volumen Constante |
|--------------|---------------|---------------|-------------------|
| Volumen (mL) | Fluorescencia | Fluorescencia | Fluorescencia |
| 0 | 30 | 46 | 80 |
| 3 | 57 | 58 | 91 |
| 5 | 71 | 65 | 107 |
| 7 | 82 | 70 | 128 |
| 9 | 93 | 76 | 173 |
| r^2 | 0.9849 | 0.9909 | 0.9618 |
| $x(y=0)$ | -4.7985 | -14.2956 | -7.0302 |
| m | 6.93 | 3.29 | 10.31 |
| b | 33.29 | 47.16 | 72.49 |

Tabla 15. Determinación de riboflavina en Gomas

Muestra 3

| Método | Muestra Fija | Estándar Fijo | Volumen Constante |
|--------------|---------------|---------------|-------------------|
| Volumen (mL) | Fluorescencia | Fluorescencia | Fluorescencia |
| 0 | 29 | 31 | 83 |
| 3 | 49 | 45 | 93 |
| 5 | 60 | 52 | 107 |
| 7 | 72 | 59 | 123 |
| 9 | 83 | 64 | 160 |
| r^2 | 0.9984 | 0.9876 | 0.9673 |
| $x(y=0)$ | -5.0068 | -8.9853 | -9.1176 |
| m | 5.97 | 3.67 | 8.50 |
| b | 29.91 | 32.57 | 77.50 |

13. REFERENCIAS

1. Remington G.A. Farmacia. 20^a ed. Argentina: Editorial Médica Panamericana; 2003.
2. Hernández R.M, Sastre G.A. Tratado de Nutrición. España. Ediciones Díaz de Santos; 1999.
3. American Lifestyle [Página de internet]. Nueva York: [Fecha de consulta: 2012 Agosto 26]. Disponible en: <http://www.bellezaydietas.com/p/2430/Vitaminas-para-Ni%C3%B1os-masticables-Flintstones-Los-Picapedra>
4. National Institutes of Health [Página de internet]. Estados Unidos: [Fecha de consulta: 2012 Agosto 28]. Office of Dietary Supplements. Disponible en: <http://ods.od.nih.gov/factsheets/MVMS-DatosEnEspanol/>
5. Wellness&Health [Página de internet].Costa Rica: [Fecha de Publicación: 2012 Abril 28; Fecha de consulta; 2012 Agosto 30]. Kids Vits, 120 Gomititas Masticables. Disponible en: <http://wellnessandhealthcr.com/2012/04/28/kid-vits-120-gomititas-masticables/>
6. Salud y Bienestar. Naturaleza Cuerpo y Salud. [Página de internet]. Colombia: [Fecha de Publicación: 2009 Agosto 28; Fecha de consulta: 2012 Agosto 30]. Los beneficios de los Suplementos Multivitamínicos. Disponible en: <http://www.naturalezacuerpoy salud.com/nutricion/vitaminas-y-suplementos/suplementos-multivitamínicos/>
7. Kirschmann J D. Almanaque de Nutrición. 6^a ed. México. McGraw-Hill; 2008.
8. Coverley EG, Moffat AC, Pharmaceutical Society of Great Britain. Dept. of Pharmaceutical Sciences. *Clarke's Isolation and identification of drugs in pharmaceuticals, body fluids, and post-mortem material*. 3nd ed. London: Pharmaceutical Press, 2004.
9. Combs G F. Jr. The Vitamins Fundamental aspects in Nutrition and Health. Estados Unidos. Academyc Press; 1992.
10. Harrison T.R. Principios de Medicina (vol. 2).17^a ed. México. McGraw-Hill; 2009.

-
11. Complejo B [Página de internet]. [Fecha de Publicación: 2011 Abril; Fecha de consulta: 2012 Agosto 21]. Disponible en: <http://www.complejob.net/2011/04/la-vitamina-b2.html>
 12. Reyes M A. PLM Diccionario de Especialidades Farmacéuticas. 54^a ed. México: Thomson; 2008.
 13. Skoog D, West D, Holler F, Crouch S. Química Analítica. 8^a ed.: México. Thomson; 2005.
 14. Connors K A. Curso de Análisis Farmacéutico (ensayo del medicamento). España. Reverté; 1981.
 15. Day Jr. R. A y A.L. Química Analítica Cuantitativa. México. Underwood, Prentice-Hall Hispanoamericana; 1989.
 16. Harris Daniel C. Análisis químico cuantitativo. 3^a ed. España. Reverté; 2007.
 17. González C, Hernández L. Introducción al Análisis Instrumental. España. Ariel; 2002.
 18. Harris Daniel C. Exploring Chemical Analysis. 2^a ed. Estados Unidos de América. W. H. Freeman and Company; 2001.
 19. Olsen Eugene D. Métodos Ópticos de Análisis. España. Editorial Reverté; 1990.
 20. Operator's Reference Manual Model 450 digital Fluorometer. USA; 1987.
 21. Thomas M .Ultraviolet and Visible Spectroscopy.2^a ed. England: Analytical chemistry by open learning; 1996.
 22. Harvey D. Química Analítica Moderna. España: McGraw-Hill: 2002.
 23. Bader. M. A Systematic Approach to Standard Addition Methods in Instrumental Analysis. Journal of Chemical Education. 1980; 57 (10): 703-706.

-
24. México, tercer mercado más importante en multivitamínicos [Página de internet]. México: Periódico E l Economista [Fecha de Publicación 2010-20:57 pm Mayo 4; Fecha de consulta: 2012 Agosto 26]. Disponible en: <http://eleconomista.com.mx/industrias/2010/05/04/mexico-tercer-mercado-mas-importante-multivitaminicos>.
 25. Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, “Que establece:” las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas”. Diario Oficial de la Federación, 26 de enero de 1998.
 26. Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 9 ed. México: Secretaria de Salud Pública. Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 2008.
 27. Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 5 ed. México: Secretaria de Salud Pública. Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.
 28. Dick J G. Química analítica. México. El Manual Moderno; 1979.
 29. Flashka H A. Química Analítica Cuantitativa. México: Editorial Continental SA; 1980.
 30. The Merck Index. 20th ed. USA: Editorial Merck and Co. Inc.; 1996.
 31. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2006, Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria químico farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos. Diario Oficial de la Federación, 26 de Enero de 1998.
 32. Devore J. Probabilidad y estadística para ingeniería y ciencias. 5^a ed. México: Thomson; 2008.
 33. Mendenhall W. Introducción a la Probabilidad y Estadística. 12^a ed. Cengage Learning. 2008.
 34. Dávila T, Marques dos Santos M J, López Reynoso J M. Cuaderno de Problemas de Probabilidad y Estadística. México Universidad Nacional Autónoma de México; 2005.