

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA  
UNAN – LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**



**VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE POLAROGRAFÍA CLÁSICA  
PARA LA DETERMINACIÓN DE VITAMINA “C” EN  
DIFERENTES CÍTRICOS.  
( LIMÓN, NARANJA DULCE Y NARANJA AGRIA ).**

**TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE:**

**LICENCIADO EN QUÍMICA.**

**PRESENTADA POR: Bra. MARÍA CECILIA MORENO GARCÍA.**

**TUTOR: Dr. GUSTAVO MARCIAL DELGADO PANIAGUA.**

**León, Nicaragua, Noviembre 2003.**

## DEDICATORIA

*A Dios por estar presente en cada momento de mi vida.*

*A mi hijo Joaquín por ser la razón de mi vida, por quien he luchado día a día para obtener todos mis logros y culminar este trabajo.*

*A mis padres: Jorge Moreno y Adilia García de Moreno por su paciencia y el apoyo incondicional en mi formación profesional.*

*A mis hermanos: Mario y Magdalila Moreno por su comprensión en todo momento que los he necesitado.*

## *AGRADECIMIENTO*

*Mi más sincero agradecimiento a los Lic. Manuel Vanegas y Jorge Cisne, por haberme ayudado desinteresadamente en la realización de esta tesis.*

*A mi tutor: Dr. Gustavo Marcial Delgado Paniagua por brindarme todo su valioso tiempo que de una u otra forma hizo posible concluir este trabajo monográfico.*

*A los profesores:*

*Msc. Fabio Pallavicini, Msc. José E. Sequeira, Lic. Santiago Pacheco y Dr. Arturo Mayorga por brindarme sus conocimientos y colaboración durante todo este tiempo.*

*A todos mis amigos que siempre han estado junto a mí en todos los momentos que los he necesitado.*

## **INDICE**

<b>I. RESUMEN</b> .....	1
<b>II. INTRODUCCIÓN</b> .....	2
<b>III. OBJETIVOS</b> .....	4

### **IV. MARCO TEÓRICO**

IV.1 Generalidades sobre el AA .....	6
IV.1.1 Funciones de la vitamina C.....	9
IV.1.2 Dosis diarias recomendadas en el ser humano.....	10
IV.1.3 Alimentos fuentes de vitamina C.....	12
IV.1.4 Nombres comerciales de la vitamina C.....	13
IV.1.5 Caracterización Botánica de la familia rutáceas.....	13
IV.2 Polarografía clásica.....	14
IV.2.1 Electrodo de gota de mercurio.....	18
IV.2.1.1 Propiedades químicas del mercurio.....	18
IV.2.2 Corriente de difusión.....	19
IV.2.3 Corriente residual.....	20
IV.3 Validación de métodos analíticos.....	21
IV.3.1 Jerarquía de la metodología.....	22
IV.3.2 Objetivo de la validación.....	23
IV.3.3 Validación de un método.....	23
IV.3.4 Proceso de la validación.....	24
IV.3.5 Validación general.....	24
IV.3.6 Validación para uso específico.....	26
IV.3.7 Desarrollo del método.....	29

IV.4 Parámetros de desempeño del método y su significado.....	30
IV.4.1 El método de adición patrón.....	30
IV.4.2 Adición patrón.....	30
IV.4.3 Criterios de eficiencia.....	31
IV.4.3.1 Criterios primarios.....	32
IV.4.3.1.1 Precisión.....	32
IV.4.3.1.2 Exactitud o Bias ( sesgo ).....	32
IV.4.3.1.3 Límite de detección.....	32
IV.4.3.2 Criterios secundarios.....	34
IV.4.3.2.1 Linealidad.....	34
IV.4.3.2.2 Rango.....	34
IV.4.3.2.3 Límite de cuantificación.....	35
IV.4.3.2.4 Selectividad.....	35
IV.4.3.2.5 Sensibilidad.....	35
IV.5 Evaluación de la incertidumbre.....	36
IV.5.1 Incertidumbre de medición.....	37
IV.5.2 Incertidumbre estándar.....	37
IV.5.3 Incertidumbre estándar combinada.....	38
IV.5.4 Incertidumbre expandida.....	38
IV.5.5 Incertidumbre estándar relativa.....	39
IV.6 Métodos Polarográficos del ácido ascórbico .....	40
IV.6.1 Interferencias en el método.....	40
IV.6.2 Otros métodos utilizados en la determinación de ácido ascórbico.....	41

## **V. PARTE EXPERIMENTAL**

V.1 Determinación de vitamina C por polarografía clásica.....	44
V.1.1 Equipo y materiales .....	44
V.1.2 Reactivos .....	46
V.1.3 Procedimientos .....	47
V.1.3.1 Preparación de soluciones.....	47
V.1.3.1.1 Solución de ácido ascórbico estándar.....	47
V.1.3.1.2 Solución de ácido acético 2 N.....	47
V.1.3.1.3 Solución de acetato sódico 2 N.....	47
V.1.3.1.4 Solución de hidróxido de sodio 0.1 N.....	47
V.1.3.1.5 Electrolito Soporte.....	48
V.1.3.1.6 Preparación de la muestra cítrica.....	48
V.1.3.1.7 Preparación del blanco.....	48
V.1.3.1.8 Curva de calibración normal.....	49
V.1.3.1.8 Curva de calibración por adición patrón.....	49

## **VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

VI.1 Selección del barrido de potencial.....	51
VI.2 Cálculo del potencial de media onda.....	52
VI.3 Estudio de los parámetros de validación.....	55
VI.3.1 Estudio de la repetibilidad del estándar de ácido ascórbico ( 1000 ppm )...55	
VI.3.2 Linealidad.....	59
VI.3.3 Estudio de la repetibilidad de la curva de calibración normal.....	64
VI.3.4 Estudio de la exactitud del método, efecto matriz, % Rc.....	66
VI.3.5 Límite de detección y de cuantificación.....	71
VI.4 Aplicaciones del método. Cálculo de la incertidumbre.....	72

<b>VII. CONCLUSIONES</b> .....	74
<b>VIII. RECOMENDACIONES</b> .....	75
<b>IX. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	76
<b>X. ANEXOS</b> .....	78



## ***I RESUMEN***

El presente trabajo propone el método de polarografía clásica para la determinación de vitamina “C” en tres tipos de muestras como son: limón, naranja dulce y naranja agria. Para lo cual se llevó a cabo la validación de este método polarográfico, para esto primero se realizaron varios barridos de potencial variando tanto el potencial inicial como el final para encontrar el rango óptimo en el cual se debe trabajar, quedando establecido: potencial inicial ( $E_i$ ) = +0.10 Volts y potencial final ( $E_f$ ) = -0.30 Volts.

Se realizó el cálculo del potencial de media onda a partir del polarograma de un estándar de ácido ascórbico de 1000 ppm. Luego se estudiaron los parámetros de validación los cuales definen el desempeño del método tales como: repetibilidad, linealidad, porcentaje de recobro, límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC). Los valores de LD y LC son 3.82 ppm y 16.82 ppm respectivamente, siendo éstos los mismos para los diferentes tipos de muestras estudiadas.

Se efectuó el estudio de repetibilidad de la curva de calibración normal (curva de calibración con estándares puros) a través de una carta de control tomando en cuenta simultáneamente los parámetros de regresión intercepto ( $b_0$ ) y pendiente ( $b_1$ ) durante 10 días.

Finalmente se efectuó el cálculo de la incertidumbre de la concentración de ácido ascórbico en las muestras cítricas.



## ***II. INTRODUCCIÓN***

Las vitaminas son unos compuestos necesarios en pequeñas cantidades para el mantenimiento de la actividad biológica normal, no son producidas por el organismo y éste en condiciones normales las toma de los alimentos que la contienen. La vitamina C o ácido ascórbico se le asocia principalmente con el ácido L (+) ascórbico por ser el de mayor actividad vitamínica dentro de este grupo. El ácido ascórbico no interviene en la composición de ninguna coenzima ni se encuentra combinado en forma estable o resistente.

La vitamina C es un polvo blanco que se disuelve con facilidad en el agua, se le conoce mejor por su capacidad para prevenir resfriados y desempeña un papel fundamental en muchas funciones corporales. La vitamina C constituye el antioxidante más poderoso soluble en el agua del cuerpo, porque protege las células del daño por oxidación. La función que desempeña en el cuerpo es indispensable para que se elabore el tejido conjuntivo o colágeno, que se encuentra en todo el organismo y contribuye al mantenimiento de la estructura de los tejidos en la piel, músculos, encías, vasos sanguíneos y huesos.

En la clásica enfermedad carencial del escorbuto, la falta de vitamina C conduce a que se abran pequeños vasos sanguíneos, al enrojecimiento y hemorragias subcutáneas, gingivales y de las encías, aflojamiento y pérdida de los dientes, pérdida del cabello, piel seca pruriginosa, alteraciones neuróticas, deficiencia en la cicatrización de heridas, debilidad general y muerte.

Al ser una vitamina que se destruye por oxidación fácilmente y mas aun en presencia de álcalis y calor, es muy fácil que disminuya el contenido de la misma en los alimentos si se cocinan en un medio acuoso, la perdida de la vitamina es mayor por ser hidrosoluble.



La vitamina C llamada también ácido ascórbico, ácido cevitamínico, ácido ascorbutírico, antiguamente se le llamaba ácido Hexurónico, antiescorbutina, vitamina aniescorbútica y escorbutamina. La relación entre el escorbuto y el consumo de cítricos (ricos en vitamina C )se descubrió en el siglo XX, en los largos viajes en barco que se realizaban a comienzos del siglo, los marineros ingleses (llamados limoneros) sabían que debían consumir limones a diario para no padecer de esta enfermedad.

En el año de 1923 Zilva aisló una sustancia muy activa que prevenía el escorbuto del jugo de limón, mas tarde Szents-Gyorgyi en 1928 la estudió, logrando purificarla y aislarla del tejido suprarrenal, naranjas y col, denominándola ácido hexurónico y fue obtenida mediante síntesis por Heichstein.

En 1989 y basándose en investigaciones que demostraron que el humo del tabaco disipa la vitamina C del cuerpo, se fijó una dosis diaria de 100 mg para fumadores, en lugar de 60 mg diarios que es la dosis recomendada, esto se debió a que se considero a este grupo como un colectivo con necesidades especiales. Otros estudios han revelado que se requiere cantidades superiores a la ración dietética recomendada para proporcionar una protección óptica dela vitamina C contra el daño celular, provocado por las radicales libres que son partículas moleculares desequilibradas generadas durante reacciones en las que invierte el oxígeno.

Actualmente la vitamina C es obtenida por síntesis, en lugar de ser extraída de los frutos que la contienen debido a que no se usa para curar el escorbuto (enfermedad poco frecuente ) sino que se consume anualmente muchas cantidades para tratar estados de deficiencia de esta vitamina producida por una mala alimentación.



### ***III. OBJETIVOS***

#### ***Objetivo General:***

- ❖ Validar el método de polarografía clásica para la determinación de vitamina C en diferentes cítricos ( limón, naranja dulce y naranja agria ).

#### ***Objetivos específicos:***

- ❖ Establecer el rango del barrido de potencial para la cuantificación de vitamina C.
- ❖ Calcular el Potencial de media onda.
- ❖ Evaluar los parámetros que definen el desempeño del método: precisión, exactitud, límite de detección, límite de cuantificación y linealidad.
- ❖ Realizar el control de calidad de las curvas de calibración normal.
- ❖ Evaluar la incertidumbre en el cálculo de la concentración de ácido ascórbico en las muestras de cítricos.



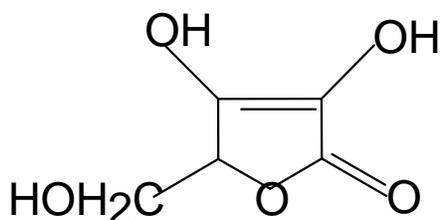
## *IV. MARCO TEÓRICO*



## ***IV.1 GENERALIDADES SOBRE EL ÁCIDO ASCÓRBICO***

La vitamina C es una sustancia de color blanco ligeramente amarillo, estable en su forma seca, pero en solución en presencia del aire se altera rápidamente oxidándose con facilidad y más aún si se expone al calor, un PH alcalino (mayor a 7), si existe presencia de iones  $\text{Cu}^{+2}$  y  $\text{Fe}^{+3}$  que actúan como catalizadores no enzimáticos, también aceleran su oxidación, siendo esta la propiedad química más importante del ácido ascórbico por la transferencia de uno o dos electrones, debido a esto, ayuda a prevenir la oxidación de las moléculas solubles en agua, también, indirectamente protege a las vitaminas A y E de la oxidación, así como a algunas vitaminas del grupo B, tales como la riboflavina, tiamina, ácido fólico y ácido pantoténico.

La fórmula molecular de la vitamina C o ácido ascórbico es  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$  teniendo un peso molecular de 176,13, su punto de fusión es  $189^\circ - 192^\circ\text{C}$ , su estructura química corresponde a:

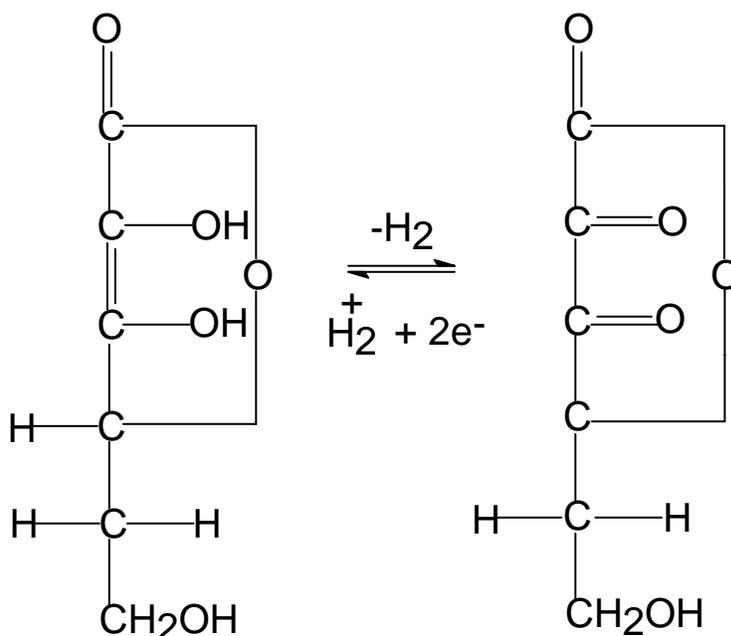




La vitamina C corresponde al grupo de las vitaminas hidrosolubles y como la gran mayoría de ellas no se almacena en el cuerpo por un largo período de tiempo y se elimina en pequeñas cantidades a través de la orina. Por esto es importante su administración diaria, ya que es más fácil que se agoten sus reservas que las de otras vitaminas.

El ácido ascórbico actúa como un desintoxicante y puede reducir los efectos colaterales de drogas como la cortisona, aspirina e insulina y puede reducir la oxidadad de metales pesados como el plomo, mercurio y arsénico.

La vitamina C es soluble en agua, alcoholes y glicerina, siendo insoluble en bencina, cloroformo, éter y grasas. Al estar en solución acuosa se oxida convirtiéndose en ácido dehidroascórbico.



Ácido ascórbico

forma reducida o enólica

Ácido dehidroascórbico

forma oxidada



El ácido ascórbico interviene en la formación del colágeno (constituyente principal del tejido conjuntivo, del cartílago y del hueso), en la síntesis de hormonas esteroideas, en el metabolismo del lípido y de algunos fármacos, aumentando la absorción del hierro cuando se ingieren juntos. Tiene influencia sobre la actividad de los leucocitos, macrófagos, la respuesta inmune, la cicatrización de heridas y las reacciones alérgicas.

Se absorbe fácilmente en el intestino delgado, precisamente en el duodeno, pasa a la sangre por transporte activo y a veces también por difusión. Parece ser que el mecanismo de absorción es saturable, debido a que cuando se ingieren cantidades muy grandes el porcentaje que se absorbe es mucho menor.

La concentración de vitamina C en los leucocitos está en relación con la concentración de la vitamina en los tejidos, por lo que midiendo la concentración de la vitamina C en los leucocitos, sabemos el nivel real de la vitamina en los tejidos. El pool de vitamina C que el ser humano posee en condiciones normales es aproximadamente 1500g. Cuando éste pool está lleno, la vitamina C se elimina en un alto porcentaje por orina, bajo la forma de ácido oxálico (catabólico) o si se ingiere en dosis muy elevadas como ácido ascórbico; si hay deficiencias, la absorción es muy alta y no hay eliminación por orina. El ácido ascórbico se encuentra en altas concentraciones en varios tejidos, como: el tejido suprarrenal, hígado, bazo y riñones, y tiene una vida media de aproximadamente 16 días en el organismo.



### IV.1.1 Funciones de la vitamina C:

Las funciones de la vitamina C son diversas, pero todavía no se sabe si actúa como coenzima o como cofactor. Al tener gran capacidad de captar y liberar hidrógeno (oxido-reducción), su papel en el metabolismo es de gran importancia. Es importante su función como reductora del  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  lo que permite una mayor absorción a nivel del intestino, facilita a la vez la liberación del hierro de la transferrina (proteína que transporta el hierro en sangre) y también de la ferritina (una de las principales formas de almacenamiento del hierro).

Mediante su participación en la formación del colágeno y mucopolisacáridos es necesaria junto con el  $\text{O}_2$  y el  $\text{Fe}^{+2}$  para formar hidroxiprolina e hidroxilisina (componentes del colágeno). El colágeno es una sustancia de la cual depende la integridad de todos los tejidos fibrosos, como son la piel, el tejido conjuntivo, la dentina, matriz ósea, cartílago y los tendones; en la formación de esta proteína radica su importancia como cicatrizante de heridas y fracturas.

Además participa en la formación de ciertos neurotransmisores como la serotonina, en la conversión de dopamina a noradrenalina y en otras reacciones de hidroxilación que incluyen a los aminoácidos aromáticos y a los corticoides. Su concentración disminuye bajo situaciones de stress cuando hay mucha actividad de las hormonas de la corteza suprarrenal.



La vitamina C cumple una función importante en el sistema inmunológico, al ayudarlo a luchar contra las infecciones y contra las células cancerosas, esto es por la actividad de los leucocitos, estimulación de anticuerpos, neutrófilos y fagocitos, la producción de interferón, el proceso de la reacción inflamatoria o la integridad de las mucosas. En el ser humano la vitamina C no puede ser sintetizada, por lo cual debemos ingerirla a diario, esto es debido a la ausencia de la enzima

- 1- gulonolactona oxidasa que participa en la vía del ácido urónico.

#### **IV.1.2 Dosis diarias recomendadas en el ser humano:**

##### **Lactante:**

0-6 meses – 40 mg.

7-12 meses – 50 mg.

##### **Niños:**

1 – 3 Años - 15 mg.

4 – 8 Años - 25 mg.

9 – 13 Años - 45 mg.

##### **Varones:**

14 – 18 Años - 75 mg.

19 – 30 Años - 90 mg.

31 – 50 Años - 90 mg.

51 – 70 Años - 90 mg.

+ 70 Años - 90 mg.



**Mujeres:**

14 – 18 Años - 65 mg.

19 – 30 Años - 75 mg.

31 – 50 Años - 75 mg.

51 – 70 Años - 75 mg.

+ 70 Años - 75 mg.

**Embarazo:**

Menores 18 Años - 80 mg.

19 a 50 Años - 85 mg.

**Lactancia:**

Menores de 18 Años - 115 mg.

19 a 50 Años - 120 mg.



### IV.1.3 Alimentos fuentes de Vitamina C:

<b>Frutas:</b>	<b>Vegetales:</b>
Jugo de manzanas	Espárragos
Kiwi	Repollito de Bruselas
Mango	Coliflor
Papaya	Pimientos dulces y picantes
Melón	Brócoli
Frutas cítricas ( naranjas, limón, mandarina, etc )	Papa ( patata )
Sandía	Tomates
Fresas	Espinacas

La vitamina C se utiliza en estados carenciales como: escorbuto, quemadura graves, úlcera péptica, diarrea crónica, hipertiroidismo, estados de malnutrición, tabaquismo y uso de anticonceptivos orales. También es utilizada como coadyuvante en tratamientos con suplemento nutricional de hierro.

El ácido ascórbico debe administrarse con especial precaución en caso de padecer de antecedentes de alguna de las siguientes enfermedades: Cálculos renales de oxalato, hiperoxaluria y oxalosis, deficiencia en la enzima glucosa – 6 - fosfato deshidrogenasa, hemocromatosis, anemia sideroblástica, anemia drepanocítica o diarrea. En algunos casos puede producir acidificación urinaria en niños.



#### IV.1.4 Nombres comerciales de la Vitamina C:

Cebión<sup>R</sup>, Citrolider<sup>R</sup>, Citrovit<sup>R</sup>, Ledovit<sup>R</sup>, Redoxon<sup>R</sup>, Ursa C<sup>R</sup> Vitamina C Roche<sup>R</sup>.

#### IV.1.5 Caracterización Botánica de la familia Rutáceas

Reino : Vegetal  
División : Spermatophita.  
Subdivisión : Angiospermas.  
Clase : Dicotiledóneas.  
Orden : Corolíferos.  
Suborden : Geraniales.  
Familia : Rutáceas.  
Género : Citrus.

Los citrus se determinan por sus nombres científicos, los cuales son conocidos por nombres comunes tales como:

Limón agrio: Citrus Limón.  
Naranja Dulce: Citrus Sinensis.  
Naranja Agria: Citrus Aurantium.



## ***IV.2 POLAROGRAFÍA CLÁSICA.***

La polarografía fue inventada por Jaroslav Heyrovsky y sus alumnos de la Charles University en Praga, con sus publicaciones en 1925, desde entonces se ha mejorado ampliamente. La polarografía es un método por el cual se pueden reducir y en algunos casos oxida, pequeñas cantidades de sustancias en el electrodo de gota de mercurio o alambre de platino.

La corriente que circula en la celda se mide en función del potencial del electrodo de trabajo. Esta corriente suele ser proporcional a la concentración del analito. Las técnicas polarográficas más sensibles tienen un límite de detección próximo a  $10^{-9}$  M, y una precisión cercana a 5% . Los métodos polarográficos menos sensibles que se aplican cuando la concentración del analito es del orden de  $10^{-3}$  M, pueden tener precisiones de algunos décimos de unidad porcentual, aunque lo común es que sea a 2-3%.

En la polarografía clásica, el electrodo de trabajo es una gota de mercurio que gotea del extremo de un tubo capilar de vidrio, la corriente circula en un electrodo auxiliar constituido por un alambre de platino y como referencia se utiliza un electrodo de Ag – AgCl, las curvas corriente - voltaje reciben el nombre de polarogramas y al estudiar sus características se pueden determinar la clase y concentración de los iones existentes en la disolución. ( 1 )



La polarografía también encuentra numerosas aplicaciones en análisis orgánicos y en el estudio de ciertas reacciones, así como en la posibilidad de determinar el número de coordinación y valores aproximadas de la constante de estabilidad de algunas combinaciones complejas, para que sea utilizable el método sólo es necesario que la disolución contenga alguna sustancia electro reducible o electro oxidable y se ha empleado en las determinaciones de vitaminas, hormonas y otros compuestos. ( 2 )

El método polarográfico se comprende considerando la electrólisis de una disolución en una celda polarográfica, al obtenerse una onda polarográfica que puede interpretarse a corrientes muy bajas, la corriente que circula a través de la celda es muy débil y se le designa con el nombre de corriente residual.

Cada ión está caracterizado por un potencial de descarga dado o potencial de descomposición, por debajo del cual no puede ser reducido sobre el electrodo y cuyo valor también marca el límite de existencia de la corriente residual, ya que a partir de este potencial de descomposición, variaciones muy pequeñas de potencial determinan notables incrementos de la intensidad de la corriente hasta que alcanza un valor máximo, la corriente ya no varía prácticamente aunque se aumente más la diferencia de potencial. Esta corriente, cuya intensidad ya no depende del potencial aplicado recibe el nombre de corriente límite y es una característica de la concentración de cada ión o sustancia.

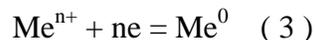


La corriente límite es el resultado de una restricción en la velocidad con la que el participante en la electródica puede alcanzar la superficie del micro electrodo, controlando adecuadamente las condiciones experimentales esta velocidad esta determinada casi exclusivamente por la velocidad a la que se difundan las reaccionantes. En estas circunstancias la corriente límite recibe el nombre de corriente de difusión y es proporcional a la concentración del reaccionante.

La polarografía cualitativa identifica a un ión por el potencial de semi onda del polarograma, el análisis cualitativo está basado en que la altura del salto de la curva corriente / potencial es proporcional a la concentración del ión considerado, la polarografía cualitativa y cuantitativa de una mezcla de varios elementos solo es posible cuando los respectivos potenciales de semi onda tienen valores suficientemente distintos.

La forma de la onda polarográfica se explica porque mientras no se alcanza el potencial de descomposición, no se deposita sobre la gota de mercurio pendiente del cátodo ningún ión metálico.

Cuando el potencial aplicado sobrepasa al potencial de descomposición, entonces comienza a depositarse sobre el cátodo iones metálicos que pierden su carga .





Al desaparecer todos los iones metálicos del entorno de la gota de mercurio, se produce en esta zona una disminución de la concentración de los iones metálicos, que será tanto mayor, cuando más elevado sea el potencial aplicado, esto da lugar a un estado de equilibrio inestable, se produce en el interior de la disolución una corriente de difusión de los iones metálicos hacia el entorno del electrodo para compensar las diferentes concentraciones producidas por la deposición y la velocidad de esta difusión será proporcional a la diferencia de concentración existentes entre el líquido que rodea al electrodo de gota y el resto de la disolución.

Esta difusión de los iones causa un aumento en la intensidad de la corriente que atraviesa la celda aumento que recibe el nombre de corriente límite cuya magnitud viene determinada por el salto que se observa en los polarogramas y alcanza su valor máximo cuando el número de iones metálicos que se descargan sobre la misma, a partir de este momento un nuevo aumento de potencial no tiene apenas efecto sobre la misma intensidad de la corriente, por lo que desde ese punto no hay variación de la intensidad de la corriente.

Los métodos polarográficos son menos seguros que los métodos gravimétricos o volumétricos ordinarios, pero son particularmente útiles para la determinación de cantidades muy pequeñas de elementos en el caso de que los métodos anteriores estén también sujetos a grandes errores relativos y no son aplicables a composiciones bajas de  $10^{-5}$  M.

Otra ventaja de los métodos polarográficos es que al concluir la determinación permanece inalterable la concentración inicial del elemento determinado, debido a que la electrólisis se mantiene durante un tiempo muy pequeño, esto hace que se puedan realizar un buen número de determinaciones sobre la misma composición sin alteración práctica de su composición. (2)



## IV.2.1 Electrodo de gota de Mercurio.

El electrodo de gota de mercurio se utiliza por tener una superficie perfectamente pulida que favorece el establecimiento rápido de un sistema oxido reductor de la solución.

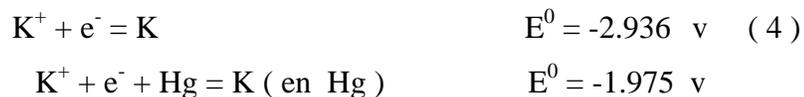
### IV.2.1.1 Propiedades Químicas del Mercurio:

- Permanece inalterable en los medios ácidos y básicos.
- De todos los metales nobles es el que tiene el sobre potencial de reducción de  $H^+$  más alto, la reducción ( $H^+ + e = \frac{1}{2} H_2$ ) tiene lugar a un potencial más negativo que sobre el electrodo de platino ( Pt ).



El mercurio tiene la posibilidad de un electrodo polarizable de superficie pequeña con corrientes muy débiles, se consumen cantidades de materia muy pequeña por lo que puede hacer un gran número de mediadas con una misma solución.

La soluciones neutras o básicas, aún los cationes alcalinos pueden reducirse más fácil que el  $H^+$  a pesar que su potencial de reducción es más bajo, esto se debe en parte a que el potencial de reducción de un metal que forma amalgama es más positivo que su potencial de reducción al estado sólido.



El electrodo de mercurio permite obtener corriente reproducible en función del potencial, esta reproducibilidad puede atribuirse a la renovación continua de la superficie de gota durante su crecimiento. ( 1 )

#### IV.2.2 Corriente de Difusión.

El área del mercurio es muy pequeña , los iones cercanos a la superficie reaccionan rápidamente para que la reacción continúe se necesita una alimentación continua de iones en la superficie del electrodo. ( 4 )

Cuando el potencial del electrodo de trabajo es suficientemente negativo el régimen de reducción de los iones del analito  $+ ne^- = \text{analito} (\text{ en Hg } )$  depende de la velocidad con que el analito puede alcanzar el electrodo.



### IV.2.3 Corriente residual

La corriente que circula entre los dos límites de electro actividad del medio en ausencia de especies electro activas se llama corriente residual.

La corriente residual contiene dos componentes el primero es la corriente requerida para carga y descarga en el condensador constituido por la interfase mercurio solución esta llamada corriente capacitiva  $I_c$  y una segunda, cuando cada gota de mercurio se desprende, que se lleva la carga hasta el fondo de la celda polarográfica. La gota que sigue requiere una mayor cantidad de corriente para cargarse. La segunda corriente es la que proviene de la oxidación o reducción de trazas de impurezas en el electrolito soporte a esta se le llama corriente faradaica  $I_f$ .

$$I_{res} + I_f + I_c \quad (5)$$



### ***IV.3 VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS***

La validación del método es necesario en el análisis químico. La validación de un método analítico es el proceso de establecer las características del desempeño de un método y la identificación de los aspectos que influyen que puedan cambiar estas características , así como hasta que punto se puedan cambiar.

La validación de un método es un proceso basado en la confirmación de su desempeño y de que el mismo es consistente con los requerimientos de su aplicación. El laboratorio de servicio y su personal tienen una clara responsabilidad de justificar la confianza del cliente , proporcionando la respuesta correcta a la parte analítica del problema, en otras palabras debe demostrarse que los resultados son adecuados para el propósito , para esto será suficiente que cualquier decisión que se tome basada en él sea confiable. De manera que, el desempeño del método debe ser válido y de igual manera deberá estimarse la incertidumbre del resultado y analizar las muestras adecuadas. ( 6 )



### IV.3.1 Jerarquía de la metodología

Técnica → Método → Procedimiento → Protocolo

- **Técnica:**

Es un principio científico que ha encontrado utilidad para proporcionar información composicional.

- **Método:**

Es una adaptación distinta de una técnica para un propósito de medición seleccionado.

- **Procedimiento:**

Consiste en una guía escrita necesaria para utilizar un método.

- **Protocolo:**

Es un conjunto de guías definitivas que deben ser seguidas sin excepción si los resultados analíticos son aceptados para un propósito dado, pueden consistir de procedimientos o métodos ya existentes o bien modificaciones de los mismos que pueden ser desarrollados para propósitos específicos.



### IV.3.2 Objetivo de la validación

La validación es el proceso de determinación de la adaptabilidad de la metodología para proporcionar datos analíticos útiles. Este es un valor de opinión en el cual los parámetros de resolución del método son comparados con los requerimientos para los datos analíticos, obviamente un método que es válido en una situación podría ser inválido en otra. Por lo que el requerimiento de datos estable es un prerrequisito de datos para realizar la selección del método y la validación.

### IV.3.3 Validación de un método

Cuando es necesario puede verificarse las características del desempeño de la validación de un método y saber si son las adecuadas para su uso en la resolución de un problema analítico en particular. La validación de un método es importante en lo siguiente:

- Desarrollo de un método nuevo para resolver un problema.
- Revisión de un método establecido para incorporar mejoras o ampliar su aplicación a un nuevo problema.
- Cuando el control de calidad indica que un método establecido está cambiando a través del tiempo.
- Un método establecido usado por primera vez en un laboratorio ( diferente ) o con diferentes analistas o instrumentos de laboratorio.
- Para demostrar la equivalencia entre dos o más métodos ( el nuevo y el normal o revalidación ). ( 6 )



### IV.3.4 Proceso de validación

El proceso de validación verifica que la metodología esté basada sobre principios técnicos firmes y que han sido reducidos a la práctica para propósito de medición prácticas. Tanto la necesidad de validar la metodología como el procedimiento a seguir son materia de juicio profesional. La validación puede ser general o especificada. ( 7 )

### IV.3.5 Validación general

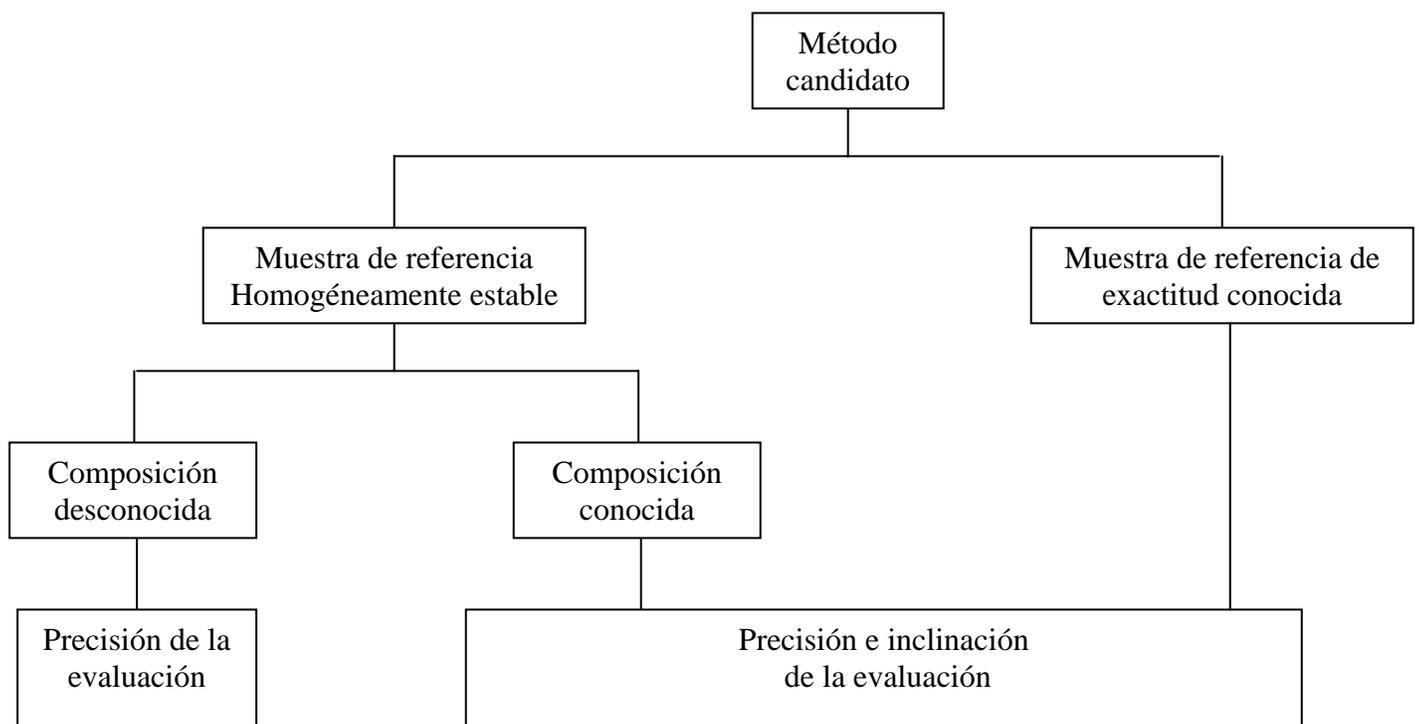
La validación de las técnicas de medición dependen de la elucidación de los primeros científicos sobre los cuales ellos están basados, tales resultados de validación para la investigación de la comunidad científica y su solidez es evaluada por revisión, la mejor comprensión de los principios de medición pueden extender su alcance y mejorar la calidad de su uso.

Los métodos surgen como resultado de una investigación aplicada, típicamente por individuos que conocen muy bien de las técnicas de medición. La comprobación de los métodos en situaciones prácticas típicas juega un papel clave, tanto en el proceso de desarrollo como en el de la validación.

Los procedimientos son desarrollados para el uso final de los métodos en situaciones analíticas prácticas. El usuario del laboratorio necesita más detalles experimentales que están contenidos en reportes de investigación publicados de un método, para utilizarlos en aplicaciones prácticas. Cuando un método gana un uso extensivo el usuario puede decidir que éste necesite ser estandarizado.



Un proceso de revisión completo incluye ensayos colaborativos en los cuales los materiales de prueba estable típicos son analizados para verificar la utilidad del procedimiento y para identificar tanto la debilidad técnica como editoriales.



**Figura 1.** Proceso de Prueba colaborativa

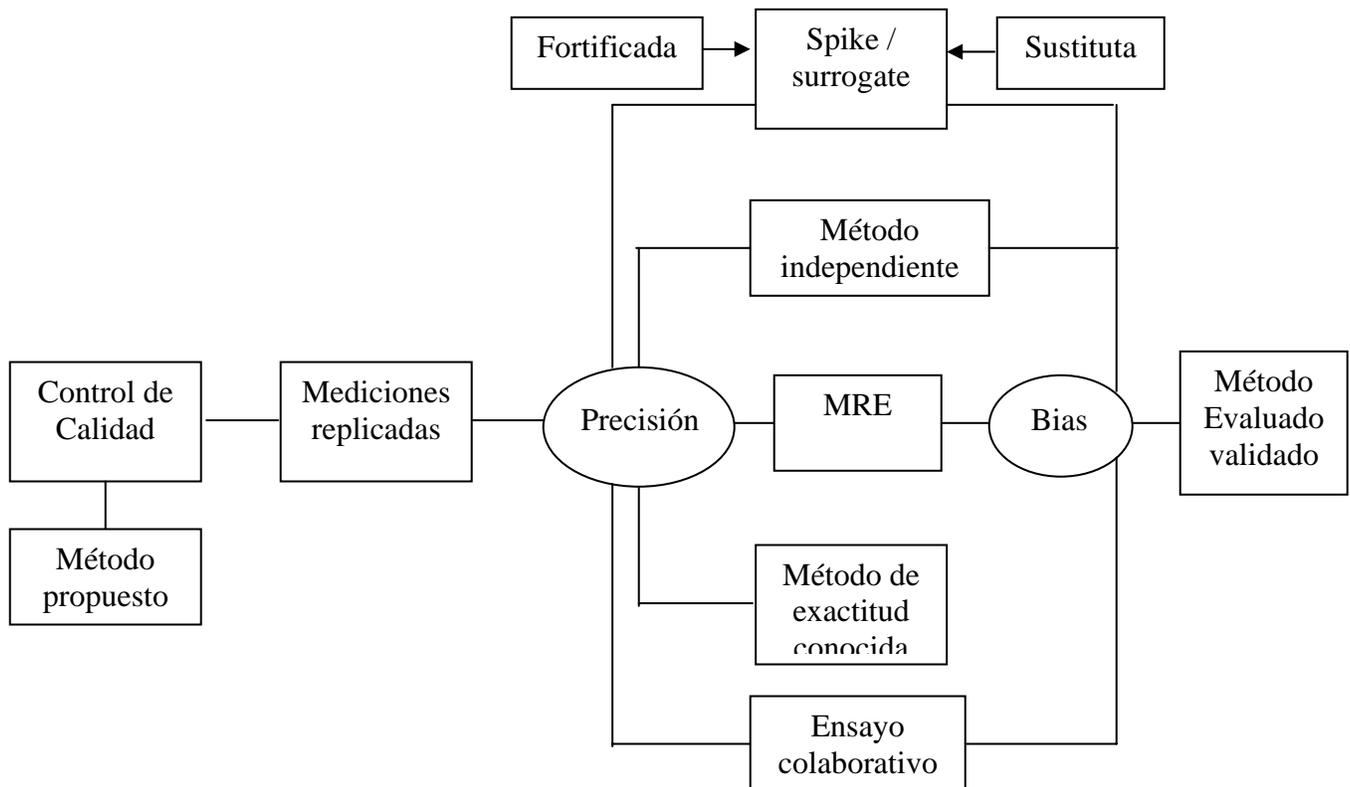


Si la composición de la muestra de referencia es conocida, su precisión y su desviación tanto a nivel intra o inter laboratorio pueden ser evaluadas, si un método de exactitud conocida está disponible, el ensayo colaborativo puede consistir de su comparación con el método propuesto en cualquier caso tanto la precisión como la desviación pueden ser evaluadas. Un protocolo es prescrito por Fiat de una organización que requiere un tipo específico de medición. Presumiblemente resulta de una decisión inteligente basado en el proceso de validación de la organización o de otros. Esto puede consistir de un ensayo colaborativo extenso o la publicación de protocolo propuesto para comentario público.

Desafortunadamente el juicio científico ha estado invalidado ante la ausencia de protocolos defectuosos e invalidados. Los protocolos que han sido especificados en un arreglo contractual pueden escoger arbitrariamente a través de un proceso de selección bien concebido. La verificación de su validez para su uso específico debe ser de primera consideración. ( 7 )

#### **IV.3.6 Validación para uso específico**

El uso final de la metodología analítica es producir información sobre la composición de las muestras específicas necesarias para la solución de un problema en particular desde una investigación exótica hasta una profana. El proceso de validación clásica se ilustra en la Figura 2.



**Figura 2.** Proceso general para la metodología



Cuando se dispone de muestras de referencia y que es similar en todos los aspectos a las muestras de prueba, el proceso es muy simple: consiste en el análisis de un número significativo de muestras de referencia y comparando los resultados que se esperan o valores certificados. Antes o durante la práctica, el analista debe demostrar la habilidad del estado del control estadístico del sistema de medición para que los resultados puedan ser realizados sobre otros, representativos a aquellos esperados cuando se utiliza en la metodología de un sistema de medición.

Cuando no se dispone de un material de referencia apropiado, se pueden utilizar otras técnicas, una de ellas consiste en la comparación de los resultados del método propuesto con aquellos otros métodos conocidos sean aplicables y confiables pero no útil en la situación real debido al costo indisponibilidad del personal, equipo u otras razones.

Las muestras llamadas “spiked” (fortificada con el analito) y “sugorrated” pueden ser usadas como muestras de referencia. Esta técnica es menos deseable y menos satisfactoria debido a la dificultad en la preparación confiable de las muestras y debido a la artificialidad añadida de materiales tales como “spiked” y “sugorrated” que pueden exhibir diferentes efectos de matrices a aquellas de las muestras naturales.

La división de las muestras reales de ensayos pueden ser utilizadas para evaluar la precisión de un método o procedimiento, pero ellas no proporcionan información acerca de la presencia o magnitud de la exactitud (sesgo) de la medición.



Otra técnica consiste en hacer mediciones de materiales de referencia análogos pero de diferentes orígenes. Se necesita un análisis crítico del analista para decidir la validez de la interferencia.

En todos los casos pruebas suficientes pueden hacerse para evaluar la metodología de una variedad de matrices y rangos de composición esperada dentro del proceso de medición. Comúnmente debería incluir tres niveles de concentración, es decir, los extremos y el rango medio de composición esperada. Las consideraciones estadísticas sugieren que al menos seis grados de libertad (ordinariamente siete mediciones) deberían de estar involucrados en cada punto de decisión. ( 7 )

#### **IV.3.7 Desarrollo del método**

Puede tomarse diferentes formas:

- en un extremo, puede significar adaptar un método existente, realizando cambios menores, de tal manera que sea adecuado para la nueva aplicación.
- en el otro extremo el químico analista podrá comenzar desde unas ideas en borrador y aplicar la experiencia para establecer un método adecuado, al punto de que podría involucrar una innovación significativa. ( 6 )



## ***IV.4 Parámetros de desempeño del método y su significado***

### **IV.4.1 El método de adición patrón**

Uno de los principales problemas en las determinaciones de los analitos en las muestras es el efecto de matriz, la cual se define como las interferencias de los diferentes componentes de la muestra en la determinación del componente principal. Esto significa que la señal detectada será una respuesta no solamente del componente principal (o analito) sino debido a otros componentes de la matriz.

El efecto matriz puede aumentar o disminuir la señal verdadera, lo que trae como consecuencia un error sistemático en la determinación analítica. Para minimizar las interferencias de la matriz, se ha implementado la curva de calibración por adición patrón.

( 8 )

### **IV.4.2 Adición Patrón**

Para ganar seguridad en la utilización de las rectas de calibrado, o sea, de la correcta similitud en el comportamiento de patrones y problemas, es aconsejable el método de la adición estándar.

Las dudas suelen plantearse en los problemas analíticos complejos o para las muestras con matrices difícilmente reproducibles en los patrones, cual es el caso de alimentos, muestras biológicas o del medio ambiente y evidentemente cuando concurren las dos circunstancias. La duda surge al no disponer de muestras de la misma matriz pero sin contaminación del metal, para utilizarla en la preparación de los patrones de calibración.



Una solución es preparar los patrones con la misma muestra. Para ello se toman varios volúmenes iguales de la disolución a analizar , añadiendo a algunas de ellas cantidades perfectamente conocidas de la especie química a determinar y todas las alícuotas se enrazan al mismo volumen. Con ello se dispone de una serie de preparaciones que contienen, además de la cantidad problema (no conocida) , las cantidades adicionadas, incluyendo la adición cero y valores que cubren el margen de la linealidad. El método de las adiciones se apoya en dos premisas no siempre válidas; una es suponer que en el sistema analítico los patrones adicionados se comportan de la misma forma que lo hace la sustancia contenida en la muestra, pues no podemos asegurar que correspondan a la misma especie o combinación química (estado de oxidación o de complejación, etc.). otra suposición es que la relación señal – concentración mantiene la misma función lineal (concretamente la misma pendiente) fuera del margen calibrado, pues se deduce la concentración por extrapolación. Si con el método de la adición patrón se detecta interferencia, se recomienda modificar las condiciones experimentales o utilizar modificaciones de matriz para eliminar o reducir al mínimo la interferencia. ( 9 )

#### **IV.4.3 Criterios de eficiencia**

Los criterios de eficiencia pueden clasificarse en primarios y secundarios.



### IV.4.3.1 Criterios primarios

#### IV.4.3.1.1 Precisión

Es una medida de que tan cerca están los resultados entre sí y usualmente se expresa por medio del valor de la desviación estándar, que describe la dispersión, o sea, describe el tamaño de los errores aleatorios.

#### IV.4.3.1.2 Exactitud o Bias ( sesgo )

Mide la magnitud de los errores sistemáticos

#### IV.4.3.1.3 Límite de Detección

Mide la cantidad mínima que puede diferenciarse de la señal del ruido de fondo. Es la concentración del analito que produce una señal que es tres desviaciones estándar mayor que la del blanco.

$$LD = ( 3.29Sb_0 - b_0 ) / b_1$$



Uno de los puntos característicos de la recta de calibrado es la señal para la concentración cero, que puede tener diferentes significados si corresponde a la medida realizada sobre los reactivos sin la muestra (prueba en blanco de los reactivos). O bien, se realiza sobre la muestra sin alguno de los reactivos esenciales (prueba en blanco de la matriz de la muestra). Las explicaciones que pueden darse a la desviación desde cero hacia valores positivos o negativos de la señal para las pruebas en blanco, constituyen un buen índice del grado de conocimiento que el científico posee del procedimiento analítico.

Ambas señales e las pruebas en blanco suelen acumularse sobre las de la muestra, aunque de manera diferente a las señales de los patrones, por lo que es más prudente mantener estos valores en la representación de la recta de calibrado y sustraer el resultado de concentración del correspondiente a la prueba del blanco. La señal de la prueba en blanco también presenta errores experimentales y por lo tanto una dispersión de valores que afectan al límite de detección del procedimiento.

Así como la pendiente de la recta de calibrado es un índice de la sensibilidad del procedimiento analítico, la precisión de esta pendiente y la de la ordenada en el origen establecen el límite de detección, o sea la cantidad mínima de sustancia detectable cuantitativamente. El valor del límite de detección se establece con criterios de probabilidad de cometer error por asignar un valor a la señal de un blanco, o bien por asignar el valor del blanco (no detectable) cuando en realidad la muestra contiene cantidad significativa de sustancia. También aquí la estadística proporciona diversos modelos para establecer estos límites, según el grado de seguridad que desee alcanzar. En algunas técnicas instrumentales se llama “ruido de fondo” a la dispersión de la señal del blanco, estableciéndose como límite de detección la concentración que da una señal doble o triple respecto a la señal de fondo.



Es incorrecto utilizar expresiones como “no detectable”, “ausencia” o “0”, como resultado correspondiente a señales iguales a la prueba en blanco, siendo correcto decir que el resultado de una señal no diferenciable de la prueba en blanco es “inferior al límite de detección” cuyo valor se ha determinado previamente.

#### **IV.4.3.2 Criterios secundarios**

Los criterios secundarios son los que tienen influencia en los primarios.

##### **IV.4.3.2.1 Linealidad**

Describe el comportamiento entre la respuesta y la concentración a través del modelo de calibración (una desviación del modelo representa un Bias).

##### **IV.4.3.2.2 Rango**

Representa el intervalo ( niveles inferior y superior del analito ) en el cual la relación lineal u otro modelo de calibración utilizado es correcto.



#### **IV.4.3.2.3 Límite de Cuantificación**

Es la más baja concentración del analito que puede ser cuantificada con suficiente precisión y exactitud. También es definido , convencionalmente, como la concentración de analito que corresponde al blanco de la muestra, más 5, 6 ó 10 desvíos estándar de la media (del blanco), también se le conoce como “límite de determinación” .

#### **IV.4.3.2.4 Selectividad**

Este parámetro asegura que la señal medida no es influenciada por otras sustancias presentes en la muestra y en caso contrario, garantiza la remoción de las mismas, otro aspecto importante de la selectividad es si el analito puede existir en la muestra de una forma, tal como enlazado o libre, inorgánico u órgano - metálico, o en diferentes estados de oxidación.

#### **IV.4.3.2.5 Sensibilidad**

Es el parámetro que mide la magnitud del cambio en la función de respuesta (o señal) con la concentración y corresponde a la pendiente de la curva de respuesta.



### ***IV.5 Evaluación de la incertidumbre***

En la “Guía para la expresión de la incertidumbre de las mediciones” (GEUM, por sus siglas en inglés) de la Organización internacional para la normalización (ISO)[15]. Se dan métodos prácticos para determinar, calcular y reportar la incertidumbre de las mediciones de una manera clara.

Es importante notar que hasta el presente, cualquier medición realizada por un científico ha tenido un error y lo será así en el futuro. Se hace necesario tener un método normalizado para describir y reportar la calidad de los datos procedentes de las mediciones. Esta técnica esta basada en dos principios:

Primero: La contribución a la incertidumbre puede ser estimada ya sea por observación del experimento repetido o por otros medios : por ejemplo usando datos tales como la incertidumbre de los materiales de referencias publicados o el juicio profesional.

Segundo: Separar la contribución no obstante evaluada, son expresadas en forma de varianzas y cuando es necesario combinadas como tales.

La implementación de estos principios desarrollados en el GEUM real en un modelo cuantitativo del sistema de medición, típicamente acuerpado en una ecuación matemática que influyen todos los factores de entradas relevantes (factores de influencia). La incertidumbre general luego es estimada vía la propagación de la incertidumbre. La ley referida es para usar los principios de propagación del error usualmente. La expresión general es:



$$U[Y_{[X_i, X_j, \dots, X_n]}] = \sqrt{\sum_{i=1, n} \left[ \frac{\delta y}{\delta x_i} u(x_i) \right]^2 + \sum_{i, k=1, n-i \neq k} \left[ \frac{\delta y}{\delta x_i} \frac{\delta y}{\delta x_k} s(x, ik) \right]}$$

Donde el resultado  $Y ( X_{ij}, \dots )$  es una función de  $n$  parámetros  $X_i, X_j, \dots$ ,  $u ( Y \dots )$  su incertidumbre estándar,  $U ( X_i )$  la incertidumbre asociada con  $X_i$ ,  $\delta y / \delta x_i$  es la diferencia parcial con respecto a  $X_i$  y  $S ( x, ik )$  es la covarianza entre  $X_i$  y  $X_k$ . El término de la covarianza no se aplica cuando los efectos son independientes esto es,  $S ( x, ik ) = 0$ . Es por consiguiente esencial y eficaz estudiar todos los efectos relevantes individuales sobre los resultados esta técnica será referida en este informe como ley de propagación de incertidumbre. ( 10 )

#### IV.5.1 Incertidumbre de medición

Es el parámetro asociado al resultado de una medición que caracteriza la dispersión de los valores que pudieran ser razonablemente atribuidos a la magnitud a medir.

#### IV.5.2 Incertidumbre estándar

Es la incertidumbre del resultado de una medición expresado como una desviación estándar.



### IV.5.3 Incertidumbre estándar combinada

Es la incertidumbre estándar del resultado de una medición cuando este es obtenido de una combinación de valores de otras cantidades y es igual a la raíz cuadrada positiva de una suma de términos; estos términos son las varianzas o covarianzas de las otras cantidades, ponderadas de acuerdo a la variación del resultado de la medición con el cambio de estas cantidades.

### IV.5.4 Incertidumbre expandida

Es la cantidad que define un intervalo para el resultado de una medición, en el cual puede esperarse que se encuentre una fracción grande de la distribución de los valores que podrían ser razonablemente atribuidos al objeto medible. Esta se denota por  $U_e$  y se obtiene multiplicando la incertidumbre combinada ( $U_c$ ) por un factor de cobertura (  $K$  ).

(11)

$$U_e = K U_c$$

El factor de cobertura ( $K$ ) se escoge con base en el nivel deseado de confianza a ser asociado con el intervalo. En general  $K$  estará en el ámbito 2-3 correspondientes al nivel de confianza entre el 99%.



#### IV.5.5. Incertidumbre estándar relativa

Se denota por IER y se obtiene dividiendo la media de la incertidumbre combinada con respecto a la media poblacional de los factores multiplicado por cien.( 11 )

$$\%IER = \frac{\bar{U}}{\bar{X}} \times 100$$



## ***IV.6 MÉTODO POLAROGRÁFICO DEL ÁCIDO ASCÓRBICO***

El mejor intervalo de pH para el análisis polarográfico del ácido ascórbico es el comprendido entre 3 y 6 , a mayores valores de pH del ácido ascórbico se oxida muy rápidamente; por otra parte, en soluciones de mayor acidez presenta una curva poco aguda y por tanto no puede determinarse con exactitud; la adición de oxalato sódico protege la oxidación. ( 12 )

### **IV.6.1 Interferencias en el método.**

El ácido ascórbico al estar en contacto con el oxígeno del aire se oxida rápidamente y se convierte en ácido dehidroascórbico el cual no se determina por polarografía, debido a que interfieren otras reductonas, pero las ondas correspondientes pueden ser eliminadas por adición de formaldehído. Los haluros afectan notablemente la medida, especialmente cuando se trabaja a valores bajos de pH, sin duda el análisis polarográfico es menos exacto que la valoración oxidimétrica; sin embargo para el análisis de ácido ascórbico en fórmulas farmacéuticas complejas y en productos naturales la menor exactitud se contrarresta por su mayor especificidad; además la polarografía tiene la ventaja de una mayor sencillez de realización que los métodos fotométricos. ( 12 )



#### IV.6.2 Otros métodos utilizados en la determinación de ácido ascórbico

Los métodos clásicos par el análisis de vitamina C se basa en su fuerte poder de oxidación, que permite su determinación por volumetría oxidimétrica. El método de J. Tillmans, en el cual la vitamina se valora con 2,6–diclorofenol–indofenol, es el más utilizado desde hace muchos años para la valoración de la vitamina C. ( 12 )

Los siguientes métodos son de gran aplicación práctica para la valoración de vitamina C:

1. Valoración con cloramina-T 0.1N (sólo para preparados farmacéuticos que no contengan otras sustancias oxidables). ( 12 )
2. Valoración con solución de 2,6-diclorofenol-indofenol preparad a partir de comprimidos de este producto (apropiada para determinaciones aproximadas en la preparación de zumos vegetales; aplicable al control de producción de zumos, siempre que no se requiera una gran exactitud). ( 12 )
3. Valoración con solución de 2,6-diclorofenol-indofenol previo aislamiento del ácido ascórbico por cromatografía sobre papel, según Strohecker, Heimann y Matt (por ejemplo en alimentos). ( 12 )
4. Valoración del ácido ascórbico en presencia de ácido sulfuroso, en vinos, con solución de yodo (Kielhöfer y Aumann). (12 )



5. Determinación fotométrica con 2-nitroanilina diozoadada, según Mohr (en alimentos y muestras biológicas). ( 12 )
6. Determinación fotométrica del ácido ascórbico total (ácido ascórbico + ácido dehidroascórbico) por el método de la dinitrofenilhidrazina (aplicable a alimentos y muestras biológicas). ( 12 )
7. Análisis de la vitamina C total por purificación de la 2,4-dinitrofenilhidrazona del ácido dehidroascórbico por cromatografía en capa fina (en el caso de alimentos con gran contenido azucarado). ( 12 )
8. Método microfluorométrico en la determinación de vitamina C total. ( 13 )
9. Método fluorométrico semiautomatizado en la determinación de vitamina C total en alimentos. ( 14 )
10. Titulación voltamétrica – iodométrica de ácido ascórbico en frutas y vegetales frescos con detección del punto muerto y final de la titulación.( 15 )



## ***V PARTE EXPERIMENTAL***



## ***V.1 Determinación de Vitamina C por Polarografía Clásica***

### **V.1.1 Equipo y materiales**

- Analizador polarográfico

*Modular EG & G Princeton Applied Research ( PARC ) Model 264 A Polarographic Analyzer / Stripping Voltammeter.*

- Electrodo de Mercurio

*Perkin Elmer PAR 303 A SMDE*

- Registrador / ABB Goerz / ABB Metrawatt SE 120

*ABB / Asea Brown Boveri*

*4 – SBS ® A – 01*

- Magneto Agitador ( Magnetic Stirrer – Agitateur Magnetique)

*Vidra Foc, badajoz, 50/t.3093750.3093566,barcelona.5.*

- Balanza Analítica Electrónica, Sartorius

*H110 Handy serie 10301663*



- pH – metro Tacussel LPH230T
- Micro pipeta Finnpiette, volumen fijo 100µl
- Cilindro y regulador de gas de Nitrógeno
- 2 Balones aforados 100 ml, pyrex clase A
- Balón aforado 50 ml, pyrex clase A
- Balón aforado 10 ml, pyrex clase A
- Beaker 50 ml, pyrex clase A
- Beaker 250 ml, pyrex clase A
- Embudo de vidrio
- Papel filtro Whatman N.5
- Pipeta aforada 1 ml, KEBOLab, qualicolor
- Pipeta volumétrica 5ml, virology, BELLCO VIP
- Pipeta aforada 10 ml, KIMAX clase A



### V.1.2 Reactivos

- Ácido Ascórbico (  $C_6H_8O_6$  )
- Ácido Acético glacial
- Acetato Sódico G.R.
- Solución de Formaldehído al 35 por 100, en peso, G.R.
- Oxalato Sódico G.R.
- Hidróxido de Sodio (NaOH)



### **V.1.3 Procedimientos.**

#### **V.1.3.1 Preparación de Soluciones**

##### **V.1.3.1.1 Solución de Ácido Ascórbico estándar (10000 ppm):**

En una balanza analítica pesar 0.1 gr. de ácido ascórbico, agregarlos a un balón aforado de 10 ml, diluir con agua destilada hasta la señal de aforo.

##### **V.1.3.1.2 Solución de Ácido Acético 2 N:**

Medir 6.25 ml. de ácido acético glacial, agregarlos a un balón aforado de 50 ml y diluirlo con agua destilada hasta la señal de aforo.

##### **V.1.3.1.3 Solución de acetato Sódico 2 N:**

En una balanza analítica pesar 27.22 gr. de acetato sódico G.R , agregarlos a un balón aforado de 100 ml, diluir con agua destilada hasta la señal de aforo.

##### **V.1.3.1.4 Solución de Hidróxido de Sodio 0.1 N:**

Pesar en una balanza analítica 0.4 gr. de NaOH, agregarlos a un balón aforado de 100 ml y diluir con agua destilada hasta la señal de aforo.



#### **V.1.3.1.5 Electrolito Soporte:**

En un balón aforado de 100 ml, mezclar 15 ml de la solución de Ácido acético 2N con 75 ml de la solución de acetato sódico 2N y 1 ml de la solución de formaldehído, la mezcla resultante se diluye hasta la señal de aforo con agua destilada. La solución obtenida se satura con oxalato sódico y se filtra. El filtrado se emplea como electrolito de soporte y tiene un pH alrededor de 5.5.

#### **V.1.3.1.6 Preparación de la muestra cítrica:**

Se toman 5 ml del jugo cítrico a analizar (limón, naranja dulce o naranja agria) se diluyen con 5 ml del electrolito soporte, si el pH de la mezcla es inferior a 5.5 se ajusta a este valor mediante la adición gota a gota de una solución de NaOH 0.1 N.

#### **V.1.3.1.7 Preparación del Blanco:**

Se toman 5 ml de agua desionizada se diluyen con 5 ml del electrolito soporte, si el pH de la mezcla es inferior a 5.5 se ajusta a este valor mediante la adición gota a gota de una solución de NaOH 0.1 N.



### **V.1.3.1.8 Curva de Calibración Normal:**

Se prepararon seis blancos como en el procedimiento V.1.3.1.7 se realizaron adiciones de estándar de ácido ascórbico de 0, 200, 400, 600, 800 y 1000 ppm, se transfirieron a la celda electroquímica y se registraron los polarogramas.

### **V.1.3.1.9 Curva de Calibración por Adición Patrón:**

Se prepararon seis muestras cítricas como en el procedimiento V.1.3.1.6 se realizaron adiciones de estándar de ácido ascórbico de 0, 200, 400, 600, 800 y 1000 ppm, se transfirieron a la celda electroquímica y se registraron los polarogramas.



## ***VI RESULTADOS Y DISCUSIÓN***



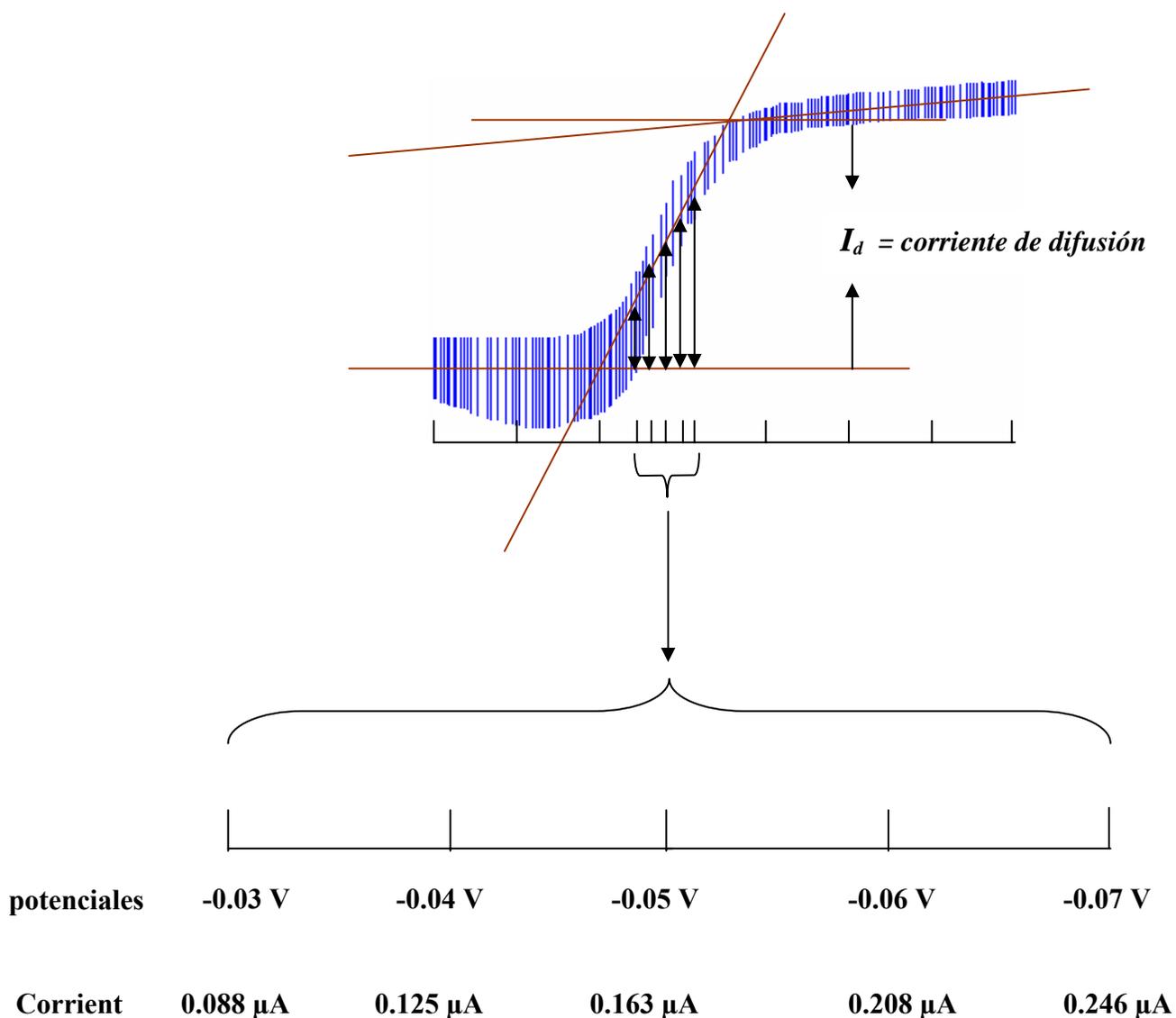
## ***VI.1 Selección del barrido de potencial en un rango óptimo para la determinación de vitamina C en diferentes cítricos***

Primero se realizó un barrido de potenciales únicamente utilizando electrolito soporte para observar si existen interferencias en el rango de análisis, este se seleccionó de tal manera que cubra el potencial de media onda del ácido ascórbico, luego se agregó un estándar de ácido ascórbico de 200 ppm y se realizaron lecturas de la corriente de difusión variando tanto el potencial inicial como el final, luego se seleccionó el potencial inicial y el final para el cual se obtuvo la mayor corriente de difusión del ácido ascórbico. Quedando establecido como rango óptimo para el análisis un potencial inicial ( $E_i$ ) = +0.10 Volts y un potencial final ( $E_f$ ) = -0.30 Volts.



## VI.2 Cálculo del Potencial de media onda.

Para esto se registró la onda polarográfica de un estándar de 1000 ppm la cual se muestra en la siguiente figura, luego se toman valores de potenciales cercanos al potencial de media onda y se mide la corriente correspondiente a cada uno de estos potenciales, y la corriente de difusión tal y como se muestra a continuación





Corriente de difusión ( $i_d$ ) = 0.302  $\mu$ A.

La ecuación que describe la forma de la onda polarográfica es :

$$E_{d.e} = E_{1/2} - \frac{0.0591}{n} \log \left[ \frac{i}{(i_d - i)} \right]$$

Donde:

$E_{d.e}$  = potencial del electrodo de gota de mercurio.

$E_{1/2}$  = potencial de media onda en Volts.

$n$  = numero de electrones involucrados con la reducción del ión.

$i$  = la corriente en un punto de la curva, en  $\mu$ A.

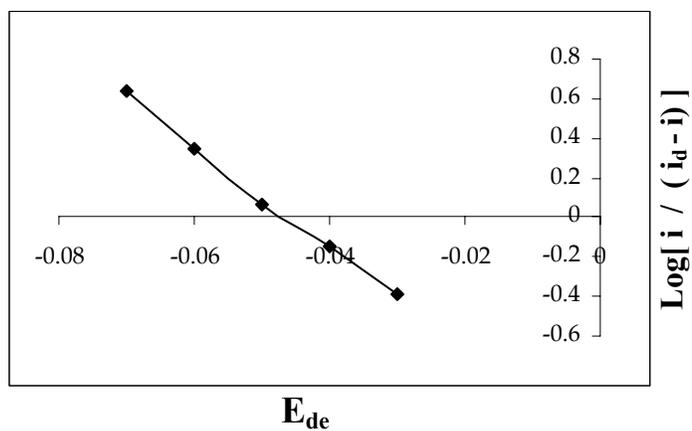
$i_d$  = Corriente limite de difusión en  $\mu$ A.

Esta ecuación corresponde a una línea recta ( $Y = a + bX$ ), así una gráfica de  $E$  contra  $\log i / (i_d - i)$  producirá una línea recta de esta manera el potencial de media onda puede ser determinado experimentalmente. Cuando el valor del término logarítmico se hace cero, la ecuación de anterior se hace  $E_{de} = E_{1/2}$  y el potencial de media onda es obtenido de la gráfica del punto en que la línea recta atraviesa la abscisa, tal y como se muestra en la figura 3.

**Tabla 1.** Datos para el cálculo de potencial de media onda

$E_{de}$	$[i / (i_d - i)]$	$\text{Log} [i / (i_d - i)]$
-0.03	0.088 / 0.215	-0.38796
-0.04	0.125 / 0.177	-0.13106
-0.05	0.163 / 0.140	0.066059
-0.06	0.208 / 0.094	0.344935
-0.07	0.246 / 0.056	0.642747

$$E_{1/2} = -0.048 \text{ Volts}$$

**Figura 3.** Potencial de media onda



### ***VI.3 Estudio de los parámetros de validación en la determinación de vitamina C (ácido ascórbico) en cítricos.***

#### **VI.3.1 Estudio de la repetibilidad del estándar de ácido ascórbico (1000 ppm)**

Para estudiar la repetibilidad del método se realizó la lectura de un estándar de ácido ascórbico de 1000 ppm, durante 10 días consecutivos. Se observó que es necesario preparar el estándar diariamente, debido a que se oxida rápidamente al estar en contacto con el oxígeno del aire y no es posible obtener una buena repetibilidad, esto se puede observar en los resultados de la tabla 1 del anexo.

**Tabla 2.** Datos de estándares preparados diariamente, Repetibilidad durante 10 días consecutivos. ( corriente en  $\mu\text{A}$  )

<b>Días</b>										
<b>Réplicas</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>
<b>1</b>	0.361	0.36	0.354	0.353	0.362	0.353	0.358	0.361	0.353	0.358
<b>2</b>	0.361	0.357	0.360	0.355	0.358	0.355	0.357	0.358	0.355	0.359
<b>3</b>	0.358	0.356	0.352	0.359	0.36	0.357	0.360	0.36	0.360	0.360
<b>4</b>	0.36	0.352	0.361	0.356	0.353	0.356	0.358	0.36	0.354	0.360
<b>5</b>	0.358	0.356	0.360	0.36	0.361	0.352	0.357	0.358	0.359	0.353
<b>6</b>	0.357	0.358	0.358	0.361	0.358	0.356	0.36	0.359	0.358	0.357



Se calculó el valor de  $M = 8.97 < X^2$ ; a un 95% de confianza igual a 67.50, como vemos el valor del parámetro M es menor que el valor de tabla de  $X^2$ , por tanto se puede concluir que no hay diferencias entre las varianzas es decir las varianzas son homogéneas.

Para comprobar si no hay diferencia entre las medias se realizó el análisis de varianza ANOVA de un factor, los resultados se muestran en la siguiente Tabla :

**Tabla 3.** Análisis de varianza ANOVA de un factor

Variación	Suma de cuadrados	GL	Cuadrática media
Modelo	0.000101531	9	1.13 E -05
Regresión	0.000308015	50	6.16 E -06

$$F_c = 1.83 > F \text{ de tabla } (F_{0.95}) = 2.04$$

Obteniéndose un  $F_c = 1.83$ , el cual resulta de dividir el valor de la cuadrática media del modelo entre el valor de la cuadrática media de la regresión, como este es menor que el valor de F de tabla  $(F_{0.95}) = 2.04$ , por tanto se puede concluir que no hay diferencias entre las medias.



Con los datos que se presentan en la Tabla 2, se realizó una carta de control para verificar la repetibilidad de la corriente de difusión de dicho estándar durante 10 días consecutivos, la cual se realizó tomando en cuenta la repetibilidad y la precisión intermedia. Los valores obtenidos son 0.00034467 y 0.00164506 respectivamente, los límites están dados por la fórmulas siguientes:

$$\text{Límite Central (LC)} \quad \frac{\sum \bar{X}_i}{10} = 0.3264$$

$$\text{Límite superior} \quad (\text{LC} + 3\text{S}) = 0.3314$$

$$\text{Límite superior} \quad (\text{LC} + 2\text{S}) = 0.3297$$

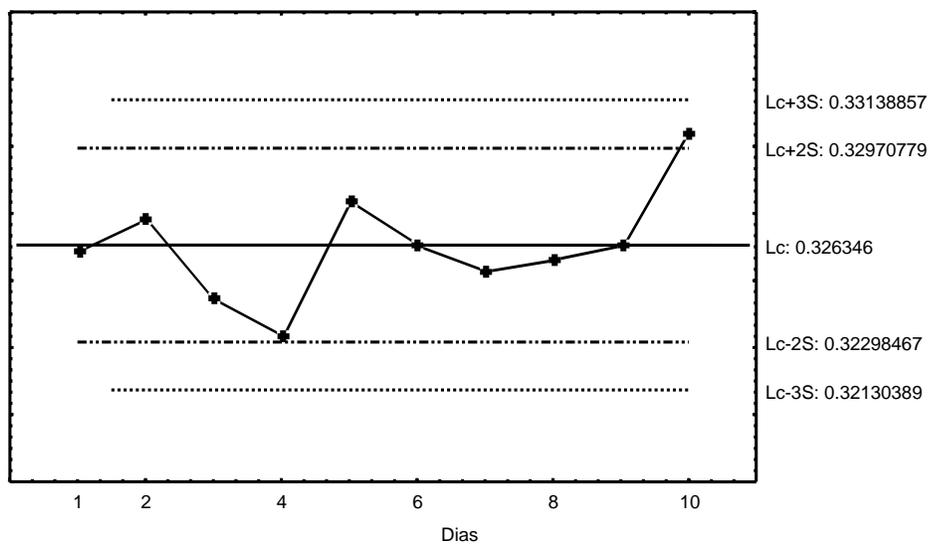
$$\text{Límite inferior} \quad (\text{LC} - 2\text{S}) = 0.3229$$

$$\text{Límite inferior} \quad (\text{LC} - 3\text{S}) = 0.3213$$

$$\text{Donde: } S = \sqrt{\bar{S}^2 + S_{\bar{X}_i}^2}$$

El valor de S es igual a 0.00168078

La Carta de control de calidad para el estándar de ácido ascórbico (1000 ppm), se puede observar en la Figura 4:



**Figura 4:** Carta de Control de calidad para el ácido ascórbico estándar (10000 ppm ). Los resultados obtenidos están dentro de los límites de la carta de control.



### VI.3.2 Linealidad

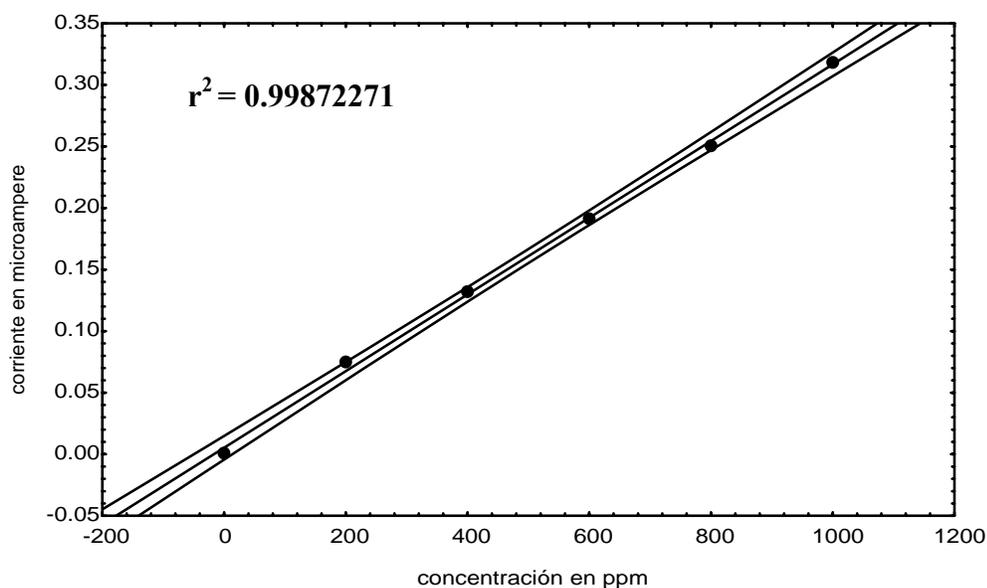
La linealidad del modelo está determinado por el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) el cual describe la fracción de la suma de cuadrados debido a los factores (del modelo) en relación a la suma de cuadrados de la media corregida. Para comprobar la linealidad se efectuó una curva de calibración normal durante 7 días consecutivos utilizando un estándar con un intervalo de concentraciones entre 0 y 1000 ppm de ácido ascórbico. Los datos se muestran en la tabla 4.

**Tabla 4.** Datos del promedio de las curvas de calibración normal durante 7 días consecutivos.

Concentración de estándar de ácido ascórbico en ppm	$\bar{I}_p$ en $\mu A$
0	0
200	0.07394286
400	0.13184286
600	0.19102857
800	0.25102857
1000	0.31797143



Para construir la curva de calibración se tomaron los promedios de valores de los  $I_p$  de cada día correspondiente a la concentración fijada. El valor del coeficiente de determinación ( $r^2$ ) obtenido fue: 0.99872271, una linealidad ideal indica un valor de coeficiente de determinación igual al 100% ( $r^2 = 1$ ), como el valor de  $r^2$  obtenido experimentalmente es cercano a la unidad y se puede decir que existe una buena linealidad. La gráfica se muestra en la figura 5.



**Figura 5.** Gráfica del promedio de las curvas de calibración normal, durante 7 días consecutivos.



Para verificar la validez del modelo de regresión se realizó un ANOVA de un factor tomándose como criterio si el  $F_c > F$  tabla 95% de confianza, el modelo se ajusta a una línea recta. Obteniéndose los siguientes resultados:

**Tabla 5.** Resultados de ANOVA, control de calidad del modelo lineal.

Variación	Suma de cuadrados	GL	Cuadrática media
Modelo	0.067910116	1	0.067910116
Regresión	8.68519E-05	4	2.1713E-05

El valor de  $F_c$  se obtiene de dividir el valor de la cuadrática media del modelo entre el valor de cuadrática media de la regresión, obteniéndose:

$$F_c = 3127.63 > F \text{ tabla} = 7.71; 95\%$$

Por tanto se puede concluir que el modelo se ajusta a una línea recta.



Además de estudiar la linealidad de el promedio de las curvas de calibración normal durante 7 días consecutivos, se realizó un estudio a las curvas por adición patrón para cada cítrico, y así comprobar la linealidad de cada una de ellas.

En las figuras 6, 7 y 8, se presenta la linealidad de cada cítrico: limón, naranja dulce y naranja agria respectivamente, en cada una de las figuras se puede observar que existe muy buena linealidad para cada curva.

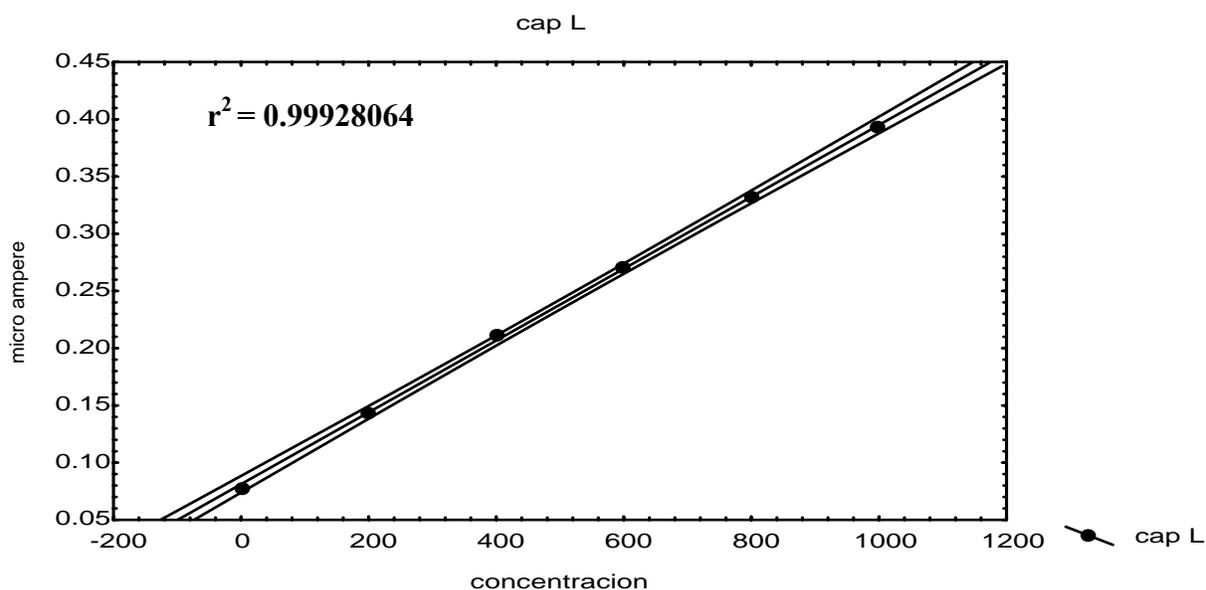


Figura 6. Gráfica de linealidad del Limón

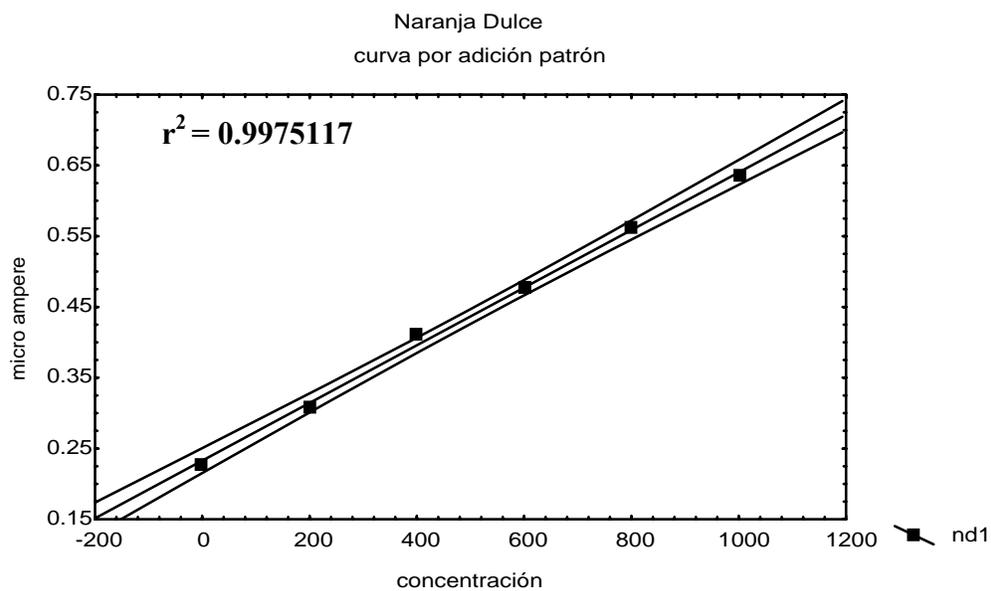


Figura 7. Gráfica de linealidad de Naranja Dulce

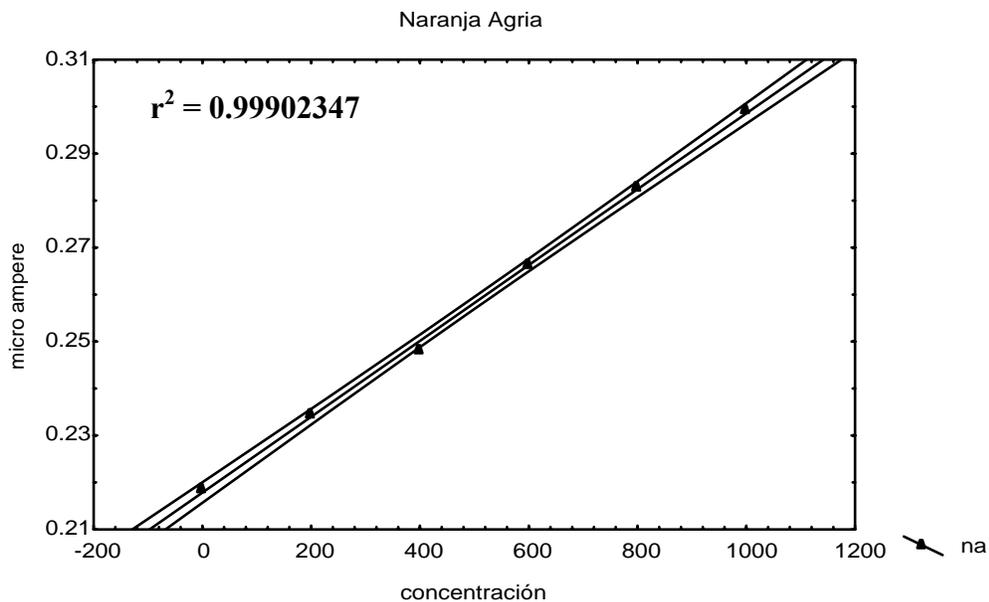


Figura 8. Gráfica de linealidad de Naranja Agria



### VI.3.3 Estudio de la repetibilidad de la curva de calibración normal

Para estudiar la repetibilidad de la curva de calibración normal se realizaron curvas de calibración normal durante 7 días consecutivos, los resultados obtenidos se encuentran en la Tabla siguiente. ( corriente en  $\mu\text{A}$  )

**Tabla 6.** Datos de la repetibilidad de la curva de calibración normal durante 7 días consecutivos.

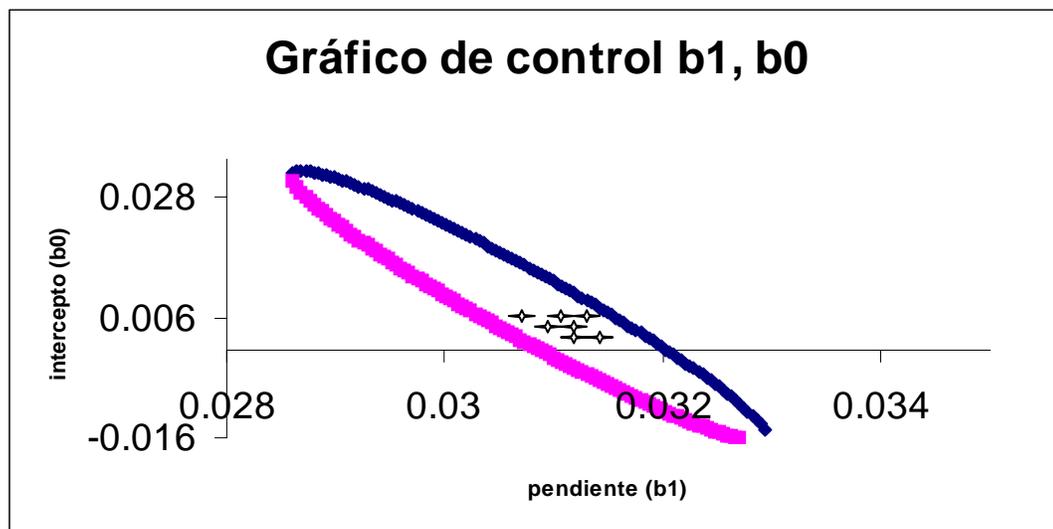
Ppm	Días						
	1	2	3	4	5	6	7
0	0	0	0	0	0	0	0
200	0.0729	0.0732	0.0733	0.0738	0.0755	0.0754	0.0735
400	0.1338	0.1328	0.1329	0.1345	0.1292	0.1287	0.131
600	0.195	0.1879	0.1972	0.187	0.188	0.1946	0.1875
800	0.2528	0.2467	0.2475	0.2529	0.2567	0.2475	0.2531
1000	0.32	0.315	0.321	0.3186	0.315	0.323	0.3132

Con los resultados obtenidos en la Tabla 6, se elaboró una carta de control donde se presentan los límites de tolerancia de los parámetros de regresión de las diferentes curvas de calibración . Los valores de los parámetros se encuentran en la Tabla 7.

**Tabla 7.** Parámetros de Regresión de las curvas de calibración normal.

Parámetros	Días						
	1	2	3	4	5	6	7
PENDIENTE	0.0003144	0.0003072	0.0003113	0.0003118	0.0003110	0.0003138	0.0003088
INTERCEPTO	0.0052095	0.0056524	0.0054191	0.0052191	0.0052048	0.0045905	0.005338
Coef. r2	0.9989144	0.9982085	0.997793	0.9982341	0.9982907	0.9974230	0.998725

Si tomamos en cuenta que los parámetros  $b_0$  y  $b_1$  están correlacionados, el modelo de correlación es una elipse por lo que se puede afirmar que el modelo de calibración mantiene sus parámetros siempre y cuando los puntos estén en los límites establecidos dentro de la carta de control. La carta de control de calidad de la curva de calibración normal se encuentra en la Figura 9.



**Figura 9.** Carta de control de calidad de la curva de calibración normal. Como se puede observar todos los puntos están dentro de la elipse lo que significa que existe muy buena repetibilidad en la curva de calibración normal al realizarlas en los 7 días consecutivos.



### VI.3.4 Estudio de la Exactitud del método

#### Efecto Matriz y Porcentaje de Recuperación

Las interferencias de los componentes de la matriz en las determinaciones analíticas constituyen uno de las principales causas que afectan la exactitud de los métodos, en la mayoría de los fármacos se conocen los componentes de la matriz y en estos patrones se preparan con todos estos componentes para minimizar los errores sistemáticos. En las muestras ambientales, en general presentan matrices complejas y el analista no puede determinar la contribución de cada uno de los constituyentes de la matriz en la respuesta del analito.

Cuando no es posible preparar los patrones con los componentes de la matriz, el método de adición es una buena técnica para minimizar el efecto matriz. El modelo clásico para evaluar este efecto es de comparar las pendientes de las curvas de calibración por adición patrón y las de calibración normal.

Para confirmar la exactitud del método se calculó el porcentaje de recuperación comparando las pendientes de una curva de calibración por adición patrón (AP) y la obtenida con estándares puros. Para el cálculo del porcentaje de recuperación se utilizó la expresión siguiente:

$$\% R = \left( \frac{b_1 AP}{b_1 CCNN} \right) * 100$$



Donde:

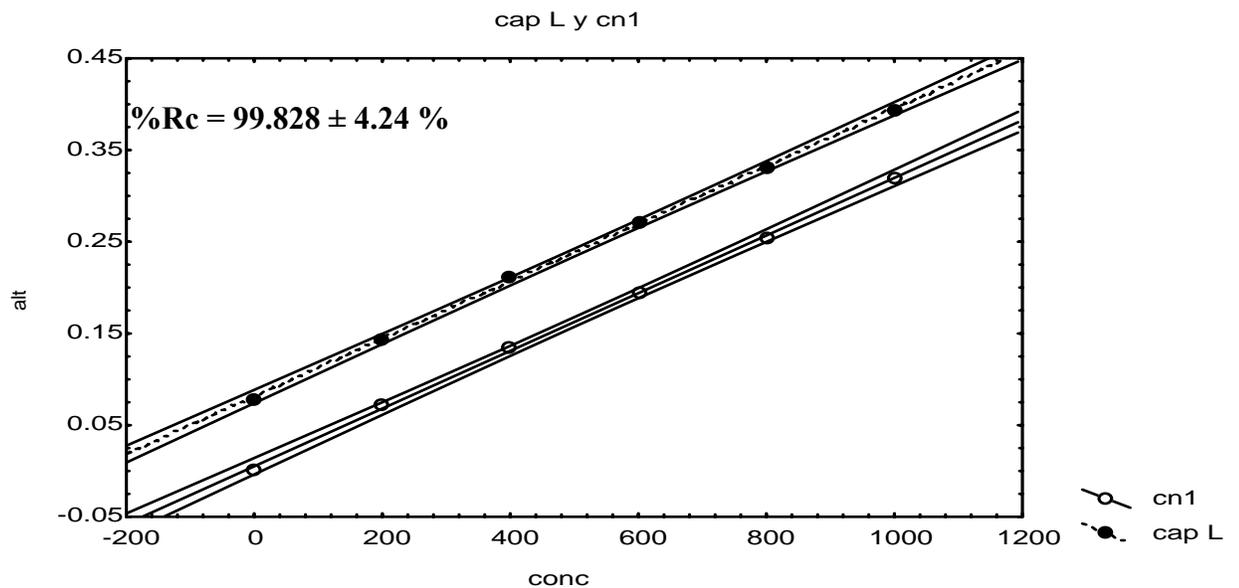
**b<sub>1</sub> AP:** Es la pendiente del modelo de regresión de la curva por adición patrón.

**b<sub>1</sub> CCN:** Es la pendiente del modelo de regresión de la curva de calibración con estándares puros ( calibración normal ).

En las Figuras 10, 11 y 12 se puede observar el porcentaje de recuperación obtenido y el efecto matriz de cada cítrico analizado. Los datos utilizados de cada cítrico se encuentran en la tabla 8.

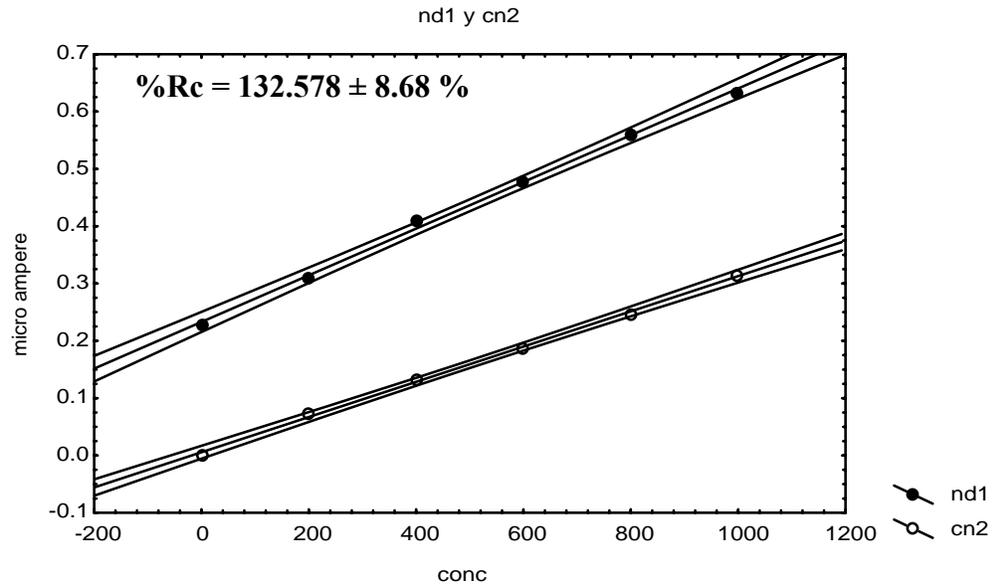
**Tabla 8.** Datos de cada cítrico para la elaboración de las curvas de calibración normal y curvas de adición patrón. Corriente en micro ampere.

Concentración ( ppm )	Curva de calibración normal			Curva de adición patrón		
	1	2	6	Limón	Naranja Dulce	Naranja Agria
0	0	0	0	0.0775	0.2283	0.2188
200	0.0729	0.0732	0.0754	0.1442	0.3092	0.2342
400	0.1338	0.1328	0.1287	0.2121	0.41	0.2483
600	0.195	0.1879	0.1946	0.2704	0.4771	0.2663
800	0.2528	0.2467	0.2475	0.3321	0.5608	0.2825
1000	0.32	0.315	0.323	0.3925	0.6342	0.2992
Pendiente	0.0003144	0.0003072	0.0003138	0.00031387	0.0004073	8.071E-05
Intercepto	0.0052095	0.0056524	0.0045905	0.0812	0.2329	0.2178
Coef. r <sup>2</sup>	0.9989144	0.9982085	0.9974230	0.99928064	0.9975117	0.99902347



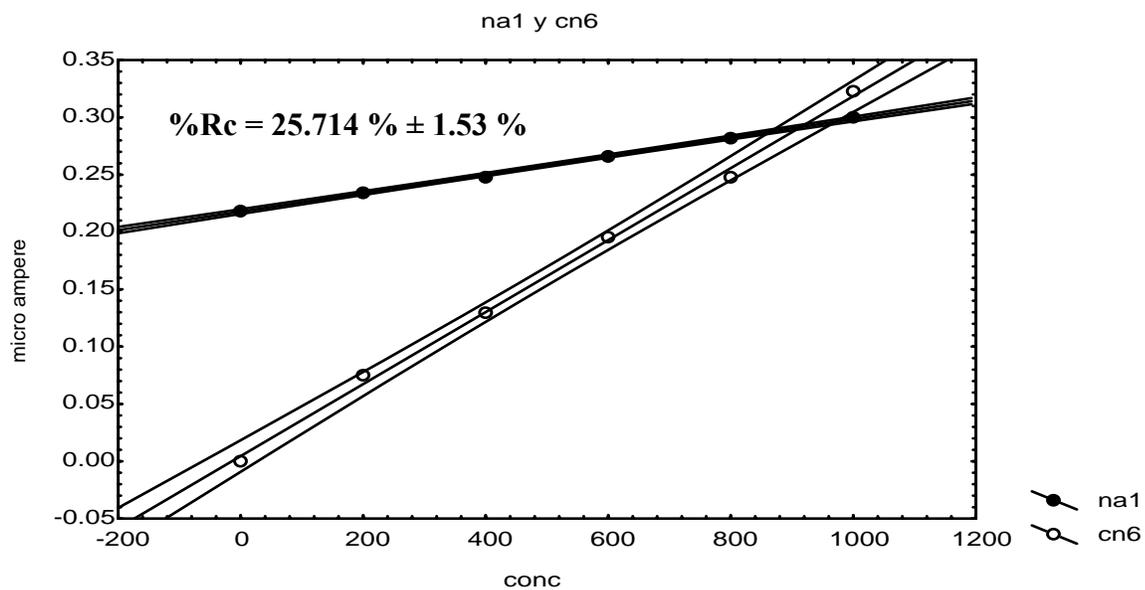
**Figura 10.** Gráfica del Porcentaje de Recuperación del Limón.

En la Figura 10, se puede observar que en la gráfica del porcentaje de recuperación de Limón no existe efecto matriz, % Rc del Limón es del 100% ( 99.8.28 % ) con una incertidumbre de  $\pm 4.24 \%$



**Figura 11.** Gráfica del Porcentaje de Recuperación de Naranja Dulce

La Figura 11, corresponde a la gráfica de el porcentaje de recuperación de la Naranja Dulce, se puede observar que existe efecto matriz, en este caso el efecto intensificador, el valor de el porcentaje de recuperación se pasa del 100 %, teniendo un valor de 132.578 % con una incertidumbre de  $\pm 8.68 \%$



**Figura 12.** Gráfica del Porcentaje de Recuperación de Naranja Agria

Se puede observar en la Figura 12, que en el porcentaje de recuperación de la naranja agria existe un efecto de matriz correspondiente a un efecto depresor con un valor de 25.714 % y una incertidumbre del  $\pm 1.53 \%$



### VI.3.5 Límite de Detección y Cuantificación:

El límite de detección y cuantificación se determinó a partir del modelo de calibración a concentraciones diluidas cerca del blanco. Los datos para este modelo se encuentran en la Tabla 9.

**Tabla 9.** Datos de curva de calibración normal, Límite de detección y de cuantificación.

Ppm	Ip
0	0
50	0.0225
100	0.0433
150	0.0650
200	0.0858
250	0.1046

Se realizó un análisis de regresión lineal simple encontrándose el valor del intercepto ( $b_0$ ) = 0.00107143 y la desviación estándar de éste ( $S_{b_0}$ ) = 0.00081318; además se encontró la pendiente ( $b_1$ ) = 0.00041976.

$$LD = ( 3.29S_{b_0} - b_0 ) / b_1$$

$$LC = ( 10 S_{b_0} - b_0 ) / b_1$$

Valores obtenidos:

$$LD = 3.82 \text{ ppm} \text{ y } LC = 16.82 \text{ ppm}$$



### ***VI.4 Aplicaciones del método. Cálculo de la incertidumbre***

Se llevó a cabo el análisis de los cítricos estudiados ( Limón, Naranja Dulce y Naranja Agria ) siguiéndose el procedimiento V.1.3.1.9, obteniéndose los resultados siguientes:

Limón	48 mg / 100 ml $\pm$ 0.02 mg /100 ml
Naranja Dulce	55 mg / 100 ml $\pm$ 0.01 mg / 100 ml
Naranja Agria	39 mg / 100 ml $\pm$ 0.03 mg / 100 ml

El valor de la concentración se calcula a partir del modelo de regresión lineal simple  $y = a + bx$ ,

si hacemos  $y = 0$ ; y despejamos  $x$  obtenemos:

$$X = -a / b ;$$

donde  $x$  equivale a la concentración del analito. Por tanto la concentración será :

$$C = \left| -\frac{a}{b} \right|$$

aplicando los factores de dilución a la fórmula anterior se obtiene:

$$C_A = \left| -\frac{a}{b} \right| \frac{v_2}{v_1}$$

Ec (1) Ecuación para el cálculo de la concentración ( 16 )



Para evaluar la incertidumbre de ésta se utilizó la siguiente expresión (ver anexo)

$$C_{AA} = \sqrt{U_{C_A}^2 + U_M^2}$$

Donde:

$$U_{C_A} = \sqrt{\frac{U_{b_0}^2 + C_x^2 U_{b_1}^2 - 2C_x U_{b_0} U_{b_1} r_{(b_0, b_1)}}{b_1^2} + \left(\frac{U_{v_1}}{v_1}\right)^2 + \left(\frac{U_{v_2}}{v_2}\right)^2}$$

$$U_M = S_x = \frac{S_{x/y}}{b_1} \left\{ \frac{1}{n} + \frac{(\bar{y})^2}{b_1^2 \sum_i (x_i - \bar{x})^2} \right\}^{1/2}$$



## VII CONCLUSIONES

De los resultados anteriores se puede afirmar que en el método de polarografía clásica para la determinación de vitamina C en diferentes cítricos se han validado todos los parámetros propuestos.

Se encontró el rango de potenciales óptimos para la determinación de vitamina C en diferentes cítricos obteniéndose los valores de potencial inicial ( $E_i$ ) = + 0.10 Volts y potencial final ( $E_f$ ) = - 0.30 Volts y el potencial de media onda -0.048 Volts.

Se evaluaron los diferentes parámetros que caracterizan el desempeño del método encontrándose buena exactitud y linealidad en un buen rango de aplicación. La linealidad fue repetible durante siete días consecutivos, siguiendo la carta de control bidimensional intercepto – pendiente. Además se pudo comprobar que existe efecto matriz en los tres cítricos analizados. El límite de detección y de cuantificación encontrados fueron de 3.82 y 16.81 respectivamente. Se realizó el control de calidad de las curvas de calibración normal.

Se aplicó el método en el análisis de las muestras cítricas ( Limón, Naranja Dulce y Naranja Agria ), obteniéndose los valores de la concentración de ácido ascórbico (vitamina C) en mg/100 ml y además se calculó la incertidumbre para cada muestra, obteniendo valores aceptables en comparación con estudios previos.



## ***VIII. RECOMENDACIONES***

- ✓ Realizar el estudio de la Robustez del método.
- ✓ Aplicar el método de análisis a un mayor número de muestras de frutas cítricas y vegetales.



## ***IX BIBLIOGRAFÍA***

1. Daniel Harris. “Análisis Químico Cuantitativo”. Grupo Editorial Iberoamericano. Programas Educativos S.A. de C.V calz. Chabacano, N65 – local A, col. Asturias 06850, México
2. “Química Analítica General Cuantitativa e Instrumental”. Vol. 2. Editorial Paraninfo S.A. ( 1990 ).
3. Princeton Applied research ( analytical instrument division. Application note 122.
4. Margarita Watty B. “Química Analítica”. Departamento de Ingeniería y Ciencias Químicas. Universidad Iberoamericana ( 1989 )
5. Skoog Leary. “Análisis Instrumental”. 4<sup>ta</sup> edición
6. Jorge Chacón, “Curso teórico practico en aspectos técnicos del control de calidad interno del laboratorio de análisis”. CIRA / UNAN- Managua , ( 1999 ).
7. John K., Tylor, “Analytical Chemistry”. 55 ( 1983 ). 600A-608A.
8. Gustavo Delgado, “Principios de estadística y técnicas de validación”. Departamento de Química, Facultad de ciencias, UNAN-León, Nicaragua. ( 1999 ).



9. R.K Skogerbol. "Analytical Chemistry". 39 (1967 ). 1602-1390.
10. Stephen L.R Ellison Analyst. 123 (1998 ), 1387-1390.
11. Fernando Burriel Marti., Lucena Conde, "Aspecto técnico del control de calidad interno de laboratorio de análisis químico". ( 1990 ).
12. Rolf Strohecker – Heinz M. Henning, "Análisis de Vitaminas, Métodos comprobados", Editorial Paz Montalvo – Madrid, ( 1967 ).
13. Cunnif, Patricia, ed. "Official Methods of Análisis of AOAC international", 16a. ed – Arlington: AOAC international, 1995, v 1, Method 967.22, Chapter 45, p.17.
14. Cunnif, Patricia, ed. "Official Methods of Análisis of AOAC international", 16a. ed – Arlington: AOAC international, 1995, v 1, Method 984.26, Chapter 45, p.18.
15. Roxana A Verdini and Claudia M. Lagier, Voltametric iodometric titration of ascorbic acid with dead - stop end – point detection in fresh vegetables and fruit samples, Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias biológicas, Universidad Nacional de Rosario., Suipacha 531, 2000, Rosario, Argentina.
16. Manuel Vanegas Carvajal, "Validación del Método Voltamperométrico para la Determinación de plomo en muestras de Orina" ( Monografía ), Departamento de Química. Facultad de Ciencias. UNAN León, Nicaragua ( 2002 ).



*X ANEXOS*



**Tabla 1.** Datos de repetibilidad de el estándar de ácido ascórbico ( 1000 ppm ), preparado para varios días.

Días										
Réplicas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0.3421	0.3475	0.3675	0.2871	0.4063	0.33	0.3158	0.32	0.3242	0.4021
2	0.3283	0.3563	0.325	0.2479	0.3563	0.3229	0.2938	0.3146	0.33	0.4092
3	0.2975	0.3575	0.3229	0.2633	0.3413	0.3313	0.3021	0.3092	0.3175	0.4133
4	0.32	0.3604	0.3145	0.2508	0.3646	0.3396	0.3092	0.3229	0.3367	0.4075
5	0.3033	0.37	0.3433	0.2592	0.3521	0.3121	0.3033	0.3142	0.3283	0.4216
6	0.305	0.2883	0.3425	0.2533	0.3408	0.33	0.3158	0.3104	0.3241	0.4021

Para comprobar si no hay diferencia entre las medias se realizó el análisis de varianza ANOVA de un factor, los resultados se muestran en la siguiente Tabla :

**Tabla 2.** Análisis de varianza ANOVA de un factor

Variación	Suma de cuadrados	GL	Cuadrática media
Modelo	0.060365	9	0.006707
Regresión	0.023004	45	0.000511

$$F_c = 13.1205 > F \text{ de tabla } (F_{0.95}) = 2.04$$



Podemos concluir que existe un efecto significativo entre las medias es decir que las medias son heterogéneas.

Además se realizó el Test de Bartlett para verificar si existían diferencias significativas entre las varianzas, el valor de  $M = 65.16528$ ,  $X^2 = 16.92$  ; 95% , como el parámetro  $M$  es mayor que el valor de  $X^2$  podemos concluir que existen diferencias entre las varianzas.



### Curvas de calibración normal.

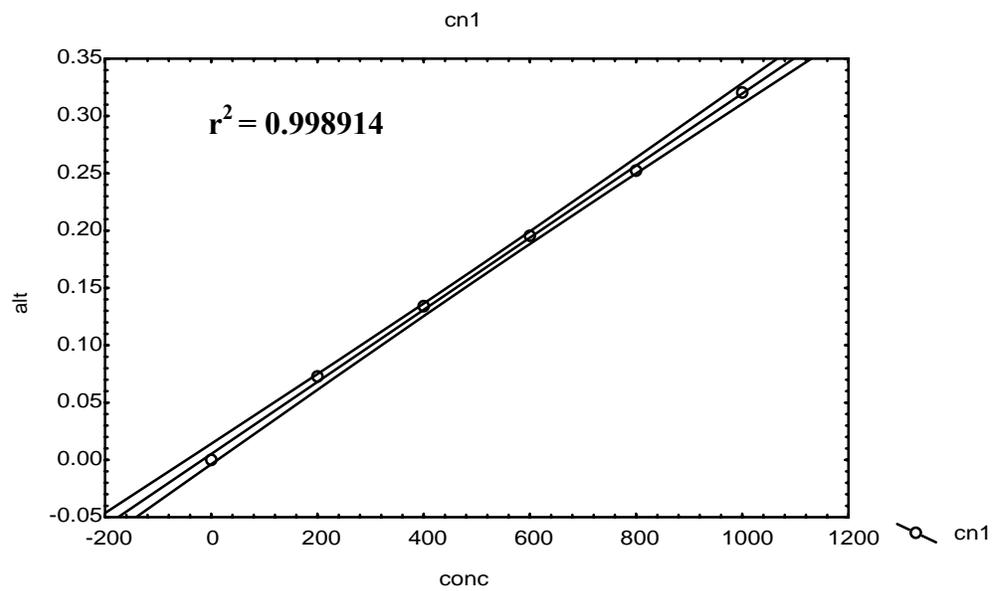


Figura 1. Curva de Calibración Normal 1

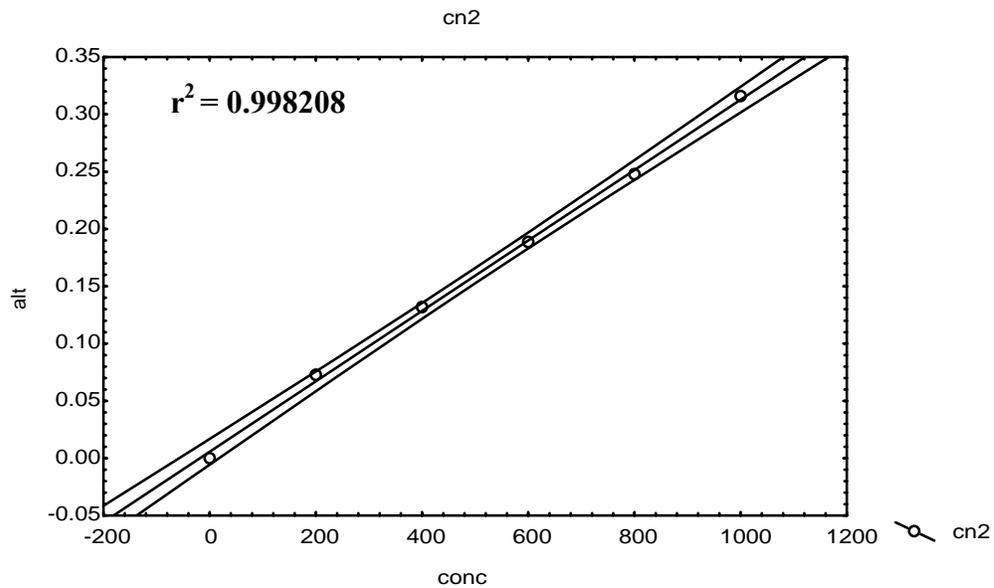


Figura 2. Curva de Calibración Normal 2

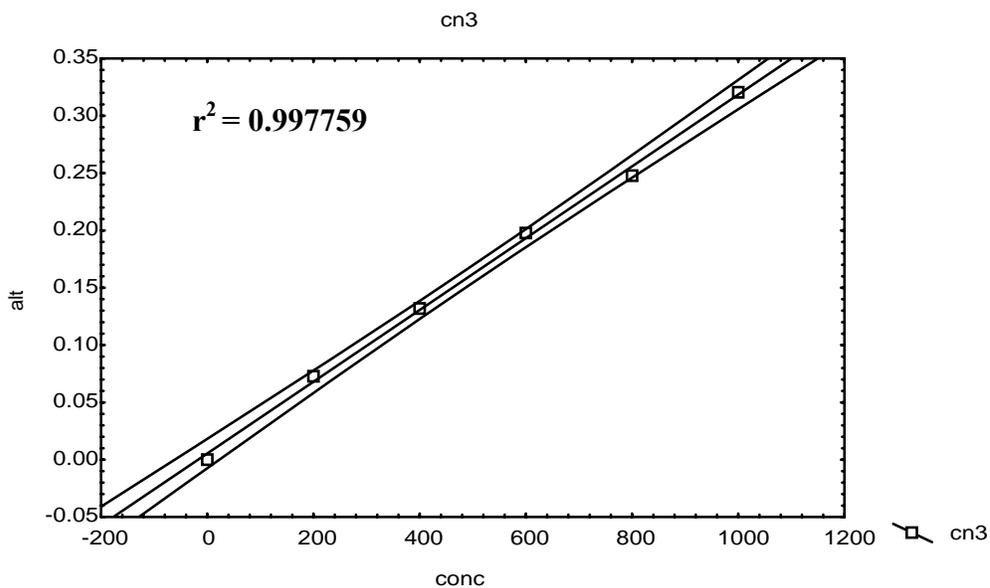


Figura 3. Curva de Calibración Normal 3

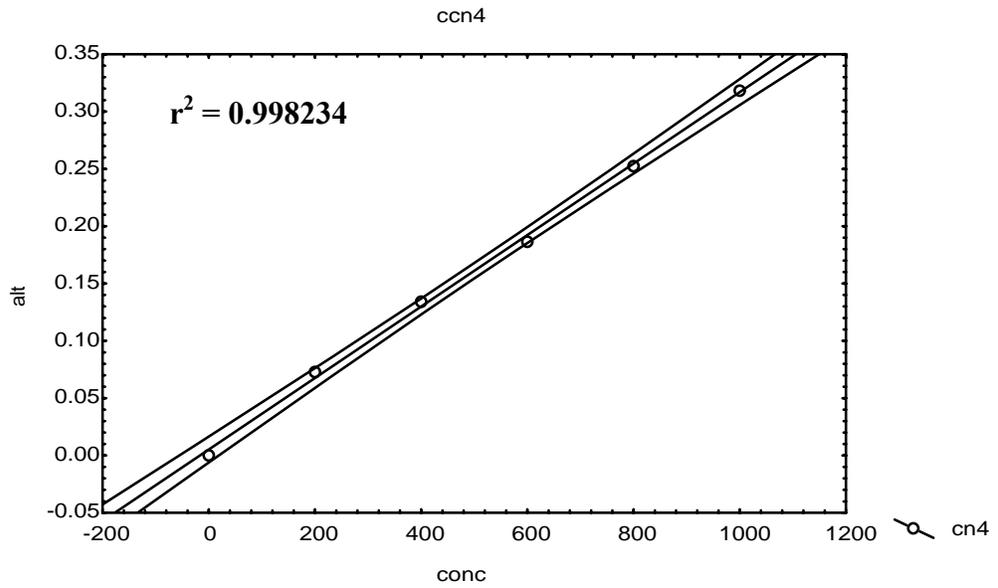


Figura 4. Curva de Calibración Normal 4

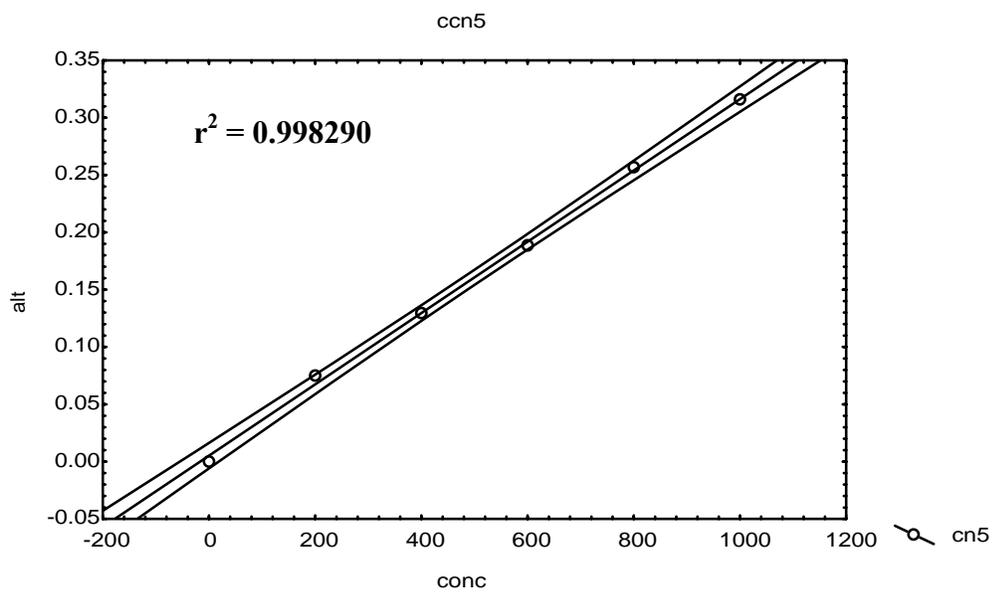


Figura 5. Curva de Calibración Normal 5

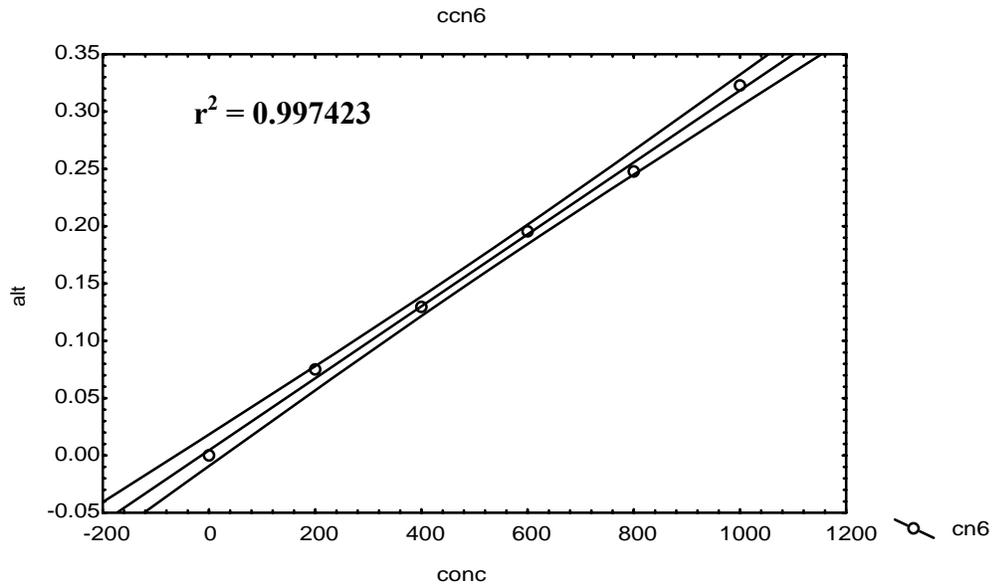


Figura 6. Curva de Calibración Normal 6

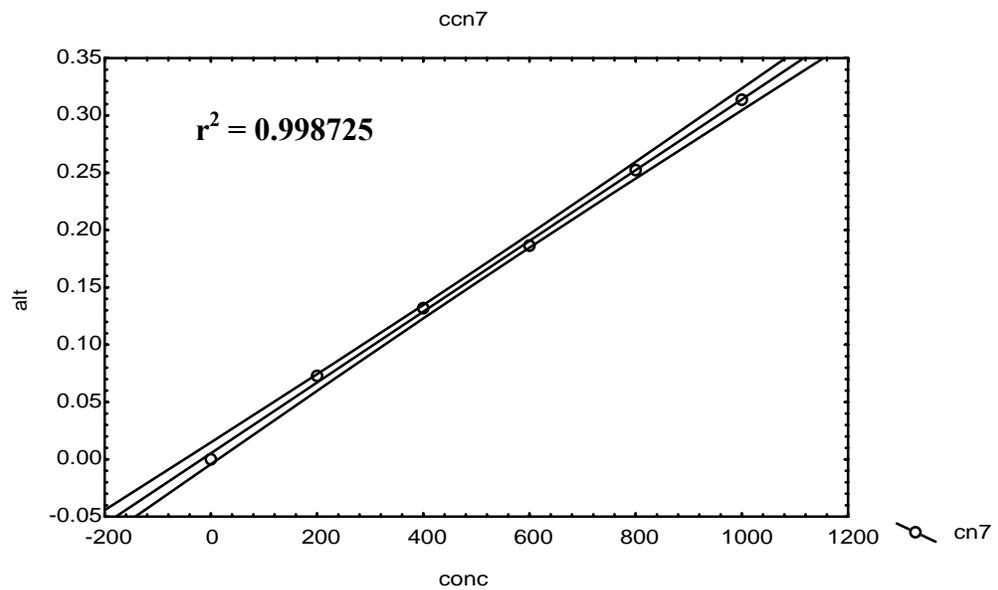
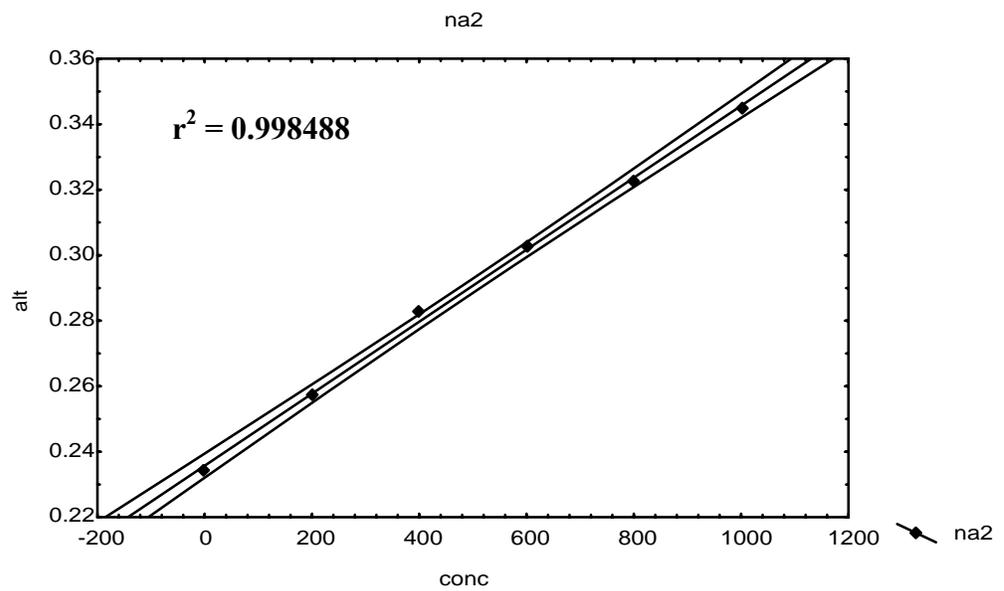


Figura 7. Curva de Calibración Normal 7



### Curvas de calibración por adición patrón para los diferentes cítricos



**Figura 8.** Curva de Calibración por Adición Patrón de la Naranja Agria

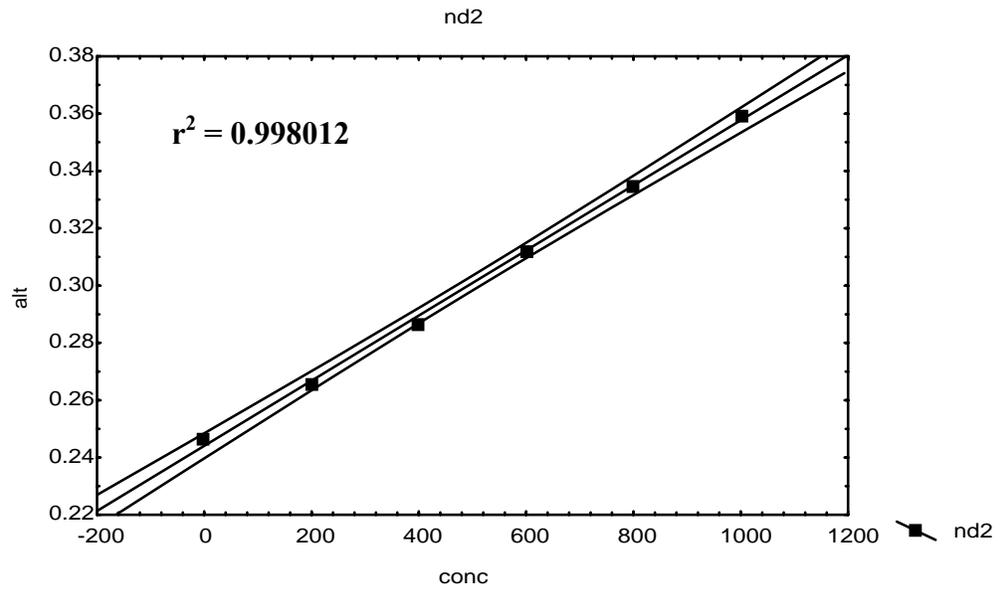


Figura 9. Curva de Calibración por Adición Patrón de Naranja Dulce 2

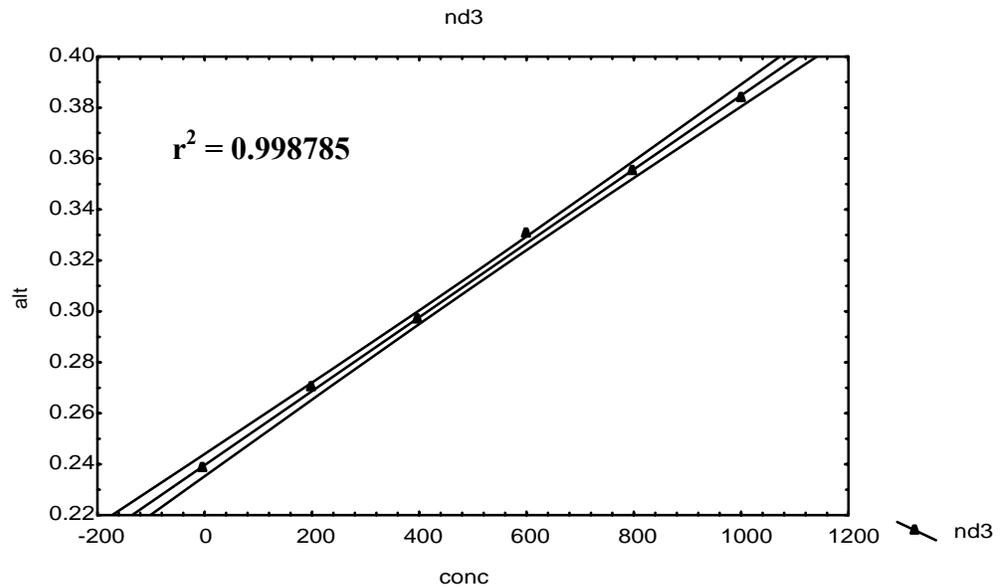


Figura 10. Curva de Calibración por Adición Patrón de Naranja Dulce 3

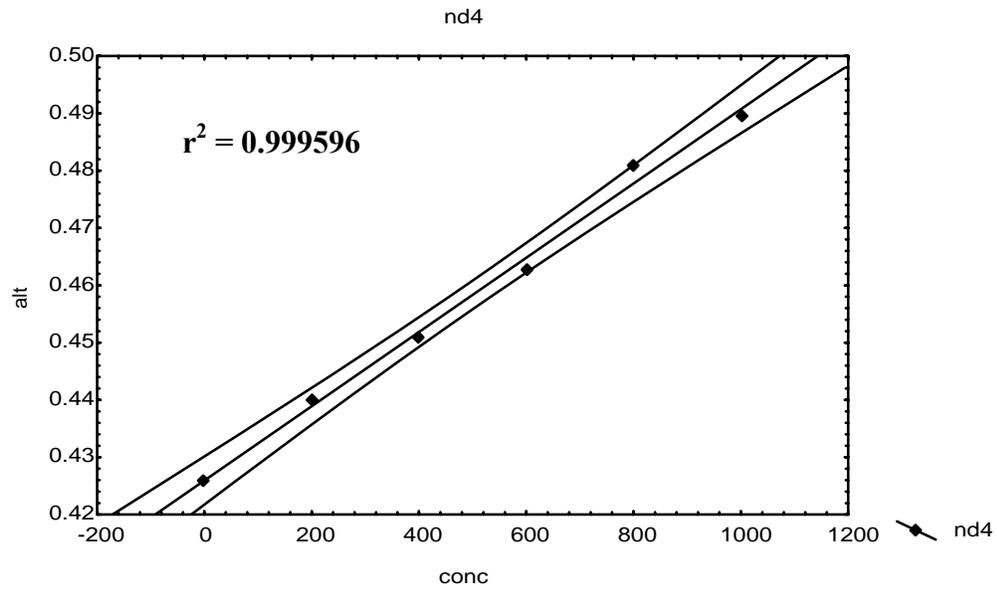


Figura 11. Curva de Calibración por Adición Patrón de Naranja Dulce 4

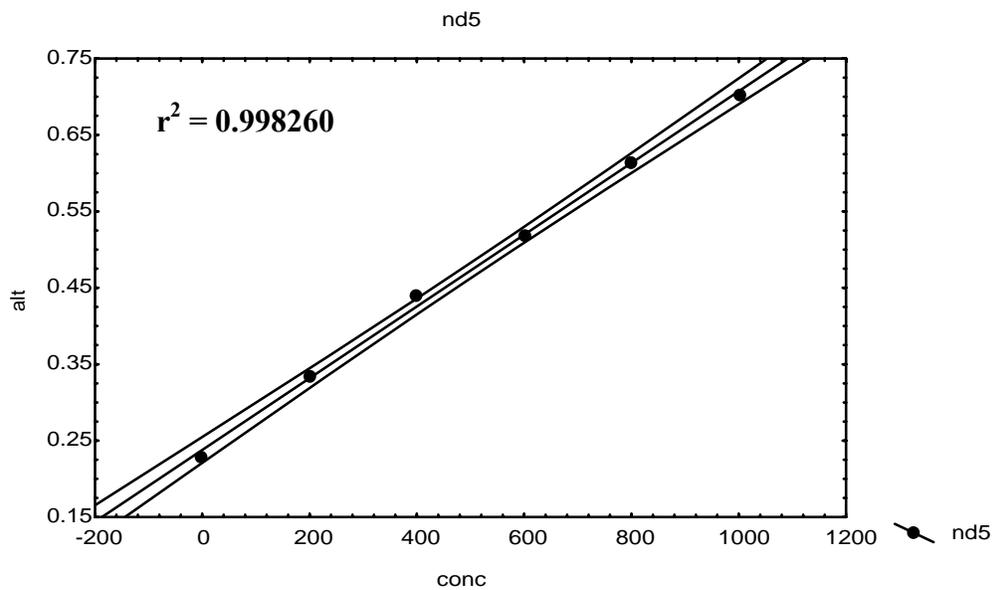
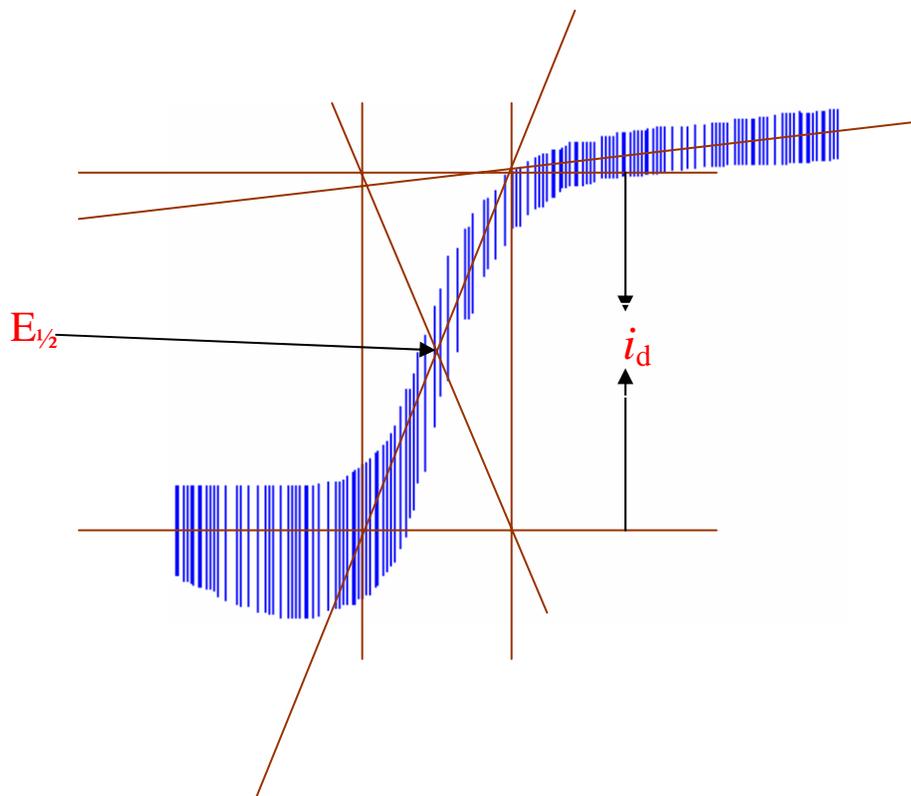


Figura 12. Curva de Calibración por Adición Patrón de Naranja Dulce 5



**Figura 13.** Polarograma del estándar de ácido ascórbico ( 1000 ppm )

**Potencial inicial (  $E_i$  ) = + 0.10 Volts.**

**Potencial final (  $E_f$  ) = - 0.30 Volts.**



## Deducción de ecuación para la incertidumbre en el cálculo de la concentración a partir de la curva de adición patrón

Modelo de regresión :  $i_x = b_0 + b_1 C_x$  ; Si hacemos  $i_x = 0$

$$C_x = \left| \frac{b_0}{b_1} \right| \quad (1)$$

Dado que el contenido de ácido ascórbico en la muestra se obtiene a partir de  $C_x$  y los efectos de dilución :

$$C_A = C_x \frac{V_2}{V_1} \quad (2)$$

Si introducimos aquí la ecuación (1) obtenemos:

$$C_A = \frac{b_0 v_2}{b_1 v_1}$$

De (1) tenemos que :  $\Delta C_x = \Delta \left( \frac{b_0}{b_1} \right)$

$$\Delta C_x = \frac{\Delta b_0}{b_1} - \frac{b_0 \Delta b_1}{b_1^2}$$



$$(\Delta C_x)^2 = \left[ \frac{\Delta b_0}{b_1} - \frac{b_0 \Delta b_1}{b_1^2} \right]^2$$

$$(\Delta C_x)^2 = \left( \frac{\Delta b_0}{b_1} \right)^2 - 2 \left( \frac{\Delta b_0}{b_1} \right) \left( \frac{b_0}{b_1^2} \right) \Delta b_1 + \left( \frac{b_0 \Delta b_1}{b_1^2} \right)^2$$

$$(\Delta C_x)^2 = \left( \frac{\Delta b_0}{b_1} \right)^2 - 2 \frac{\Delta b_0 \Delta b_1}{b_1^2} \left( \frac{b_0}{b_1^2} \right) + \left( \frac{b_0 \Delta b_1}{b_1^2} \right)^2$$

Dado que el intercepto y la pendiente están correlacionados se introduce el coeficiente de correlación  $(r_{(b_0, b_1)})$  en el termino covarianza.

$$\sum \frac{\Delta C_x^2}{n-1} = \text{Var}(C_x) = U_{C_x}^2 = \left( \frac{U_{b_0}}{b_1} \right)^2 + \left( \frac{b_0}{b_1^2} U_{b_1} \right)^2 - \underbrace{\frac{2U_{b_0} U_{b_1} r_{(b_0, b_1)}}{(b_1^2)}}_{\text{Covarianza}} \left( \frac{b_0}{b_1} \right) \quad (3)$$

Como  $\frac{b_0}{b_1} = C_x$  ; Sustituyendo en (3) tenemos :



$$U_{C_x}^2 = \left( \frac{U_{b_0}}{b_1} \right)^2 + \left( \frac{U_{b_1} C_{Pb}}{b_1} \right)^2 - \frac{2U_{b_0} U_{b_1} r_{(b_0, b_1)} C_{Pb}}{b_1^2}$$

$$U_{C_x}^2 = \frac{U_{b_0}^2 + C_x^2 U_{b_1}^2 - 2C_x U_{b_0} U_{b_1} r_{(b_0, b_1)}}{b_1^2} \quad (4)$$

Aplicando la ley de propagación del error a la ecuación (2) tenemos que:

$$U_{C_A}^2 = U_{C_x}^2 + \left( \frac{U_{v_1}}{v_1} \right)^2 + \left( \frac{U_{v_2}}{v_2} \right)^2$$

$$U_{C_A}^2 = \frac{U_{b_0}^2 + C_x^2 U_{b_1}^2 - 2C_x U_{b_0} U_{b_1} r_{(b_0, b_1)}}{b_1^2} + \left( \frac{U_{v_1}}{v_1} \right)^2 + \left( \frac{U_{v_2}}{v_2} \right)^2$$



Por tanto la incertidumbre será:

$$U_{C_A} = \sqrt{\frac{U_{b_0}^2 + C_x^2 U_{b_1}^2 - 2C_x U_{b_0} U_{b_1} r_{(b_0, b_1)}}{b_1^2} + \left(\frac{U_{v_1}}{v_1}\right)^2 + \left(\frac{U_{v_2}}{v_2}\right)^2} \quad (5)$$

La cual corresponde a la incertidumbre de la concentración de plomo en la muestra de orina. Dado a que ésta se calcula a partir de una curva de adición patrón tendremos una incertidumbre debida al modelo de regresión lineal la cual se calcula con la expresión siguiente:

$$U_M = S_X = \frac{S_{x/y}}{b_1} \left\{ \frac{1}{n} + \frac{(\bar{y})^2}{b_1^2 \sum_i (x_i - \bar{x})^2} \right\}^{1/2} \quad (6)$$

Por tanto la incertidumbre real de la concentración de ácido ascórbico será:

$$C_{AA} = \sqrt{U_{C_A}^2 + U_M^2} \quad (7)$$



### DISEÑO METODOLÓGICO

