

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA



**VALIDACIÓN DEL MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE ÁCIDO
ASCÓRBICO EN FÓRMULA PARA LACTANTES (LECHE EN POLVO) POR
POLAROGRAFÍA DIFERENCIAL DE IMPULSOS**

TESIS
PREVIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN QUÍMICA

PRESENTADA POR:
Br. DANILO ANTONIO FUENTES GUTIÉRREZ

TUTORES:
Dr. GUSTAVO DELGADO
Msc. FABIO JOSÉ PALLAVICCINI
Lic. MANUEL VANEGAS

LEÓN, NICARAGUA
OCTUBRE 2005

INDICE

I.	RESUMEN	1
II.	OBJETIVOS	2
III.	INTRODUCCIÓN	3
IV.	MARCO TEÓRICO	4
	IV.1 Generalidades sobre vitamina C	4
	IV.2 Propiedades físicas y químicas de la vitamina C	4
	IV.3 Efectos farmacológicos	6
	IV.4 Función bioquímica y molecular	7
	IV.5 Absorción y depósito	8
	IV.6 Disponibilidad para la ingestión	9
	IV.7 Efectos favorables del ácido ascórbico	10
	IV.8 Deficiencia	11
	IV.9 Toxicidad	11
	IV.10 Epidemiología	13
	IV.11 Requerimiento y recomendaciones diarias de vitamina C	14
	IV.12 Técnica analítica polarográfica utilizada	15
	IV.13 Validación de métodos analíticos	25
	IV.14 Evaluación de la incertidumbre	31
V.	PARTE EXPERIMENTAL	34
	V.1 Equipo y material	34
	V.2 Reactivos	34
	V.3 Procedimientos	35
	V.3.1 Preparación de soluciones	35
	V.3.2 Lavado de cristalería para uso de análisis de trazas	36
	V.3.3 Optimización de las condiciones de trabajo	37
	V.3.4 Parámetros de desempeño del método	38
	V.3.5.1 Curva de Calibración Normal	38
	V.3.5.2 Curva de Calibración por Adición Patrón	38
	V.3.5.3 Repetibilidad del método	38
	V.3.5.4 Límite de detección	38

	V.3.5.5 Porcentaje de recuperación y el efecto de matriz	39
VI.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
	VI.1 Optimización de las condiciones de trabajo	39
	VI.2 Estudio de la repetibilidad del método	41
	VI.3 Linealidad	42
	VI.4 Límite de detección y límite de cuantificación	44
	VI.5 Control de calidad para la curva de calibración normal	45
	VI.6 Efecto de matriz	46
	VI.7 Estudio de la exactitud del método. Porcentaje de recuperación	47
	VI.8 Evaluación de la incertidumbre en el cálculo de la concentración a partir de la curva de calibración normal	48
	VI.9 Resultados obtenidos por la curva de calibración normal	50
VII.	Conclusiones	53
VIII.	Recomendaciones	54
IX.	Bibliografía	55
X.	Anexos	57

I. RESUMEN

En el presente trabajo se llevó a cabo la validación del método polarográfico para la determinación de ácido ascórbico (vitamina C) en fórmula para lactantes, para lo cual se evaluaron los parámetros que definen el desempeño del método. Primero se optimizaron las condiciones de trabajo del equipo, con las que se realizaron los análisis de los picos polarográficos, además se estudiaron los parámetros de validación tales como: repetibilidad, linealidad, efecto de matriz, porcentaje de recobro, límite de detección (LD), límite de cuantificación (LC) y la sensibilidad del método.

Se efectuó el estudio de la repetibilidad de la curva de calibración normal (estándares puros) a través de una carta de control tomando en cuenta simultáneamente los parámetros de regresión intercepto (b_0) y pendiente (b_1), además se evaluó el ajuste del modelo de regresión lineal.

Finalmente se evaluó la incertidumbre para la determinación de la concentración de ácido ascórbico a partir de la curva de calibración normal, además de todos los parámetros de dilución de la muestra y el valor de la concentración experimental se comparó con el valor de las etiquetas de los potes que contenían la fórmula para lactantes.

II. OBJETIVOS.

Objetivo General.

- Validar el método voltamperométrico para la determinación de ácido ascórbico en fórmula para lactantes (leche en polvo), utilizando la técnica de polarografía diferencial de impulsos.

Objetivos Específicos.

- Optimizar las condiciones de trabajo en el equipo polarográfico para la determinación de ácido ascórbico en fórmula para lactantes (leche en polvo).
- Evaluar los parámetros de repetibilidad, linealidad, efecto de matriz, exactitud, porcentaje de recobro, límite de detección, límite de cuantificación.
- Evaluar la incertidumbre expandida en la medición analítica.
- Comparar las concentraciones de ácido ascórbico experimentales en fórmula para lactantes (leche en polvo) con los valores teóricos.

III. INTRODUCCIÓN.

La vitamina C (conocida también como ácido ascórbico o ascorbato) forma parte de una serie de vitaminas hidrosolubles y como mayormente ocurre con ellas no se almacenan en el cuerpo por mucho tiempo. Debido a esto es importante su administración diaria ya que sus reservas se agotan más fácilmente que otras vitaminas.

La vitamina C se encuentra en muchas frutas y verduras, entre ellas podemos mencionar la naranja, la mandarina, el limón, los espárragos, el brócoli, el repollo, entre otros.

La deficiencia de vitamina C provoca el escorbuto, cuyos síntomas son aflojamiento de dientes, gingivitis, anemia y moretones en la piel.

En Nicaragua se han hecho estudios de vitamina C por diferentes métodos, entre estos tenemos el método iodométrico, el método espectrofotométrico, el método potenciométrico y el método de polarografía clásica. Se ha determinado la vitamina en cítricos, en algunos preparados comerciales y en la papa[1][2][3][4], sin embargo no se encuentran evidencias de estudios realizados en muestras de fórmula para lactantes.

En el presente estudio se determinó vitamina C en fórmula para lactantes por polarografía diferencial de impulsos, esto se realizó para verificar si las muestras analizadas contenían la cantidad de vitamina C que se indicaba en la etiqueta de los potes de leche. Además de comparar valores experimentales con referencias de las etiquetas, también se conoce si se cumple con las normas internacionales de valores mínimos de ácido ascórbico en la fabricación de este producto. Según las normas codex alimentarius la cantidad mínima de ácido ascórbico en fórmula para lactantes es de 8 mg por cada 100 kilocalorías.[5]

IV. MARCO TEÓRICO

IV.1 Generalidades sobre vitamina C.

El término vitamina C debe usarse como un nombre descriptivo genérico para todos los compuestos que muestran desde el punto de vista cualitativo la actividad biológica del ácido ascórbico. La vitamina C se conoce también como ascorbato o ascorbato monoaniónico.[6]

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 este motivo, es importante su administración diaria, ya que es más fácil que se agoten sus reservas que las de otras vitaminas.[6]

IV.2 Propiedades físicas y químicas de la vitamina C.

Es una sustancia de color blanco, estable en su forma seca, pero en solución se oxida con facilidad, más aún si se expone al calor. Soluble en agua, ligeramente soluble en alcohol, insoluble en éter, cloroformo, éter de petróleo, aceites y grasas. Tiene un peso molecular de 176.1 g/mol, punto de fusión de 191°C, pH de 2.2–2.5, rotación específica de +20.5° - 21.5°. Un pH alcalino (mayor a 7), el cobre y el hierro, también aceleran su oxidación. Su estructura química recuerda a la de la glucosa (en muchos mamíferos y plantas, esta vitamina se sintetiza a partir de la glucosa y galactosa).[7]

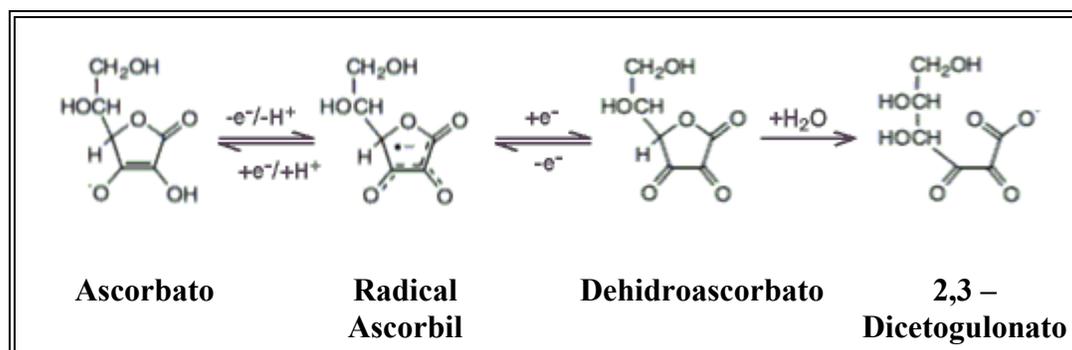


Figura N° 1. Reacción de oxidación del ácido ascórbico.

El ácido dehidroascórbico posee también actividad biológica, debido a que en el cuerpo se reduce para formar ácido ascórbico. (Ver Figura N° 1).

El ácido ascórbico es una α -cetolactona de seis carbonos con pK_a de 4.25, que tiene relación estructural con otras hexosas, se oxida de modo reversible en el organismo hacia ácido deshidroascórbico. Este último compuesto posee actividad completa de vitamina C.[6] Las fórmulas estructurales del ácido ascórbico y del ácido deshidroascórbico son las siguientes:

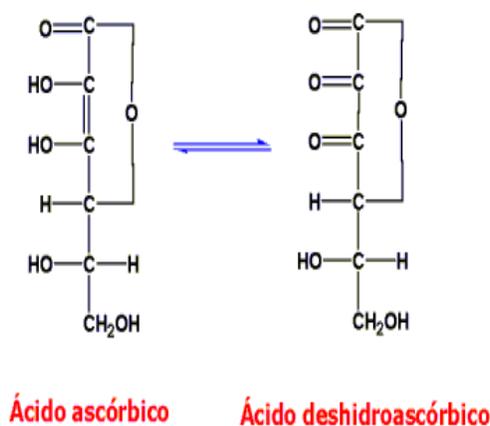


Figura N° 2. Formulas estructurales del ácido ascórbico y deshidroascórbico.

El ácido ascórbico tiene un átomo de carbono con actividad óptica, y la acción contra el escorbuto reside casi por completo en el isómero L otro isómero, el ácido eritórbico (ácido D-isoascórbico, ácido D-araboascórbico), tiene actividad muy débil en el escorbuto, pero muestra un potencial de óxido-reducción similar. Por ende, ambos compuestos se han usado para prevenir formación de nitrosamina a partir de nitritos en carnes curadas como el tocino. La falta de un efecto más potente del ácido eritórbico contra el escorbuto quizá depende de la incapacidad de los tejidos para retenerlo en las cantidades en que se almacena el ácido ascórbico. Una consecuencia de la oxidación fácil de este último es la facilidad con la que puede destruirse por exposición al aire, especialmente en medio alcalino, y si hay cobre como agente catalítico.[8]

El ascorbato se oxida hacia CO_2 en ratas y cobayas pero en seres humanos puede detectarse mucha menos conversión. Una vía de metabolismo de la vitamina en seres humanos comprende su conversión en oxalato, y la excreción a la postre en la orina; el deshidroascorbato probablemente es un intermediario. También se ha identificado ácido ascórbico-2-sulfato como un metabolito de la vitamina C en la orina humana.[6]

IV.3 Efectos farmacológicos.

La vitamina C posee pocos efectos farmacológicos. El suministro del compuesto en cantidades mucho mayores a los requerimientos fisiológicos causa pocas acciones demostrables salvo en individuos con escorbuto, cuyos síntomas se alivian con rapidez.

Sin embargo, en abril de 1996 un estudio patrocinado en Estados Unidos por el Instituto Nacional de la Diabetes y de las Enfermedades Digestivas y Renales fue una primera voz de alarma respecto a las llamadas megadosis de vitamina C. La máxima absorción de vitamina se consigue con unos 200 mg por día y por encima de un gramo diario se observaron consecuencias negativas, por ejemplo, en las personas propensas a los cálculos renales. Y ello no quedó así, ya que en los últimos dos años la alerta se ha extendido en todo el mundo tras la publicación de unas cuantas investigaciones aparecidas en importantes revistas científicas. Todo conduce a pensar a que el ácido ascórbico, en altas concentraciones puede ocasionar daños celulares. Por ejemplo, como consecuencia de la reducción del hierro férrico a hierro ferroso ya que estas últimas sales, al reaccionar con el agua oxigenada, son más efectivas que las férricas en promover los radicales libres.

Nuestro material genético, nuestro ADN, tiende a estropearse oxidativamente. Sus unidades constituyentes, las bases purínicas y pirimidínicas suelen encontrarse en todos los tejidos humanos dañadas oxidativamente en una proporción de una base dañada por cada cien mil-un millón de bases no dañadas. Se piensa que este es el resultado final de un equilibrio dinámico entre los factores que deterioran el material genético (principalmente los radicales libres) y los mecanismos metabólicos que para la reparación de tales daños poseen nuestras células. Como marcador del daño genético se suele usar la medida de nucleósidos que contienen bases oxidadas. Por ello, sería muy interesante saber si las concentraciones de esos nucleósidos transformados son sensibles a la mayor o menor

ingesta de vitamina C. Efectivamente, se comprobó que si la dieta estaba casi exenta de vitamina C las concentraciones de algunos nucleósidos oxidados en el espermatozoides de los varones aumentaba más de un 90%. Pero el grupo del Dr. Podmore, en 1998, en la revista Nature, publicó un artículo mostrando que si voluntarios sanos tomaban más de medio gramo diario de ácido ascórbico durante seis semanas los niveles de uno de tales nucleósidos oxidados lo que hacía era aumentar notablemente.[9]

Otros trabajos han seguido esa misma línea. En el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de Murcia, el grupo del Dr. Peñafiel y la Dra. Cremades han observado, en el ADN de plásmidos, daños genéticos inducidos por la mezcla de ácido ascórbico y sales de cobre, de modo semejante a lo señalado por otros investigadores que han mostrado que dosis muy altas de vitamina C, junto con sales de hierro, pueden dañar al material genético humano.[10]

Sin embargo, si las altas dosis de vitamina C van acompañadas de la toma de beta-caroteno y alfa-tocoferoles, parece desaparecer su efecto negativo.

IV.4 Función bioquímica y molecular.

El ácido ascórbico funciona como un cofactor en diversas reacciones de hidrólisis y amidación al transferir electrones a enzimas que proporcionan equivalentes reductores. De este modo, se requiere para, o facilita, la conversión de algunos residuos de prolina y lisina que se encuentran en el procolágeno, en hidroxiprolina e hidroxilisina en el transcurso de la síntesis de colágeno, la oxidación de cadenas laterales de lisina en proteínas, para proporcionar hidroxitrimetilisina para la síntesis de carnitina, la conversión de ácido fólico en ácido folínico, el metabolismo microsómico de fármacos, y la hidroxilación de dopamina para formar noradrenalina. El ácido ascórbico favorece la actividad de una enzima amidante que se cree participa en el procesamiento de algunas hormonas peptídicas, como oxitocina, hormona antidiurética y colecistocinina. Al reducir el hierro férrico no heme al estado ferroso en el estómago, el ácido ascórbico también favorece la absorción intestinal de hierro. Además, dicho ácido participa, aunque de una manera poco definida, en la esteroidogénesis suprarrenal.[6]

En el ámbito tisular, una función importante del ácido ascórbico se relaciona con la síntesis de colágeno, proteoglicanos y otros constitutivos orgánicos de la matriz intercelular en tejidos tan diversos como dientes, huesos y endotelio capilar. Aun cuando el efecto del ácido ascórbico sobre la síntesis del colágeno se ha atribuido a su participación en la hidroxilación de prolina, las pruebas también sugieren que hay estimulación directa de la síntesis de péptidos de colágeno. El escorbuto se relaciona con un defecto de la síntesis de colágeno, que queda de manifiesto por la falta de cicatrización de heridas, defectos de la formación de los dientes, y rotura de capilares que conducen a la aparición de abundantes petequias y su coalescencia para formar equimosis. En tanto esto último se ha atribuido a escape desde los capilares debido a adherencia inadecuada de las células endoteliales, también se cree que en el escorbuto hay defectos del tejido fibroso pericapilar, lo cual produce apoyo inadecuado de los capilares, y su rotura bajo presión.[6]

IV.5 Absorción y depósito.

El ácido ascórbico se absorbe con facilidad desde el intestino delgado, mas precisamente en el duodeno, por medio de un proceso dependiente de energía, que es saturable y dependiente de la dosis. La absorción del ascorbato de la dieta es casi completa. Cuando se administra vitamina C en una dosis única por vía oral, la absorción disminuye desde 75% a 1 g, hasta 2% a 5 g. El ácido ascórbico se encuentra en el plasma y está distribuido de modo omnipresente en las células del organismo.[11]

Las concentraciones de la vitamina en los leucocitos a veces se utilizan para representar a las que hay en los tejidos y son menos sensibles a agotamiento que el plasma. Los leucocitos en adultos saludables tienen concentraciones de aproximadamente 27 mg de ácido ascórbico por 10⁸ células. Cabe hacer notar que la cantidad de este ácido en los leucocitos puede mostrar relación inversa con su número, y es posible que los estimados del estado, en cuanto a ácido ascórbico se refiere, resulte falsamente bajo en pacientes con leucocitosis, en quienes se mide el ascorbato de los leucocitos. Las concentraciones plasmáticas también varían con el consumo. La ingestión adecuada se relaciona con cifras de más de 0.5 mg/dl (28 mM), en tanto en individuos con escorbuto manifiesto se observan cifras de 0.15 mg/dl (8.5 mM).[11]

Cuando la dieta no contiene en esencia ascorbato, disminuyen las concentraciones plasmáticas; como se mencionó, los síntomas de escorbuto son obvios cuando se alcanza una cifra de 0.15 mg/dl (8.5 mM), y las reservas corporales totales de la vitamina se aproximan a 300 mg cuando aumenta el consumo de ascorbato, también lo hace la concentración plasmática: al principio de manera lineal. La ingestión diaria de 5 a 10 mg proporciona una reserva corporal total de 600 a 1000 mg de ascorbato. Cuando se consumen 60 mg/día de vitamina C (el ANR actual para adultos), la concentración plasmática alcanza unos 0.8 mg/dl (45 mM), y las reservas corporales totales son de aproximadamente 1500 mg si el consumo se aumenta más allá de 200 mg/día, las reservas corporales tienden a nivelarse a 2500 mg, y las cifras plasmáticas a 2 mg/dl (110 mM). El umbral renal para el ácido ascórbico es de alrededor de 1.5 mg/dl de plasma (85 mM), y cuando la ingestión diaria excede de 100 mg, se excretan cantidades cada vez mayores del ácido ascórbico ingerido.[11]

El consumo de alcohol disminuye la absorción de la vitamina, y el hábito de fumar depleciona los niveles de la vitamina en el organismo, por lo que se recomienda a los fumadores y consumidores regulares de alcohol, que suplan su dieta. La vida media del ácido ascórbico en el organismo es de aproximadamente 16 días. Es por este motivo que los síntomas del escorbuto tardan meses en aparecer en sujetos con una dieta deficiente en vitamina C.[11]

IV.6 Disponibilidad para la ingestión.

El ácido ascórbico se obtiene a partir de frutas cítricas, melones, uvas, kiwi, mangos, papayas, pomelos, sandias, fresas, tomates, verduras verdes, col (repollo) y patatas. Los jugos de naranja y limón son fuentes con alto contenido de la vitamina y contienen alrededor de 0.5 mg/ml (2.8 mM). Además de su participación en la nutrición, el ácido ascórbico suele utilizarse como un antioxidante para proteger el sabor y color naturales de muchos alimentos (ej.; fruta procesada, verduras y productos lácteos).[11]

En el zumo de diversas frutas se encuentra la vitamina C en alta concentración, ya que un vaso mediano de zumo contiene las siguientes cantidades: naranja, fresa o limón (100 mg), pomelo o mango (80 mg), melón, grosella, fresa o frambuesa (60 mg), piña (30

mg), plátano, caqui o cereza (20 mg), ciruela, pera, albaricoque, melocotón o sandía (10 mg), siendo mucho menor en manzana, o en uva (5 mg). Algunas verduras y hortalizas también poseen un alto contenido de vitamina C (por 100 gramos) ya que pueden superar los 100 mg el brócoli, col de Bruselas, coliflor, perejil, pimiento (verde y rojo), espárragos, guisantes y rábano. Además, algunos jugos de frutas comerciales son reforzados con vitamina C como sucede con los de manzana, arándano y uva. El contenido de vitamina C de los alimentos depende de la estación, el transporte, el tiempo transcurrido entre la cosecha y el consumo, así como de las costumbres de almacenamiento y preparación culinaria.[11]

El ascorbato existe en comprimidos y también se añade a muchos suplementos vitamínicos. Se encuentra como tal, asimismo, en una amplia variedad de dosis y en suplementos que llevan otras vitaminas seleccionadas, habitualmente en comprimidos que se venden como suplementos antioxidantes. La disponibilidad de la vitamina C es muy amplia, su ingestión depende de la selección de alimentos. La cantidad óptima de 100-200 mg diarios puede obtenerse fácil y agradablemente sin tener que acudir a pastilla alguna, se recomienda comer al menos seis frutas y verduras al día. Y lo mejor de esta alternativa, respecto a las pastillas, es que los vegetales también contienen muchos otros componentes saludables como uno o unos todavía desconocido(s), presente(s) en las coles de Bruselas, que reduce(n) fuertemente el daño oxidativo del ADN.[11]

La vitamina C regularmente se administra por vía oral; de cualquier modo, en situaciones que evitan la absorción adecuada a partir del tubo digestivo, pueden proporcionarse soluciones por vía parenteral. Más aún, debe administrarse ácido ascórbico en sujetos que reciben alimentación parenteral. Debido a la pérdida en la orina de gran parte del ácido ascórbico administrado, es posible que se requieran dosis diarias de 200 mg para conservar cifras plasmáticas normales de alrededor de 1 mg/dl (60 mM en esos individuos).[11]

IV.7 Efectos favorables del ácido ascórbico.



- a) Inhibición en los lípidos del plasma y en las lipoproteínas de las peroxidaciones ocasionadas por los efectos activantes de las infecciones o de los componentes del humo del tabaco.
- b) Disminución de la oxidación natural y de la provocada de las moléculas de hemoglobina, nuestra preciosa proteína sanguínea portadora del oxígeno necesario para el metabolismo de nuestras células.
- c) Eliminación de peligrosos oxidantes como el agua oxigenada, presente en algunos tejidos animales.
- d) Mejora de la función vascular en pacientes con enfermedades vasculares.
- e) Protección del tracto respiratorio contra los contaminantes del aire, y otras muchas posibilidades semejantes.

IV.8 Deficiencia.

Como hemos visto, una deficiencia de consumo de vitamina C puede generar escorbuto. Se encuentran casos de este último entre ancianos que viven solos, alcohólicos, drogo-dependientes, y otros con dietas inadecuadas, incluso lactantes. En casos espontáneos de escorbuto, por lo general hay aflojamiento de los dientes, gingivitis y anemia, que pueden deberse a una función específica del ácido ascórbico en la síntesis de hemoglobina. El cuadro del escorbuto espontáneo en la práctica clínica a menudo también se complica por deficiencia de otros nutrientes.[11]

El escorbuto puede sobrevenir en lactantes que reciben dietas basándose en fórmulas preparadas en el hogar, con cifras inadecuadas de ácido ascórbico. El lactante es irritable y no tolera que lo toquen, debido a dolor. Este último se origina por hemorragias bajo el periostio de los huesos largos, y los hematomas resultantes a menudo son visibles como inflamaciones en las diáfisis de esos huesos.[11]

IV.9 Toxicidad.

La toxicidad franca de la vitamina C es escasa. Existen efectos adversos que son proporcionales a la dosis.



Efectos adversos de la vitamina C.

- ✓ Diarrea, hinchazón abdominal con dosis de varios gramos.
- ✓ Resultados negativos falsos de la sangre oculta en heces.
- ✓ Absorción excesiva de hierro: talasemia mayor, anemia sideroblástica y hemocromatosis.
- ✓ Hiperoxaluria en algunos pacientes.
- ✓ Hiperoxalemia en pacientes sometidos a diálisis.
- ✓ Hemólisis en pacientes con deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

Cuando se ingieren varios gramos de una vez pueden producirse diarrea, hinchazón abdominal o ambas, aunque no parece haber necesidad de ingerir dosis tan grandes. Tras la ingestión de ≤ 250 mg de vitamina C, se producen resultados negativos falsos en la prueba de detección de sangre oculta. Los fabricantes recomiendan interrumpir la ingesta de vitamina C, sobre todo en forma de suplementos, varios días antes de hacer una determinación de sangre oculta en las heces.[6]

Como el ascorbato mantiene al hierro en su forma reducida, facilita su absorción. Los pacientes con sobrecarga de hierro pueden sufrir hemocromatosis, talasemia mayor, anemia sideroblástica u otras enfermedades que requieren múltiples transfusiones de hematíes.[6]

En particular, en las personas que forman cálculos de oxalato la ingestión de 500 mg de ascorbato puede determinar una mayor excreción de oxalato, por lo que, en estos pacientes, la ingesta de megadosis de vitamina C puede resultar peligrosa.[6]

La vitamina C puede producir hiperoxalemia, pero solo si se administra por vía intravenosa a pacientes en diálisis y con dosis repetidas de 1g. También existen algunos casos de hemólisis en pacientes con deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa a los que se administraron 6 g o más del compuesto en una sola dosis.[6]

Erróneamente se han atribuido a la ingestión de ascorbato, sobre todo de dosis > 1 g, algunos efectos peligrosos, como la hipoglucemia, el rebote del escorbuto, esterilidad,

mutagénesis y destrucción de la vitamina B-12. Es un error llegar a la conclusión de que dosis de gramos de vitamina C pueden producir esos efectos.[6]

Hasta tanto, no hay motivo de alarma para aquellas personas que toman suplementos vitamínicos de ácido ascórbico que, en todo caso nunca deben superar los 200 mg por día. [6]

IV.10 Epidemiología.

Los datos epidemiológicos describen la asociación del consumo de vitamina C con la conservación de la salud y la prevención de las enfermedades. Estos datos no son concluyentes y las observaciones son a veces contradictorias. Las dietas con alto contenido de vitamina C procedentes de frutas y verduras se asocian a un menor riesgo de cáncer, especialmente de las neoplasias de la cavidad bucal, esófago, estomago, colon y pulmón. Por el contrario, el consumo de vitamina C en forma de suplementos no ha producido efectos, en los estudios experimentales, ni en el adenoma colorrectal ni en el cáncer de estomago. Los efectos de la ingestión de ascorbato sobre la cardiopatía isquémica y el desarrollo de cataratas también son contradictorios. Estas diferencias pueden tener varias explicaciones experimentales. La ingestión de frutas y verduras podría asociarse a un menor riesgo de cáncer no solo por su contenido de vitamina C, sino por una interacción compleja entre el ascorbato y otros múltiples compuestos bioactivos existentes en estos alimentos.[6]

Se estudiaron los posibles efectos del ascorbato sobre el accidente cerebrovascular, la mortalidad global y el intervalo hasta el desarrollo del SIDA. Se publico que las bajas concentraciones plasmáticas de vitamina C se asocian a un aumento del riesgo de accidente cerebrovascular. El efecto de la vitamina C se produjo cuando también las concentraciones de β -caroteno eran bajas.[6]

Un estudio ampliamente difundido en el que se describía que la vitamina C reducía la mortalidad global tiene varios defectos. La mortalidad disminuyó en las personas que tomaban suplementos y que ingerían mas de 700 mg/día, pero sus autores no efectuaron mediciones de las concentraciones plasmáticas de la vitamina. Los datos obtenidos en

varones normales muestran que la ingesta diaria de vitamina C en dosis iguales o superiores a 500 mg no produjo cambios en el plasma ni en las concentraciones hícticas, en comparación con la ingesta de 400 mg. Por tanto, es probable que el efecto de la prolongación de la vida atribuido a los suplementos de vitamina se debiera a alguna otra cosa.[6]

El estudio acerca del efecto de la vitamina C sobre el desarrollo del SIDA en los sujetos seropositivos para el virus de la inmunodeficiencia humana se hizo con un numero escaso de pacientes y tenia varias incongruencias internas. Las contradicciones que sobre los efectos del ascorbato se han encontrado en los estudios epidemiológicos pueden tener otras explicaciones, en los que no puede excluirse la posibilidad de que sea otro factor el que justifique el acontecimiento observado.[6]

IV.11 Requerimiento y recomendaciones diarias de vitamina C.

Los seres humanos y otros primates, así como las cobayas y algunos murciélagos, son los únicos mamíferos conocidos que son incapaces de sintetizar ácido ascórbico; en consecuencia requieren vitamina C en la dieta para la prevención del escorbuto. Como es característico en animales que no requieren vitamina C en la dieta, la rata sintetiza ácido ascórbico a partir de glucosa por medio de la formación intermediaria de ácido D-glucurónico, ácido L-gulónico, y L-gulonolactona. Los seres humanos, monos y cobayas carecen de la enzima hepática necesaria para llevar a cabo esta última reacción, es decir, la conversión de L-gulonolactona en ácido L-ascórbico.[11]

La ingestión diaria de ácido ascórbico debe ser igual a la cantidad que se excreta o destruye por oxidación. Los seres humanos adultos saludables pierden 3 a 4% de sus reservas corporales al día. Para conservar una reserva corporal de 1500 mg de ácido ascórbico o más en un varón adulto, se requeriría la absorción de unos 60 mg/día. Los valores de los requerimientos de vitamina C de otros grupos de edad, se basan en un razonamiento similar. En circunstancias especiales, parece requerirse más ácido ascórbico para alcanzar concentraciones plasmáticas normales. Las cifras plasmáticas más bajas de vitamina C que se encuentran en fumadores dependen de incremento de la velocidad de recambio metabólico de la vitamina.[11]

De este modo, para asegurar un estado adecuado de dicha vitamina, los ANR para fumadores se han establecido en 100 mg/día. Las concentraciones plasmáticas de ascorbato también disminuyen en usuarias de anticonceptivos orales. Los requerimientos pueden aumentar en algunas enfermedades, en particular las infecciosas, así como luego de intervención quirúrgica.[11]

Aporte Nutricional Recomendado (ANR)[12]: el nivel de ingesta suficiente para alcanzar los requerimientos de casi todos (97-98 %) los individuos saludables en una determinada condición fisiológica y grupo de edad.

Ingesta Adecuada (IA)[12]: el valor de ingesta basada en aproximaciones o estimaciones, observadas o experimentalmente determinadas, de ingesta de nutrientes por un grupo (o grupos) de gente saludable, que se asumen como adecuados. Se utilizan cuando el ANR no puede ser determinada.

Para Lactantes (IA)

0 - 6 meses - 40 mg

7 - 12 meses - 50 mg

Para Niños (ANR)

1-3 años - 15 mg

4-8 años - 25 mg

9-13 años - 45 mg

Para Varones (ANR)

14 - 18 años - 75 mg

19 - 30 años - 90 mg

31 - 50 años - 90 mg

51 - 70 años - 90 mg

> 70 años - 90 mg

Para Mujeres (ANR)

9 - 13 años - 45 mg

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 (ANR)

14 - 18 años - 80 mg

19 a 50 años - 85 mg

Lactancia (ANR)

14 - 18 años - 115 mg

19 a 50 años - 120 mg

IV.12 Técnica analítica polarográfica utilizada.

Métodos voltamperométricos.

Las voltamperometrías comprenden un grupo de procedimientos de electroanálisis que se basan en la relación intensidad-potencial sobre un pequeño electrodo fácilmente polarizable en la disolución que interesa analizar.[13]

El desarrollo de las voltamperometrías se inició con el descubrimiento de la polarografía. En sistemas de tres electrodos la intensidad o corriente se mide entre el electrodo de trabajo y el auxiliar, mientras que el potencial aplicado se mide entre el electrodo de trabajo y el de referencia. En los últimos años se han ideado numerosas modificaciones del método polarográfico original, así como de varios métodos estrechamente relacionados con la polarografía.[13]

Polarografía.

Modo de voltamperometría que emplea un electrodo de goteo de mercurio o un electrodo de gota de mercurio estática. Aunque existen muchos tipos de técnicas polarográficas, solo haremos referencia a la denominada Polarografía clásica. Es una técnica que data de 1925, y que se basa en el estudio de las curvas i-E en unas condiciones para las cuales la difusión es prácticamente el único fenómeno de transporte de las especies electroactivas hacia la interfase. Esta característica se consigue utilizando un electrodo indicador muy particular como es el electrodo de gota de mercurio.[13]

En principio, todo elemento, sea cual fuere la forma en que se presente, es susceptible de ser analizado por polarografía. Además, este método puede extenderse a la determinación de varios grupos funcionales orgánicos. Puesto que el comportamiento

polarográfico de cualquier especie es único en determinadas condiciones experimentales, esta técnica ofrece unas posibilidades de especificidad muy atractivas para el análisis.

La mayoría de los análisis polarográficos se realizan en disolución acuosa, pero si es necesario se sustituye el agua por otro disolvente. El método polarográfico resulta especialmente indicado para la determinación de cantidades que van de los miligramos a los microgramos.[13]

Breve descripción de las medidas polarográficas.

Se consiguen los datos polarográficos midiendo la intensidad en función del potencial aplicado a determinado tipo de pila electrolítica. Al representar gráficamente los datos se obtienen curvas de intensidad-potencial, llamadas polarogramas, los cuales contienen información tanto cualitativa como cuantitativa sobre la composición de la disolución en que se hallan sumergidos los electrodos.[13]

Pila polarográfica: consta de un microelectrodo fácilmente polarizable, un electrodo de referencia grande y no polarizable, y la disolución que se ha de analizar. El microelectrodo, donde precisamente se desarrolla la reacción analítica, es de metal inerte y tiene una superficie de unos pocos milímetros cuadrados. El electrodo de gotas de mercurio, es el tipo más corriente; en éste, el mercurio cae por gravedad a través de un capilar muy fino y origina un flujo continuo de gotas idénticas con un diámetro máximo entre 0.5 y 1 mm. El tiempo que transcurre en la formación de una gota hasta que cae va de 1 a 4 s. También pueden utilizarse otros microelectrodos, constituidos por hilos o discos, de pequeño diámetro, de platino o de otro metal.[13]

Electrodo de gota de mercurio, DME, está constituido por un capilar de diámetro interno muy pequeño (0.06-0,08 mm) y unos 10 cm de longitud, cuyo extremo superior está conectado a un depósito que contiene mercurio. Debido a la diferencia del nivel de mercurio del depósito y el capilar que crece, adquiere un tamaño determinado y cae, momento en el cual comienza a formarse otra gota y así sucesivamente.[13]

En polarografía clásica no existe el fenómeno de convección uniforme, sin embargo, hay una cierta agitación debida a la caída de la gota de mercurio, lo que origina lo que se llama régimen de difusión pseudo estacionario, por el cual es posible obtener, en el registro de las curvas i - E , ondas y/o barreras.[13]

El DME es un electrodo metálico atacable, es decir, puede oxidarse originando barreras en la zona anódica de las curvas i - E . Este hecho hace que no se pueda sobrepasar un potencial de +0.2 V para evitar la oxidación del mercurio. Por esta razón, la técnica se emplea fundamentalmente en el estudio de reacciones de reducción.[13]

Un polarógrafo consta esencialmente de una fuente de corriente continua, F , conectada a dos electrodos mediante una resistencia variable R ; uno de los electrodos está constituido por un fino capilar de vidrio por el que fluye el mercurio contenido en un depósito, suele actuar como cátodo y su potencial de trabajo puede ser impuesto externamente. El electrodo de referencia tiene gran dimensión respecto al microelectrodo, suele ser un electrodo de calomelanos, de plata /cloruro de plata o, simplemente, un fondo de mercurio de gran superficie, por lo que su comportamiento permanecerá prácticamente constante con el paso de pequeñas intensidades, es decir, estará despolarizado durante el análisis.[13]

Mediante la fuente de energía y la resistencia variable se aplican potenciales variables al electrodo de mercurio, potenciales que son medidos con el voltímetro V , el galvanómetro G indica la intensidad de corriente que pasa en cada momento por los electrodos.[13]

Para entender el principio de esta técnica supóngase una disolución que contiene una especie oxidante, Ox que puede electroreducirse a la forma reducida Red , si se introducen en esta disolución los electrodos de gotas de mercurio y referencia y se aplica al electrodo de gotas de mercurio un potencial suficientemente más positivo que el potencial del sistema Ox/Red no tendrá lugar la reducción y no pasará corriente por el galvanómetro.

E aplicado >> E Ox/Red; no reducción

Si progresivamente se van aplicando al electrodo potenciales cada vez más bajos llega un momento, cuando E aplicado está próximo a $E_{Ox/Red}$, en que comienza a reducirse la especie, acusándose el paso de corriente en el galvanómetro.



La aplicación de potenciales inferiores conduce a que la reacción de electroreducción se produce con más intensidad observándose un aumento progresivo de la intensidad de corriente.[13]

Finalmente se observa que la intensidad de corriente permanece prácticamente constante, independientemente de que se disminuya el potencial aplicado, alcanzándose la denominada intensidad límite.

Polarogramas: es una representación de la intensidad en función del potencial aplicado a una pila polarográfica. Por lo general, el microelectrodo se conecta al terminal negativo de la fuente de energía, por convenio se le asigna signo negativo al potencial aplicado en estas circunstancias. También por convenio, las intensidades se conceptúan positivas cuando el flujo de electrones va desde la fuente de energía al microelectrodo, o sea, cuando este electrodo actúa como cátodo.[13]

Corriente residual.

En ausencia de especies electroactivas debería obtenerse una línea recta al valor de intensidad cero. En la práctica se observa una pequeña intensidad de corriente que aumenta de forma prácticamente lineal con el potencial aplicado. Es la denominada corriente residual que está originada en parte por la electrólisis de pequeñas impurezas y en parte porque la interfase mercurio-disolución actúa como un condensador eléctrico que se carga y descarga con el crecimiento y caída de cada gota de mercurio produciendo una pequeña corriente de carga (no faradaica, es decir, que no se debe a una reacción redox) que aumenta con el potencial.[14]

Intensidad de difusión y corriente de semionda.

La intensidad de corriente media (descontada la residual) es proporcional a la velocidad con que iones (o moléculas) son reducidos (u oxidados) en el electrodo. Esta velocidad global depende de dos velocidades parciales, la velocidad con que llegan a la superficie del electrodo (transferencia de masa) desde el seno de la disolución y la velocidad con que intercambian electrones con el electrodo (transferencia electrónica).[14]

La transferencia de masa se efectúa en función de tres métodos de transporte de masa, lo que influye en la velocidad con que los reactantes y productos son transportados desde y hacia la superficie del electrodo: difusión, migración y convección. Siempre que la concentración de un ión o de una molécula sea distinta en la superficie del electrodo y en el espesor de la disolución, se producirá difusión desde la zona de mayor concentración a la de concentración más baja. El volumen de una disolución al que se genera el gradiente de concentración se denomina capa de difusión. Sin otras formas de transporte de masa, la anchura de la capa de difusión, δ , aumenta con el tiempo, a medida que disminuye la concentración de los reactantes próximos a la superficie del electrodo. Por tanto la contribución de la difusión al transporte de masa depende del tiempo. La convección ocurre cuando se utiliza un medio mecánico para transportar los reactantes hacia el electrodo y retirar los productos de éste. El medio más frecuente de convección consiste en agitar la disolución con una varilla. El tercer tipo de transporte de masa es la migración, que ocurre cuando las partículas cargadas de una disolución son atraídas o repelidas por un electrodo que tiene una carga superficial positiva o negativa. Así, cuando la carga del electrodo es positiva, las partículas de carga negativa se desplazan hacia el electrodo, mientras que las que poseen carga positiva se mueven hacia la disolución. La migración solo influye sobre el transporte de partículas cargadas.[14]

Otro factor que influye sobre la corriente es la facilidad con la que se transfieren electrones entre el electrodo y los reactantes y productos existentes en la disolución. Cuando la cinética de la transferencia de electrones es rápida, la reacción redox se mantiene en equilibrio y las concentraciones de reactantes y productos existentes en el electrodo son los especificados por la ecuación de Nernst. Se considera que estos sistemas son

electroquímicamente reversibles. En otros sistemas, cuando la cinética de la transferencia de electrones es lo suficientemente lenta, la concentración de reactantes y productos en la superficie del electrodo y, por tanto, la corriente, difieren de la prevista según la ecuación de Nernst. En este caso, el sistema es electroquímicamente irreversible.[14]

En los sistemas denominados electroquímicamente rápidos la transferencia de electrones es mucho más rápida que la de masa, con lo que la intensidad de corriente está controlada por la velocidad con que llegan los iones al electrodo, velocidad en la que participan los fenómenos de difusión, de migración electrostática (movimiento de cargas en un campo eléctrico) y de convección (agitación).

En presencia de una elevada concentración de electrolitos inertes que impidan la migración y manteniendo la disolución en reposo, la llegada de la especie electroactiva se produce casi exclusivamente por difusión, por lo que la corriente obtenida se denomina intensidad de difusión.[14]

El hecho de que esta intensidad alcance un valor límite se debe a que según avanza el proceso electródico se va agotando en especie electroactiva la zona de disolución inmediatamente en contacto con el electrodo, creándose una zona carente de dicha especie, llamada capa de difusión. La velocidad que alcanza la especie para atravesar esta capa es proporcional a la diferencia de concentraciones en el seno de la disolución y en el electrodo:

$$V = K (C_s - C_{el})$$

La velocidad máxima se logra cuando $C_{el} = 0$, esto es, cuando todos los iones que llegan a la superficie del electrodo son reducidos (u oxidados), obteniendo entonces una intensidad de corriente máxima, la intensidad límite de difusión, I_d , proporcional a la concentración de la especie en solución y que constituye la variable cuantitativa del método, ya que permite relacionar intensidades de corriente con concentraciones de especie.[14]

La polarografía es un método cualitativo. En una onda o curva polarográfica se define el potencial de semionda, $E_{1/2}$, que es el potencial al cual la intensidad de difusión es la mitad que la intensidad límite y que es característico para cada especie en un medio dado. Es independiente de la concentración y de las características instrumentales y presenta un valor muy próximo al potencial normal actual en el medio considerado.[14]

Aunque la polarografía se efectúa en una disolución no agitada, la caída de las gotas de mercurio que se mezclan con la disolución hace que la corriente obtenida sea limitante. Por tanto, cada nueva gota de mercurio que cae en una disolución cuya composición es idéntica a la de la disolución total inicial. Las oscilaciones de la corriente se deben al crecimiento de la gota de mercurio que causa un cambio proporcional al tiempo del área del electrodo de trabajo. La corriente límite (de difusión) puede medirse a partir de la corriente máxima, i_{\max} , o a partir de la corriente media, i_{med} . La relación entre la concentración del analito, C_a y la corriente máxima se expresa mediante la ecuación de Ilkovic

$$(i_{\text{lim}})_{\max} = 706 n D^{1/2} m^{2/3} t^{1/6} C_a$$

$$(i_{\text{lim}})_{\text{med}} = 607 n D^{1/2} m^{2/3} t^{1/6} C_a$$

donde n es el número de electrones transferidos en la reacción redox, D es el coeficiente de difusión del analito (constante de difusión en cm^2/s), m es la velocidad del flujo de Hg (caudal de Hg en mg/s), t es el tiempo de formación de la gota (s). El potencial semionda, $E_{1/2}$, proporciona información cualitativa sobre la reacción redox.[13]

Técnicas impulsionales.

La polarografía de impulsos se desarrolló en los años 50 mediante una serie de investigaciones realizadas por Barker et al. y por Ishiashi y Funjinaga, se desarrolló con el fin de tratar de mejorar alguna de las características analíticas de la polarografía clásica, concretamente con el fin de mejorar la sensibilidad, los límites de detección y la selectividad. La corriente que se mide en un instante dado de la vida de la gota de mercurio, está constituida por dos términos:

$$i = i_c + i_F$$

Estos términos se corresponden con la intensidad de la corriente o corriente capacitativa (i_c) dentro de la cual se engloba la intensidad residual y la intensidad o corriente faradaica (i_F), que es la corriente que se produce en la reacción electroquímica y por tanto, la que nos interesa. Los métodos denominados de impulsos intentan minimizar en lo posible la corriente capacitativa, de modo que toda la intensidad de medida sea el modo faradaico.[14]

En la Polarografía de impulsos, una variación rápida del potencial (pulso) se superpone a la variación normal de esta magnitud, el pulso se aplica a cada gota de mercurio antes de su caída. Se pueden distinguir dos tipos de polarografía de impulsos:

- ✓ *Polarografía normal de impulsos o de pulsos crecientes.*
- ✓ *Polarografía diferencial de impulsos o de pulsos constantes.*

Polarografía normal de impulsos.

En este método NPP se reemplaza el tramo de barrido lineal precedente por una serie de breves impulsos crecientes de potenciales que siguen el ritmo de la renovación de las gotas de mercurio, entre los cuatro o cinco segundos, es decir aplicamos un impulso por gota. Las medidas de intensidad se efectúan después de una pausa, justo antes de la caída de la gota, cuando la corriente faradaica de difusión se estabiliza y la corriente capacitiva es inapreciable. En lugar de una señal en dientes de sierra, se obtiene una curva mas uniforme.

La sensibilidad aumenta dos o tres decenas de veces en relación con la polarografía continua. El potencial de base es suficientemente débil para no provocar una reacción redox en el analito: la reacción de electrolisis está, por tanto bloqueada entre pulso y pulso. Entre los impulsos, el electrodo se mantiene constante al valor del potencial inicial, en él no se produce un proceso faradaico.[14]

Los límites de detección se encuentran en el intervalo 10^{-6} y 10^{-7} mol/L, como inconveniente se podría señalar que la selectividad del método no se mejora.

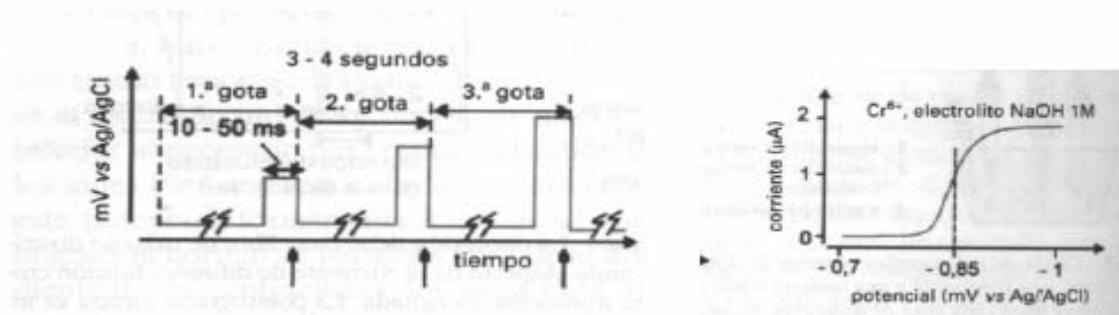


Figura N° 3. Polarografía normal de impulsos.

Polarografía diferencial de impulsos.

En la DDP, se aplican sucesivamente al electrodo impulsos de potencial de duración constante (alrededor de 50 ms) y de amplitud también constante (50 mV), un impulso por gota. Cada gota es objeto de dos medidas de la intensidad de la corriente, una justo antes del impulso de 50 mV y otra al final de la vida de la gota, justo antes de la caída.[14]

De forma que se obtiene una representación diferencial entre estas intensidades, lo cual toma efecto de la primera derivada de la curva sigmoideal y los polarogramas tienen forma de dos picos. En este caso la altura del pico desde la línea base es proporcional a la concentración de analito y el potencial de intensidad máxima se corresponde con el potencial de semionda. Los límites de concentración mensurables son del orden o inferiores a 10^{-9} mol/L.[14]

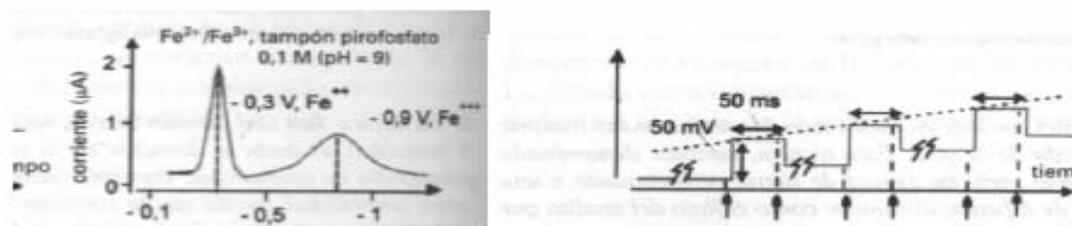


Figura N° 4. Polarografía diferencial de impulsos.

Diferencias entre la DPP y la NPP.

- ✓ En la DPP el potencial base aplicado durante casi toda la vida de la gota no es constante respecto a la gota siguiente o la anterior, sino que varía lentamente de gota a gota, de modo que el conjunto aparece como una rampa de potencial.
- ✓ En la DPP la magnitud del impulso de potencial es pequeña (10-100 mV) y se mantiene constante respecto al potencial base de cada gota.
- ✓ En la DPP la señal registrada es la representación de una diferencia de intensidades respecto al potencial base.

IV.13 Validación de métodos analíticos.

Definición.

La validación del método es un requisito importante en la práctica del análisis químico. La validación es el conjunto de verificaciones necesarias para asegurar las características de desempeño, limitaciones de un método y demostrar que este está científicamente regido bajo las condiciones para las cuales debe ser aplicado. Se comparan los parámetros de desempeño del método con los requerimientos necesarios de los datos analíticos.

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.[15]

Jerarquía de la metodología.

La jerarquía de la metodología procede de lo general a lo específico, puede considerarse como se describe a continuación:



Técnica → método → procedimiento → protocolo

Técnica: Principio científico útil para proveer información sobre la composición de una sustancia.

Método: Adaptación de una técnica para mediciones de parámetros analíticos seleccionados.

Procedimiento: Direcciones generales escritas necesarias para utilizar un método.

Protocolo: Serie de direcciones definitivas que deben seguirse sin excepción para utilizar un método.

Validación de un método.

Existen algunos aspectos importantes a tomar en cuenta para ver si es necesario verificar las características de desempeño de la validación de un método y/o saber si son las adecuadas para su uso en la resolución de un problema analítico en particular. La validación es necesaria en los siguientes casos:

- ✓ 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).

Desarrollo del método.

Puede tomarse de 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 iniciar desde unas ideas en borrador y aplicar la experiencia acumulada para establecer un método adecuado, al punto de que podría involucrar una innovación significativa.[15]

Parámetros de desempeño del método y su significado.

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 de 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 calibración por el método de adición estándar.[16]

La técnica de análisis mas común para el análisis cuantitativo se basa en la concentración de una curva patrón o estándar.

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

Las dudas suelen plantearse en los sistemas 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.

El método de las adiciones se apoya en dos premisas no siempre validas; 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 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.[16]

Los criterios de eficiencia pueden clasificarse en primarios y secundarios. Los criterios primarios son:

- a. *Precisión*: es una medida de que tan cerca están los resultados entre si y usualmente se expresa por medio del valor de la desviación estándar, que describe la dispersión, o sea que, describe el tamaño de los errores aleatorios.
- b. *Exactitud o Bias* (sesgo): que mide la magnitud de los errores sistemáticos.
- c. *Limite de detección*: que mide la cantidad mínima que puede diferenciarse de la señal de ruido de fondo.

$$L.D. = \frac{3.29 * Sb_0}{b_1}$$

Limite de detección: Uno de los puntos característicos de la recta de calibrado es la señal para la concentración cero, que puede tener diferente significado 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 puedan 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.[16]

Ambas señales de 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 mas prudente mantener estos valores en la representación de la recta de calibrado y sustraer al resultado de concentración del correspondiente a la prueba en blanco. La señal de la prueba en blanco también presenta errores experimentales y, por lo tanto, una dispersión de valores que afectan al limite 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 un 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 se 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 al señal de fondo.

Es incorrecto utilizar expresiones como *no detectable*, *ausencia* o *cero*, 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.[16]

Los criterios secundarios son los que tienen influencia en los primarios. Estos son los siguientes:

- a. *Linealidad*: que describe el comportamiento entre la respuesta y la concentración a través del modelo de calibración (una desviación del modelo representa un bias).
- b. *Rango*: representa el intervalo (nivel superior e inferior del analito) en el cual la relación lineal u otro modelo de calibración utilizado es correcta.
- c. *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 medida (del blanco), también se le conoce como *límite de determinación*.

$$L.Q. = \frac{10 * Sb_0}{b_1}$$



- d. *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 organometálico, o en diferentes estados de oxidación.
- e. *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.
- f. *Robustez o fortaleza*: en cualquier método, existen ciertas etapas que si no se llevan a cabo se llevan a cabo con cuidado provocan un efecto degradante sobre su desempeño e inclusive, podría provocar que el método no responda del todo. Estas etapas deben identificarse normalmente como parte del desarrollo del método y de ser posible evaluar su influencia utilizando pruebas de robustez. Esto se refiere a realizar variaciones deliberadas al método e investigar su consecuente efecto en el desempeño (ya sea en su precisión o exactitud), esto hace posible la identificación de variables en el método que tienen el efecto mas significativo y por tanto, aseguran que cuando se utiliza el método son controladas adecuadamente.

La puesta en practica de la robustez se puede ver a tres niveles.

1. Requiere verificar la insensibilidad del método a cambios menores en las condiciones operacionales y del medio ambiente incluyendo la reproducibilidad de otro analista.
2. Requiere una verificación del efecto de cambios en condiciones severas, tal como, el uso de columnas cromatográficas obtenidas por diferentes proveedores o la sustitución de diferentes equipos y efectuar la experimentación en diferentes laboratorios conocido como análisis de inter laboratorio.
3. Requiere verificar la robustez en un estudio de colaboración entre al menos ocho laboratorios diferentes.

Una prueba de robustez requiere tiempo, paciencia y en muchos laboratorios no la efectúan por que la consideran como un gasto y no como una inversión. Esta prueba se

debe ver como parte de las buenas practicas de laboratorio, sobre todo en laboratorios donde mas de un experimentador efectúa el mismo procedimiento analítico o (similar).[16]

IV.14 Evaluación de la incertidumbre.

En la “Guía para la expresión de la incertidumbre de las mediciones” (GEUM, por sus siglas en ingles) de la Organización Internacional para la Normalización (ISO)[17]. 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 referencia 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:

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

donde el resultado $Y(X_{ij}...)$ es una función de n parámetros $X_i, X_j, \dots, u(Y...)$ su incertidumbre estándar, $U(X_i)$ la incertidumbre asociada con X_i $\delta y/\delta x_i$ es la diferencial 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, es decir, $S(x, ik) = 0$. Es por consiguiente esencial y eficaz estudiar todos los efectos relevantes individuales sobre los resultados.

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.

Incertidumbre estándar.

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

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.

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).[18]

$$U_e = KU_c$$

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 correspondiente al nivel de confianza entre el 99%.

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.[18]

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

V. PARTE EXPERIMENTAL.

V.1 Equipo y Material.

1. Analizador Polarográfico.
EG&G Princeton Applied Research Model 264A
Polarographic Analyzer/Stripping Voltammeter.
2. Electrodo de Gotas de Mercurio.
Princeton Applied Research
Model 303A SMDE.
3. Registrador XY Sefram no modular. Modelo TRP.
4. Balanza Analítica Sartorius H-110.
5. Magneto Agitador FISHER no modular. Modelo 14-511-1A.
6. Bomba de Vacío.
CSA®. Modelo DDA-P704-AA
7. Micropipeta Biohit Proline Pipette 5-50 µl.
8. Micropipeta Labsystems 100 µl.
9. Cilindro y Regulador de gas de Nitrógeno.
10. Balón aforado PIREX® de 100 ± 0.08 ml. Clase A.
11. Balón aforado KIMAX de 10 ± 0.025 ml. Clase A.
12. Balón aforado KIMAX de 5 ± 0.02 ml. Clase A.
13. Kitasato KIMAX de 125 ml.
14. Erlenmeyer PIREX® de 125 ml.
15. Embudo Buchner.
16. Beaker PIREX® de 100 ml.

V.2 Reactivos.

1. Ácido L-ascórbico certificado A.C.S. 100.6% Fisher Chemical.
2. Ácido Tricloroacético certificado A.C.S. 99.4% Fisher Chemical.
3. Sulfato de Sodio Anhidro 100.1% J.T. Baker Chemical Co.
4. Ácido Acético Glacial 99.5% J.T. Baker Chemical Co.
5. Ácido Nítrico concentrado para análisis de trazas, solución al 20% Merck.

6. Hidróxido de Potasio solución al 12% Fisher, en Etanol 95% Merck.
7. Ácido Oxálico certificado A.C.S. 99.6% Fisher Chemical
8. EDTA 99% Acros Organics.
9. Acetato Sódico Anhidro, Merck.

V.3 Procedimientos.

V.3.1 Preparación de Soluciones.

Solución Patrón de Ácido Ascórbico ($C_6H_8O_6$) 1000 ppm.

Se pesaron 0.01g de ácido ascórbico y se disuelven en ácido oxálico al 1% completando el volumen a 10 ml con la misma solución de ácido oxálico.

Solución de Ácido Oxálico ($C_2H_2O_4$) al 1%.

Se pesó 1g de ácido oxálico y se diluyó exactamente a 100 ml con agua desionizada.

Solución amortiguadora (Buffer) [Acetato (CH_3COONa) 2.5 M / Ácido Acético (CH_3COOH) 2M (pH 4.8)].

Se pesaron 20.5075g de acetato sódico, se disuelven en unos 30-40 ml de agua y se añadieron 11.5 ml de ácido acético, se agita la solución con un agitador magnético hasta completa disolución y se aforó hasta 100 ml con agua desionizada. Se comprueba el pH.

Solución de Extracción. [Ácido Tricloroacético (CCl_3COOH) al 2%, Ácido Oxálico ($C_2H_2O_4$) al 1% y Sulfato Sódico Anhidro (Na_2SO_4) al 1%].

Se disolvieron en agua desionizada 2 g de ácido tricloroacético, 1.42g de ácido oxálico y 1g de sulfato sódico anhidro completando un volumen exacto de 100 ml con agua desionizada.

Ácido Nítrico (HNO₃) al 20%.

En 500 ml de agua se agregaron 306 ml de ácido nítrico concentrado (al 65.36% y 17 M) y luego se aforó a 1000 ml con agua desionizada.

Hidróxido de Potasio (KOH) al 12% en alcohol Etilico (CH₃CH₂OH) al 95%.

Se pesaron 120 g de hidróxido de potasio, se disolvieron con alcohol etílico, se colocaron en un matraz de 1000 ml y luego se aforó hasta la marca con alcohol etílico comercial.

EDTA (HO₂CCH₂)₂NCH₂CH₂N(CH₂CO₂H)₂ 1.0 M.

Se pesaron 292.24 g de EDTA, se colocaron en un matraz de 1000 ml y luego se aforó hasta la marca con agua desionizada.

V.3.2 Lavado de Cristalería para uso de Análisis de Trazas.

Para el lavado de la cristalería de análisis de trazas se utilizó el siguiente procedimiento: tres baños de ácido nítrico al 20% calidad analítica, un baño de hidróxido de potasio 12% m/v y una plantilla calentadora de temperatura ajustable. Se procedió a lavar el material de laboratorio mediante el procedimiento que a continuación se describe:

Todo el equipo se lavó cuidadosamente con abundante agua y jabón, después se dejó escurrir unos minutos colocados sobre papel toalla y se observó que no quedarán etiquetas adhesivas, ni marcador.

El equipo parcialmente seco se sumergió completamente en una solución de KOH al 12% en alcohol etílico al 95%, por un tiempo no menor a 30 minutos, ni mayor de 45 minutos. Se sacó todo el material del baño etanólico, se dejó escurrir sobre papel toalla, se enjuagó con abundante agua de grifo hasta eliminar todo residuo de KOH / Etanólico.

Todo el material se colocó en un baño de ácido nítrico al 20% a temperatura ambiente, que se encontraba en un recipiente plástico por lo menos durante siete días.

Se colocó el material en un cuarto baño al 20% de ácido nítrico, contenido en un recipiente de cristal y se calentó durante 12 horas. Las celdas electroquímicas y los matraces aforados de 5 ml a utilizar se transfirieron a una solución EDTA 1.0 M, contenidas en un recipiente plástico herméticamente cerrado.

V.3.3 Optimización de las condiciones de trabajo.

Se tomó un balón de 5 ml se le agregó 1800 μl de ácido oxálico al 1%, 400 μl de la solución amortiguadora y 200 μl de la solución de extracción, se aforó a 5 ml con agua desionizada, la solución se coloca en una celda polarográfica, se le añadió estándar de ácido ascórbico (1000 ppm) para obtener 2 ppm de ácido ascórbico y se trazaron los polarogramas por triplicado. Esto se realizó variando todas las condiciones existentes en el analizador polarográfico, como son: amplitud de impulso, tiempo de goteo y tamaño de gota.

Condiciones de Trabajo del Equipo Polarográfico.

Modalidad : Polarografía Diferencial de Impulsos.

Potencial Inicial : - 0.20 V

Potencial Final : + 0.13 V

Tiempo de Purga Inicial : 8 min.

Tiempo de Purga entre cada replica : 30 seg.

Velocidad de Barrido : 5 mV / seg.

Corriente : 20 μA

Tiempo de Goteo : 0.5 seg.

Altura de Impulso : 50 mV

Condiciones Experimentales del Electrodo de Mercurio.

Modalidad : HMDE.

Tamaño de Gota : Media

Tiempo de Purga : $\frac{1}{2}$ min.

Condiciones Experimentales de Registrador.

X : 25 mV / 1 mV / cm

Y : 100mV / 4 mV / cm

V.3.5 Parámetros de Desempeño del Método.

V.3.5.1 Curva de Calibración Normal (C.C.N.)

Se tomó un balón de 5 ml se le agregó 1800 μ l de una solución de ácido oxálico al 1%, 400 μ l de una solución amortiguadora y 200 μ l de una solución de extracción, se aforó a 5 ml con agua desionizada, la solución se coloca en una celda polarográfica, adicionándosele alícuotas del estándar de ácido ascórbico (1000 ppm) para obtener concentraciones de: 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 ppm del estándar de ácido ascórbico y se trazaron los polarogramas. Esto se realizó por 3 días consecutivos.

V.3.5.2 Curva de Calibración por Adición Patrón (C.A.P.)

Se tomó un balón de 5 ml, se le agregó 1800 μ l de una solución de ácido oxálico al 1%, 400 μ l de una solución amortiguadora y 200 μ l de extracto filtrado, se aforó a 5 ml con agua desionizada, la solución se coloca en una celda polarográfica, adicionándosele alícuotas del estándar de ácido ascórbico (1000 ppm) para obtener concentraciones de: 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 ppm del estándar de ácido ascórbico y se trazaron los polarogramas.

V.3.5.3 Repetibilidad del Método.

Se tomó un balón de 5 ml se le agregó 1800 μ l de una solución de ácido oxálico al 1%, 400 μ l de una solución de amortiguadora y 200 μ l de una solución de extracción, se aforó a 5 ml con agua desionizada, la solución se coloca en una celda polarográfica, se adicionó un volumen de estándar de ácido ascórbico (1000 ppm) para obtener 4 ppm del estándar de ácido ascórbico y se trazaron los polarogramas, esto se realizó por 5 días consecutivos.

V.3.5.4 Limite de Detección.

Se tomó un balón de 5 ml se le agregó 1800 μ l de una solución de ácido oxálico al 1%, 400 μ l de una solución amortiguadora y 200 μ l de una solución de extracción, se aforó a 5 ml con agua desionizada, la solución se coloca en una celda polarográfica, se le adicionaron alícuotas de 3 en 3 μ l para obtener concentraciones en intervalos de 0.6 ppm

del estándar de ácido ascórbico hasta encontrar una altura de pico medible cuantitativamente, adicionándosele luego la cantidad de estándar encontrado en el primer pico medible uniformemente hasta completar 6 puntos.

V.3.5.5 Porcentaje de Recuperación y el Efecto de Matriz.

Para esto se realizó una curva de calibración con estándares puros (curva de calibración normal) utilizando estándares de ácido ascórbico con una concentración de 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 ppm y una curva de calibración por adición patrón adicionando estándares de igual concentración (0-12 ppm) a 200 μ l de extracto filtrado de una muestra de leche.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

VI.1 Optimización de las Condiciones de Trabajo.

Para optimizar las condiciones de trabajo del equipo polarográfico se realizó una variación de los diferentes parámetros existentes, entre ellos tenemos amplitud de impulso, tiempo de goteo y tamaño de gota. Se realizó la lectura de los picos polarográficos a un estándar de ácido ascórbico de concentración 4 ppm, cada uno de ellos se reporta con su lectura de picos polarográficos en μ A. En estos resultados se puede observar dos tipos de excepciones en lo que respecta a las condiciones que no registran lectura. La primera se debe a que presentan una línea base mal definida, es decir, que no es recta lo que dificulta la medida precisa de altura de pico en cm y su conversión a μ A, ejemplo de ello lo podemos observar en la figura N° 5. La segunda se refiere a la sobrecarga de corriente, esto se debe a que la corriente emitida por el estándar es mucho mayor que la intensidad de la corriente con la que se trabaja que es de 20 μ A. Los resultados obtenidos de la optimización de las condiciones de trabajo del equipo polarográfico y sus lecturas en μ A se muestran en la tabla N° 13 de anexos.

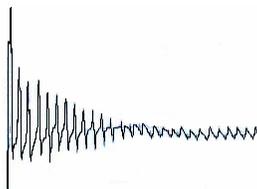


Fig. N° 5. Línea base mal definida.

Para seleccionar las condiciones mas apropiadas para trabajar se tomaron las 3 condiciones de trabajo de la tabla que presentaron mayor altura de pico con buena resolución (3.2.2; 3.5.2; 3.5.3), se repitió el análisis por triplicado para cada una de estas condiciones y se calculó el promedio de cada una de ellas. Los resultados se muestran en la tabla N° 1.

Tabla N° 1. Promedio de alturas de picos en μA para 3 diferentes condiciones.

Código	$I_p / \mu\text{A}$
3.2.2	0.007
3.5.1	0.009
3.5.2	0.010

Como se observa en la tabla anterior la condición con mayor altura de pico en μA es la 3.5.2 (amplitud de impulso 50 mV; tiempo de goteo 0.5 segundos; tamaño de gota M), por lo tanto, se procedió a realizar los análisis con estas condiciones de trabajo.

Los picos polarográficos de estos se muestran en la figura N° 6 para cada una de las condiciones seleccionadas (a) 3.2.2, (b) 3.5.1, (c) 3.5.2, donde se puede observar las alturas de los picos y la buena resolución que presentan.

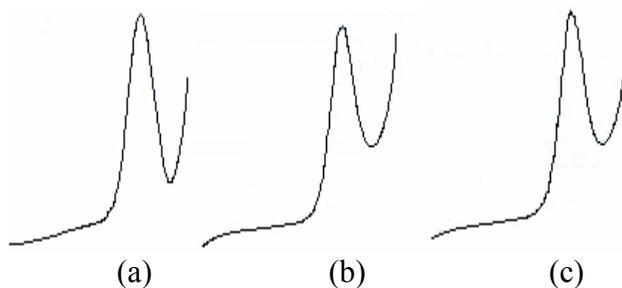


Fig. N° 6. Polarogramas de ácido ascórbico de una concentración de 4 ppm variando las condiciones de trabajo.

VI.2 Estudio de la Repetibilidad del Método.

Para efectuar el estudio de la repetibilidad de la lectura del instrumento, se realizó la lectura polarográfica a un estándar de ácido ascórbico de concentración 4 ppm durante 5 días consecutivos, cada uno de ellos con 6 réplicas. Luego se realizó el tratamiento estadístico para saber si existían diferencias significativas entre los promedios de los resultados de cada día, para ello utilizamos el análisis de varianza (ANOVA) en el cual se compara el valor de F_c con el valor de $F_{0.95}$. El criterio que se utiliza es que si $F_c > F_{0.95}$ existen diferencias entre los grupos de resultados. Para los datos de los 5 días el valor de F_c fue de 1.63 (el cual resulta de dividir el valor de la cuadrática media de las muestras entre el valor de la cuadrática media de la residual), y el valor de $F_{0.95}$ es 2.76, por lo que se puede concluir que no existen diferencias significativas entre los grupos de resultados. Esto se realizó con los datos que se presentan en la tabla N° 2.

Tabla N° 2. Lecturas en μA para un estándar de ácido ascórbico 4 ppm realizado durante 5 días consecutivos.

Replicas	Días				
	1	2	3	4	5
1	0.032	0.031	0.032	0.031	0.032
2	0.032	0.031	0.032	0.031	0.032
3	0.032	0.031	0.032	0.030	0.031
4	0.032	0.030	0.031	0.030	0.031
5	0.031	0.030	0.031	0.032	0.031
6	0.031	0.032	0.031	0.032	0.031

A estos mismos datos se les realizó una carta de control, la cual se elabora tomando en cuenta la repetibilidad (\bar{s}^2) y la precisión intermedia ($s_{\bar{x}}^2$) cuyos valores obtenidos son 4.4 E-07 y 7.17 E-07 respectivamente, los límites están dados por las siguientes fórmulas:

$$\text{Limite Central (LC)} = \frac{\sum \bar{X}_i}{5} = 0.0313$$

$$\text{Limite Superior (LC + 3S)} = 0.0335$$

$$\text{Limite Superior (LC + 2S)} = 0.0328$$

$$\text{Limite Inferior (LC - 2S)} = 0.0298$$

$$\text{Limite Inferior (LC - 3S)} = 0.0290$$

$$\text{Donde : } S = \sqrt{S^2 + S_x^2}$$

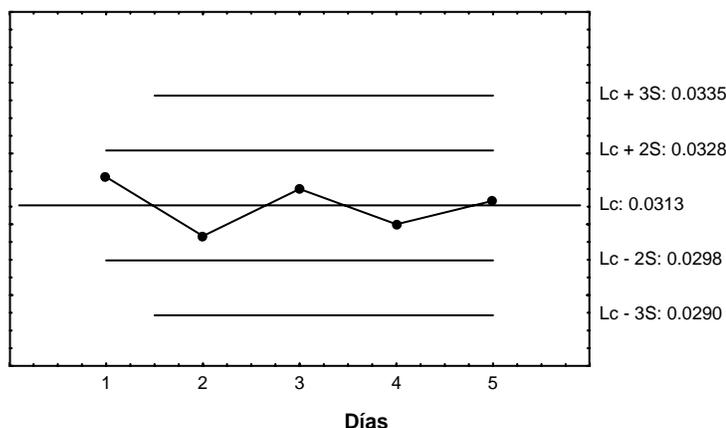


Fig. N° 7. Carta de control para el estándar de ácido ascórbico 4 ppm. Como se observa el estándar cae dentro de la zona aceptable de la carta de control.

Como se puede observar en la figura N° 7 los promedios de los grupos de resultados caen dentro de los límites de confianza por lo que se puede afirmar que existe una buena respuesta de los picos polarográficos del estándar de ácido ascórbico en el instrumento.

VI.3 Linealidad.

Para comprobar la linealidad se preparó una curva de calibración normal en un intervalo de concentraciones entre (2-12 ppm), a cada una se le realizó su lectura, la respuesta de cada concentración se muestra en la tabla N° 3.

Tabla N° 3. Linealidad. Datos de la curva de calibración normal.

Concentración de Estándar / ppm	$I_p / \mu A$
2	0.016
4	0.033
6	0.048
8	0.063
10	0.080
12	0.094

El valor del coeficiente de determinación (r^2) obtenido fue de: 0.999405507, una linealidad ideal indica un valor de coeficiente de determinación igual a 100% ($r^2 = 1$), como el valor de r^2 obtenido experimentalmente es cercano a la unidad se puede afirmar que existe una buena linealidad, así como también se puede observar la poca dispersión de los puntos al graficar concentración vs. corriente. La grafica se muestra en la figura N° 8.

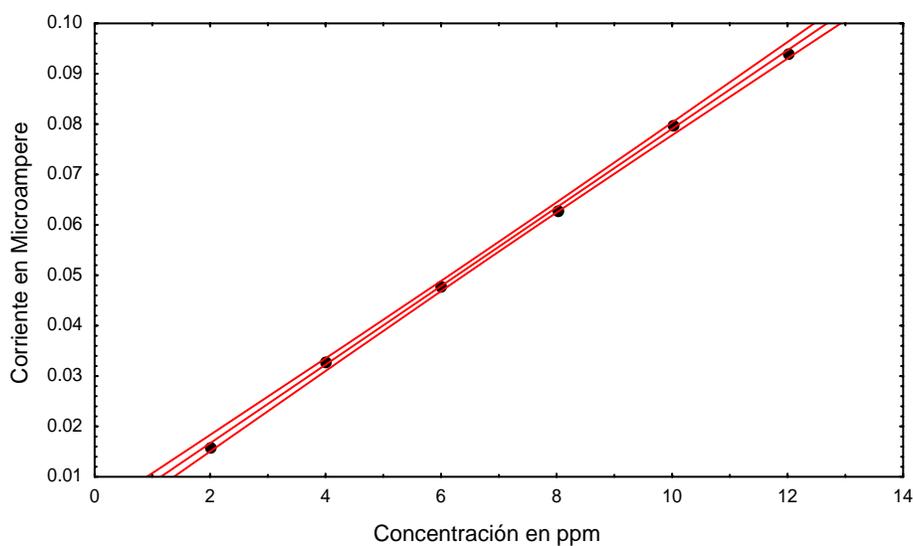


Fig. N° 8. Linealidad. Gráfico de concentración en (ppm) vs. Corriente de pico (μA).

Para verificar la validez del modelo lineal, se aplicó el análisis de varianza ANOVA a los mismos datos presentados en la tabla N° 4, obteniéndose los siguientes resultados:

Tabla N° 4. Resultados del ANOVA, control de calidad del modelo lineal.

Variación	Suma de Cuadrados	G.L.	Cuadrática Media
Modelo	0.0042588	1	0.0042588
Regresión	2.53333 E-06	4	6.33333 E-07

Se obtuvo un valor de $F_c = 6724.42$, 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 mayor que el valor de F de tabla (7.71), se puede concluir que el modelo se ajusta a una línea recta y que las variaciones son debidas al modelo y no a la residual.

VI.4 Límite de Detección y Límite de cuantificación.

El límite de detección y el límite de cuantificación se determinó a partir de una curva de calibración normal para lo cual se preparó una curva de calibración de estándares de ácido ascórbico de concentraciones muy diluidas cercanas al blanco. El intervalo de concentraciones con sus respectivas respuestas en μA se presentan en la tabla N° 5. (El gráfico de estos datos lo podemos observar en la figura N° 12 de anexos).

Tabla N° 5. Resultados de la curva de calibración normal para calcular límite de detección y límite de cuantificación.

Estándar de Ácido Ascórbico en ppm	I_p en μA
0.6	0.002
1.2	0.005
1.8	0.008
2.4	0.010
3	0.014
3.6	0.017

A estos datos realizó un análisis de regresión obteniéndose el valor de la pendiente $b_1 = 0.00495$, el valor del intercepto $b_0 = -0.00106$ y el valor de la desviación estándar del intercepto $Sb_0 = 0.000421$.

De acuerdo a las normas ISO e IUPAC la señal de detección se define como $S.D. = 3.29 * Sb_0$. Utilizando la pendiente y el intercepto del modelo de regresión se obtiene:

Límite de detección.

$$L.D. = (3.29 * Sb_0) - b_0 / b_1$$

Límite de cuantificación.

$$L.Q. = (10 * Sb_0) - b_0 / b_1$$

Sustituyendo los valores de Sb_0 , b_0 y b_1 en las ecuaciones anteriores se obtuvo el valor de 0.495 mg de ácido ascórbico/L para el límite de detección y 1.07 mg de ácido ascórbico/L para el límite de cuantificación.

VI.5 Control de calidad para la curva de calibración normal.

Para observar la repetibilidad en la curva de calibración normal se realizó una carta de control donde se presentan los límites de tolerancia de los parámetros de la regresión (intercepto y pendiente) de dichas curvas la cual se elaboró por tres días consecutivos.

Los datos de estas curvas de calibración normal se presentan en la tabla N° 14 de anexos.

Tabla N° 6. Parámetros de regresión de las curvas de calibración normal realizadas por tres días consecutivos.

Parámetros de Regresión	Días		
	1	2	3
b_0	0.00106	0.001	0.00126
b_1	0.0078	0.007785	0.007842
$b_0 \pm 2S$	-4.15E-04	-9.27E-04	-8.37E-04
	2.55E-03	2.93E-03	3.37E-03
$b_1 \pm 3S$	-1.16E-03	-1.89E-03	-1.89E-03
	3.29E-03	3.89E-03	4.42E-03
$b_0 \pm 2S$	7.61E-03	7.54E-03	7.57E-03
	7.99E-03	8.03E-03	8.11E-03
$b_1 \pm 3S$	7.51E-03	7.41E-03	7.44E-03
	8.09E-03	8.16E-03	8.25E-03

Si tomamos en cuenta que los parámetros b_0 y b_1 están correlacionados, el modelo de correlación es una elipse. La figura N° 9 muestra la forma de la carta de control. Los valores de b_0 y b_1 de las diferentes curvas de calibración deben caer dentro de la elipse. Los valores experimentales (b_0 y b_1) obtenidos durante tres días consecutivos cayeron dentro de la elipse, por lo que se puede afirmar que la linealidad es repetible para la curva de calibración normal.

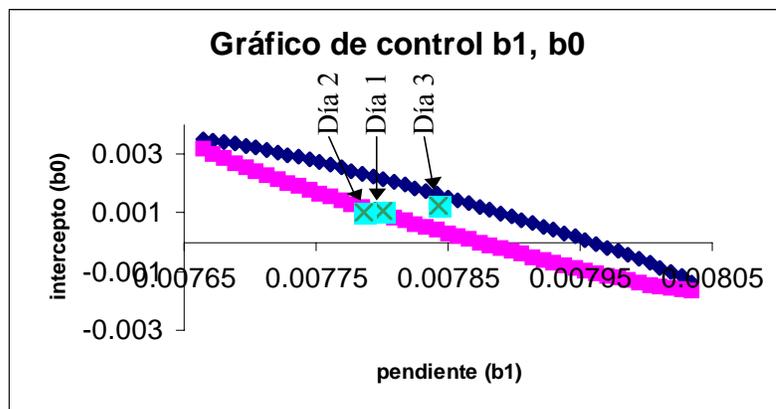


Fig. N° 9. Control de calidad de la curva de calibración normal.

VI.6 Efecto de matriz.

Con el fin de estudiar el efecto de matriz en la determinación de ácido ascórbico en muestras de leche se realizaron: una curva de calibración normal y una curva de calibración por adición patrón. Los datos de estas curvas se muestran en la tabla N° 7.

Tabla N° 7. Resultados de los valores de las curvas de calibración normal y de adición patrón.

<i>Estándar de Ácido Ascórbico en ppm</i>	<i>I_p en μA Calibración Normal</i>	<i>I_p en μA Adición Patrón</i>
2	0.016	0.021
4	0.033	0.037
6	0.048	0.052
8	0.063	0.065
10	0.080	0.084
12	0.094	0.097

Con los mismos datos presentados en la tabla anterior se realizó un gráfico el cual se muestra en la figura N° 10.

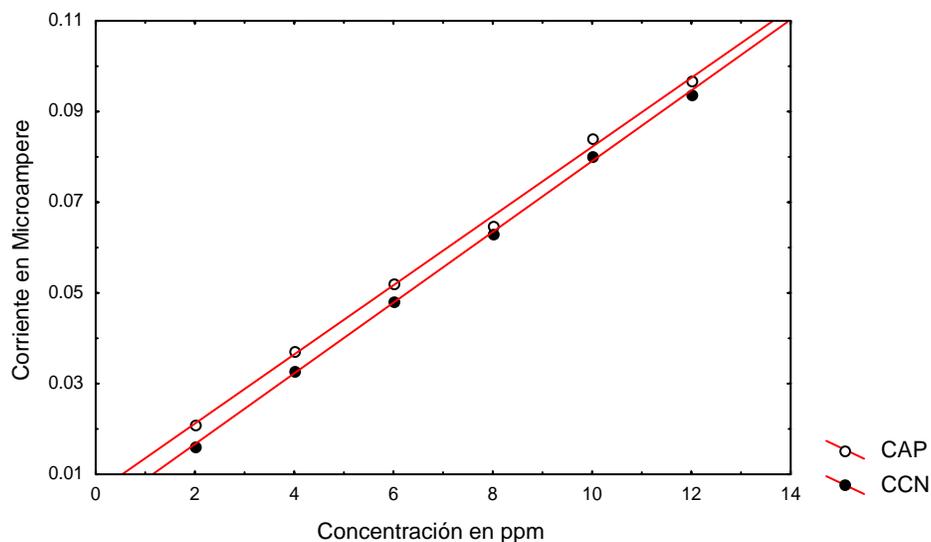


Fig. N° 10. Efecto de matriz. Curva de calibración por adición patrón, curva de calibración con estándares puros (calibración normal).

Como se puede observar en el gráfico el efecto de matriz es nulo, es decir, que los componentes de la matriz de leche no provocan ningún efecto intensificador ni depresor en la determinación de la concentración de ácido ascórbico por este método, ya que las dos curvas son paralelas entre si. Los valores de las pendientes y sus desviaciones, así como sus intervalos de confianza obtenidos de estas curvas se muestran en la tabla N° 8.

Tabla N° 8. Valores de pendientes, desviaciones estándar e intervalos de confianza.

Curva	B_1	Sb_1	LI	LS
Ad. Patrón	7.63 E-03	1.66 E-04	7.63 E-03	8.09 E-03
Std. Puros	7.80 E-03	9.51 E-05	7.54 E-03	8.06 E-03

Como se puede observar el límite inferior ($b_1 - tS b_1$) y límite superior ($b_1 + tS b_1$) para una curva de adición patrón y para una curva de estándares puros no presenta diferencias significativas, por lo que se puede afirmar que no existen diferencias en los valores de las pendientes, con esto se viene a confirmar que no existe efecto de matriz.

VI.7 Estudio de la Exactitud del Método. Porcentaje de Recuperación.

Para confirmar la exactitud del método se calculó el porcentaje de recuperación comparando las pendientes de una curva de calibración por adición patrón (CAP) y la obtenida con estándares puros. El modelo de adición patrón es $Y = 0.00593 + 0.0076 X$, el modelo para la curva de calibración con estándares puros o calibración normal (CCN) es: $Y = 0.00107 + 0.0078 X$ obtenidos de los datos de la tabla N° 7.

Para el cálculo del porcentaje de recuperación se utilizó la expresión siguiente:

$$\%R = (b_{I(CAP)} / b_{I(CCN)}) * 100$$

donde :

$b_{I(CAP)}$: Es la pendiente del modelo de regresión de la curva de calibración por adición patrón.

$b_{I(CCN)}$: Es la pendiente del modelo de regresión de la curva de calibración normal con estándares puros (calibración normal).

El resultado del % de recuperación con su incertidumbre se muestra en la tabla N° 9.

Tabla N° 9. Porcentaje de recuperación e intervalos de confianza.

	B_I	Sb_I	$\%R$	$U\%R$
<i>CAP</i>	7.63 E-03	1.66 E-04	97.80	4.87
<i>CCN</i>	7.80 E-03	9.51 E-04		

Como se puede observar se obtiene un porcentaje de 100 % por lo que podemos afirmar que nuestro método tiene una excelente exactitud.

VI.8 Evaluación de la incertidumbre en el cálculo de la concentración a partir de la curva de calibración normal.

El cálculo de la concentración de ácido ascórbico en una muestra de leche se realizó en primera instancia utilizando el modelo de regresión lineal: $i_x = b_0 + b_1 C_x$

Despejando C_x tenemos:

$$C_x = \frac{i_x - b_0}{b_1} \quad (1)$$

Luego se tomó en cuenta los efectos de dilución obteniéndose la Ec. $C_{AA} = C_x \frac{v_1 v_3}{v_2 w_1 10}$ (2)

Para calcular la incertidumbre de esta concentración se utilizó la incertidumbre debida al modelo de regresión lineal simple la cual se calcula con la ec. (3), mas la incertidumbre debida a los efectos de dilución mostrados en la ec. (5).

$$U_M = Sx_0 = \frac{S_{y/x}}{b_1} \left\{ 1 + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - \bar{y})^2}{b_1^2 \sum_i (x_i - \bar{x})^2} \right\}^{1/2} \quad (3)$$

La cual se obtiene aplicando la ley de propagación del error a la ecuación (2) dando como resultado la siguiente expresión:

$$\left(\frac{U_{Fd}}{C_{AA}} \right)^2 = \left(\frac{U_{w_1}}{w_1} \right)^2 + \left(\frac{U_{v_1}}{v_1} \right)^2 + 2 \left(\frac{U_{v_2}}{v_2} \right)^2 + \left(\frac{U_{v_3}}{v_3} \right)^2 \quad (4)$$

Por tanto la incertidumbre para el factor de dilución esta dada por la siguiente expresión:

$$U_{Fd} = C_{AA} \sqrt{\left(\frac{U_{w_1}}{w_1} \right)^2 + \left(\frac{U_{v_1}}{v_1} \right)^2 + 2 \left(\frac{U_{v_2}}{v_2} \right)^2 + \left(\frac{U_{v_3}}{v_3} \right)^2} \quad (5)$$

Donde:

U_{Fd} = Incertidumbre de los factores de dilución.

U_{w_1} = Incertidumbre de la balanza analítica.

U_{v_1} = Incertidumbre del balón de 10 ml.

U_{v_2} = Incertidumbre de la micropipeta de 100 μL .

U_{V_3} = Incertidumbre del balón de 5ml.

W_1 = Peso de fórmula para lactantes (0.2002g).

V_1 = Volumen de dilución de la muestra (10 ml).

V_2 = Alícuota tomada de la muestra de extracto filtrado (200 μ L).

V_3 = Volumen de dilución de V_2 (5 ml).

C_{AA} = Concentración de ácido ascórbico en la muestra de leche.

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

$$U_{CAA} = \sqrt{U_M^2 + U_{Fd}^2} \quad (6)$$

VI.9 Resultados obtenidos por la curva de calibración normal (estándares puros).

Debido a que en los resultados anteriores se comprobó que no existe efecto de matriz entre las curvas de adición patrón y calibración normal, solamente se calculó la concentración a partir de una curva de calibración normal (estándares puros) y sus respectivas incertidumbres de dilución y del modelo de regresión lineal.

Esta curva de calibración normal se realizó con el procedimiento V.3.5.1, sin embargo, para la muestra se utilizó el procedimiento V.3.5.2 pero sin agregar estándar de ácido ascórbico, los picos polarográficos obtenidos para la muestra se pueden observar en la figura N° 11.

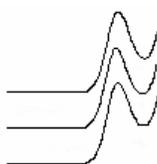


Figura N° 11. Polarogramas obtenidos para la concentración de la muestra (analito).

Los resultados de las mediciones se reflejan en la tabla N° 10, donde se presentan las diferentes respuestas de las muestras de leche en μ A.

Tabla N° 10. Resultados en μA de las muestras de ácido ascórbico en formula para lactantes.

Muestra (M)	Réplicas (μA)			Promedio (μA)
		0.005	0.006	0.005

La tabla N° 11 muestra los diferentes parámetros para calcular la incertidumbre de la concentración de ácido ascórbico.

Tabla N° 11. Parámetros, Incertidumbres absolutas, estándares y relativas.

Parámetros (P)	Balanza y Volumétricos	Incertidumbre Absoluta (a)	Incertidumbre Estándar U_e	Incertidumbre Relativa (U_e/P) ²
$W_1 = 0.2002$ g	Balanza analítica Sartorius	0.0001	$5.1E-05$ (a / 1.96)	$1.42 E-04$
$V_1 = 10$ ml	Balón de 10 ml Clase A	0.025	0.010 (a / $\sqrt{6}$)	$1.38 E-06$
$V_2 = 200$ μL	Micropipeta Labsystems de 100 μL	0.09	0.037 (a / $\sqrt{6}$)	$2.70 E-07$
$V_3 = 5$ ml	Balón de 5 ml Clase A	0.02	0.0082 (a / $\sqrt{6}$)	$1.77 E-05$

La incertidumbre absoluta (a) de la balanza y de volumétricos tales como balones, buretas, pipetas, etc., es especificada por el fabricante. Para el caso del balón de 5 y 10 ml Clase A, por ejemplo, la incertidumbre especificada es 0.02 y 0.025 ml respectivamente. Esta incertidumbre tiene una distribución triangular y la incertidumbre estándar se calcula dividiendo (a) entre la raíz de 6. Para el caso de una balanza analítica se divide (a) entre 1.96 que es una distribución normal.

Se obtiene la concentración de ácido ascórbico (C_{AA}) en una muestra de leche (ecuación 2) tomando en cuenta que los parámetros de regresión b_0 y b_1 son $1.07 E-03$ y $7.80 E-03$ respectivamente. El cálculo de concentración y las incertidumbres involucradas en el proceso analítico (ecuaciones 3, 5 y 6) se presentan en la tabla N° 12.

Tabla N° 12. Concentración de ácido ascórbico en fórmula para lactantes y sus incertidumbres.

C_{AA}	U_{Fd}	U_M	$U_{C_{AA}}$
63.03	0.800	0.0895	0.806

El intervalo de confianza de la concentración de ácido ascórbico en la muestra de leche utilizando su incertidumbre expandida $C_{AA} \pm 2 U_{C_{AA}}$ es el siguiente: 63.03 ± 1.61 mg de ácido ascórbico por cada 100g de leche en polvo.

Según las normas Codex Alimentarius la cantidad mínima de ácido ascórbico (vitamina C) que deben contener las formulas para lactantes debe ser de 8 mg por cada 100 kilocalorías, lo que equivale 41.84 mg por cada 100 gramos.

Este cálculo de concentración experimental se comparó con la concentración de referencia, que en este caso, es el que traen los potes de leche en polvo a los cuales se les determinó la concentración. La concentración de referencia nos dice que esta leche contiene 60 mg de ácido ascórbico por cada 100 gramos de leche en polvo lo que equivale a 12 mg por cada 100 kilocalorías y la concentración experimental nos muestra un resultado de 63.03 mg por cada 100 gramos de leche en polvo lo que equivale a 12.61 mg por cada 100 kilocalorías.

VII. CONCLUSIONES

El método de polarografía diferencial de impulsos se puede aplicar para la determinación de ácido ascórbico en muestras de fórmula para lactantes (leche en polvo) ya que demostró buena exactitud y buena linealidad en un buen rango de aplicación.

Se realizó la optimización de las condiciones de trabajo para obtener los picos polarográficos en los que se observó una buena resolución, además de una buena línea de base, la cual se utiliza para medir correctamente la altura de estos picos.

Existe una buena repetibilidad, esto se demostró a través de las cartas de control tanto para el estándar como para la curva de estándares puros (Curva de calibración normal).

No existe efecto de matriz en la determinación de ácido ascórbico en fórmula para lactantes (leche en polvo), esto se determinó comparando las pendientes de la curva de calibración normal y curva de adición patrón, encontrándose que la matriz no provocó ningún efecto intensificador o depresor de la señal.

En la determinación de ácido ascórbico en fórmula para lactantes (leche en polvo) esta se calculó utilizando la curva de calibración normal obteniéndose concentraciones con incertidumbres pequeñas, de tal manera, que este método se puede aplicar para la determinación de ácido ascórbico en fórmula para lactantes.

Se puede afirmar que los valores de concentración experimentales no difieren de los valores de concentración de referencia, tomando en cuenta que los valores de referencia no poseen un valor de incertidumbre con el cual se logre comparar el margen de error de ácido ascórbico en leche en polvo.

VIII. RECOMENDACIONES

- Realizar un estudio con un diseño experimental en el cual se pueden incluir algunos factores como: solvente de extracción, tiempo de agitación, cantidad de fórmula para lactantes (leche en polvo) utilizada.
- Determinar el tiempo de vida útil para un estándar de ácido ascórbico.
- Utilizar una muestra certificada para la determinación de ácido ascórbico en fórmula para lactantes, debido a que esta posee valores de incertidumbres certificados por el fabricante.

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Pravia Díaz, Evaristo. Determinación cuantitativa del contenido de ácido ascórbico en algunos preparados comerciales. León, Nicaragua. UNAN, 1967.
2. López Prado, Rosa Argentina. Estudio comparativo de varios métodos de valoración de ácido ascórbico en algunas formas farmacéuticas. León, Nicaragua. UNAN 1969.
3. Aranda Palacios, Luis Alberto. Determinación de ácido ascórbico y almidón en la papa irradiada con rayos gamma. UNAN, 1968.
4. Moreno García, María Cecilia. Validación del método de polarografía clásica para determinación de vitamina C en cítricos. León, Nicaragua. UNAN, 2003.
5. Norma del Codex para fórmula para lactantes. Codex stan 72-1981.
6. Conocimientos actuales sobre nutrición / Editores Ekhard E. Ziegler y F. J. Filer; Traducido al español Organización Panamericana de la Salud e Instituto Internacional de Ciencias de la Vida – 7ª edición – Washington D. C. OPS, ILSI 1997, c 1996.
7. The Merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals / Susan Budavari, Editor [et all] 12ª ed. White House Station, N.J. Merck, 1996.
8. Herrera, E. (Eds). Bioquímica. Aspectos estructurales y vías metabólicas 2ª ed. Interamericana Mc Graw-Hill. Madrid, 1991.
9. Ian D. Podmore et all. “Vitamin C exhibits pro-oxidant properties” Nature, Vol. 392, page 559, 9 April 1998.
10. Haro, J. F. Et all. Efecto de la vitamina C en la absorción de hierro de zumos enriquecidos con pirofosfato férrico. Nutrición Hospitalaria. XVI (5) 188-188. c 2001.
11. Conocimientos actuales sobre nutrición / Editores Bárbara A. Bowman, Robert M. Russel - 8ª edición – Washington D. C.: OPS, OMS, 2003, c 2001. Traducción de Present Knowledge in Nutrition.
12. Dietary Reference Intakes for vitamin C, vitamin E, Selenium and Carotenoids. Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, NATIONAL ACADEMY PRESS, Advance Copy 3;6-7, 2000.



13. Principios de análisis instrumental. Quinta edición. Douglas A. Skoog, F. James Huller, Timothy A. Nieman c. 2001. Mc Graw-Hill / Interamericana de España. Traducido de la 5ª edición en inglés de Principles of Instrumental Analysis.
14. Harris D. C. Análisis químico cuantitativo, 2001.
15. Clifford, A. A., "Multivariate Error Analysis", Applied Science Publishers L.T.D., London, 1973.
16. Analytical Chemical Acta 335 / 196 / 201-207.
17. Jorge Chacón, "Curso teórico práctico en aspectos técnicos de control de calidad interno del laboratorio de análisis". CIRA / UNAN-Managua, 1999.
18. Fernando Burriel Marti, Lucena Conde, "Aspecto técnico del control de calidad interna de laboratorio de análisis químico", 1999.

X. ANEXOS

Tabla N° 13. Optimización de las condiciones de trabajo.

Código	Electrodo	Amplitud de Impulso / mV	Tiempo de Goteo / seg.	Tamaño de Gota	Altura de Pico / μA
3.1.1	HMDE	25	0.2	S	**
3.1.2	HMDE	25	0.2	M	**
3.1.3	HMDE	25	0.2	L	**
3.2.1	HMDE	25	0.5	S	0.004
3.2.2	HMDE	25	0.5	M	0.007
3.2.3	HMDE	25	0.5	L	-
3.3.1	HMDE	25	1	S	0.003
3.3.2	HMDE	25	1	M	0.004
3.3.3	HMDE	25	1	L	-
3.4.1	HMDE	50	0.2	S	*
3.4.2	HMDE	50	0.2	M	**
3.4.3	HMDE	50	0.2	L	*
3.5.1	HMDE	50	0.5	S	0.01
3.5.2	HMDE	50	0.5	M	0.01
3.5.3	HMDE	50	0.5	L	-
3.6.1	HMDE	50	1	S	0.004
3.6.2	HMDE	50	1	M	0.006
3.6.3	HMDE	50	1	L	-
3.7.1	HMDE	100	0.2	S	**
3.7.2	HMDE	100	0.2	M	**
3.7.3	HMDE	100	0.2	L	**
3.8.1	HMDE	100	0.5	S	**
3.8.2	HMDE	100	0.5	M	**
3.8.3	HMDE	100	0.5	L	**
3.9.1	HMDE	100	1	S	**
3.9.2	HMDE	100	1	M	**
3.9.3	HMDE	100	1	L	**

(*) Línea base mal definida.

(**) Sobrecarga de corriente.

S = pequeña

M = mediana

L = grande

Tabla N° 14. Lecturas en μA de las curvas de calibración normal realizadas durante tres días consecutivos.

Estándar de ácido ascórbico en ppm	Días		
	1	2	3
2	0.016	0.016	0.016
4	0.033	0.033	0.033
6	0.048	0.048	0.049
8	0.063	0.062	0.064
10	0.080	0.080	0.081
12	0.094	0.094	0.094

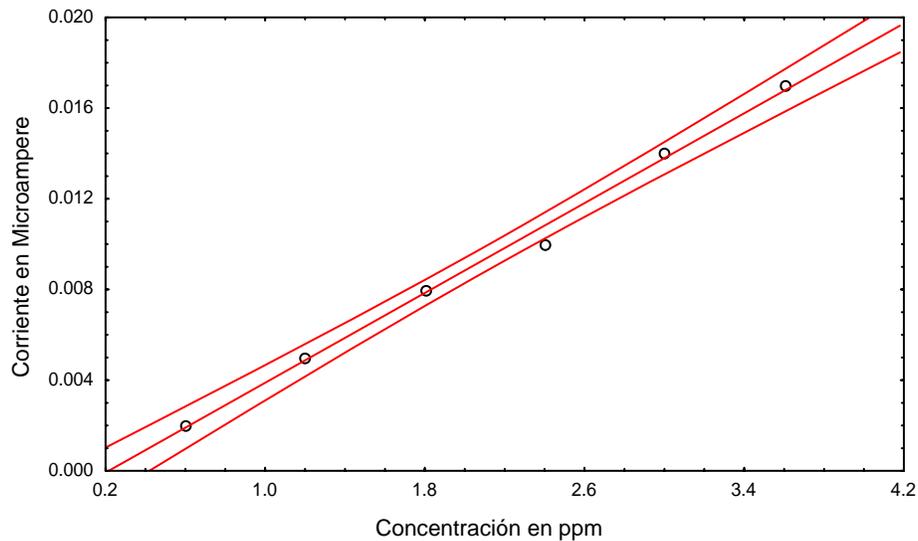


Figura N° 12. Curva de calibración normal para calcular límite de detección y límite de cuantificación.

**Determinación de ácido ascórbico en formula para lactantes.
Polarografía diferencial de impulsos.**

