

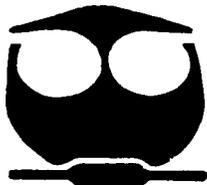


**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

NUEVO METODO POR ESPECTROFOTOMETRIA UV CON
SEGUNDA DERIVADA PARA LA DETERMINACION DE
ACIDO ASCORBICO EN JUGOS DE FRUTA PROCESADOS

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA DE ALIMENTOS
P R E S E N T A :
ERIKA MARIA RAMIREZ MAYA



MEXICO, D. F.

2002



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

I



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Paginación

Discontinua

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Ernestina Cervera Flores

Vocal: María del Carmen Sansón Ortega

Secretaria: Lucía Cornejo Barrera

1er. Suplente: Georgina Artemisa Duarte Lisci

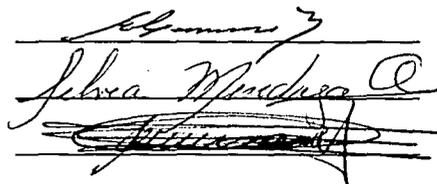
2do. Suplente: Luz Sandra Sánchez del Ángel

Sitio donde se desarrolló el tema: Anexos de los laboratorios 3A y 3B del Departamento de Química Analítica, Edificio A; Facultad de Química. UNAM.

Asesora: Ernestina Cervera Flores

Supervisora técnica: Silvia Mendoza Arellano

Sustentante: Erika María Ramírez Maya



Ernestina Cervera Flores
Silvia Mendoza Arellano
Erika María Ramírez Maya

AGRADECIMIENTOS:

A mis padres y hermanos:

Por su apoyo incondicional, cariño y ejemplo.

A las maestras Ernestina Cervera F. y Silvia Mendoza A.:

Por su asesoría para el desarrollo de esta tesis y por su amistad.

A la maestra Carmen Sansón Ortega:

Por la asesoría y apoyo técnico en el desarrollo de esta tesis.

A la maestra Lucía Cornejo Barrera:

Por su asesoría y revisión de esta tesis.

ÍNDICE:

	Pág.
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS GENERALES	4
I.- FUNDAMENTOS TEÓRICOS	5
<i>Ácido ascórbico</i>	6
<i>Jugos de fruta procesados</i>	12
<i>Método oficial AOAC 967.21. Determinación de ácido ascórbico en preparados vitamínicos y jugos de fruta</i>	15
<i>Espectroscopia ultravioleta-visible (UV-VIS)</i>	16
<i>Espectrofotometría Ultravioleta-Visible con Segunda Derivada</i>	29
<i>Extracción en fase sólida y columnas de extracción</i>	33
II.-DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO	37
<i>Determinación de ácido ascórbico en jugo de uva procesado aplicando el método propuesto por la AOAC</i>	38
<i>Determinación del ácido ascórbico por Espectrofotometría UV</i>	38
<i>Determinación del ácido ascórbico por Espectrofotometría UV con segunda derivada</i>	41
<i>Determinación cuantitativa de ácido ascórbico por espectrofotometría UV</i>	42
<i>Comprobación de la reproducibilidad de resultados y estabilidad del ácido ascórbico</i>	45
<i>Condiciones de trabajo</i>	47
<i>Estabilidad de ácido ascórbico en diferentes medios de disolución</i>	52
<i>Preparación de la muestra para el análisis</i>	55
<i>Análisis de néctares de fruta</i>	59
<i>Metodología propuesta para la determinación de ácido ascórbico por espectrofotometría UV con segunda derivada en jugos de fruta procesados</i>	60

III.-COMPROBACIÓN DEL MÉTODO	65
<i>Curva patrón de trabajo</i>	66
<i>Comprobación de la linealidad y la respuesta de la curva patrón con diferentes disoluciones estándar de ácido ascórbico</i>	68
<i>Resultados de disoluciones estándar de ácido ascórbico</i>	69
<i>Análisis estadístico de los datos obtenidos por las metodologías UV y UV con Segunda Derivada (SD)</i>	74
<i>Resumen de pruebas estadísticas. Estadísticas teóricas y calculadas para la prueba t-Student y prueba F</i>	74
<i>Comparación del método AOAC por titulación directa con 2,6-diclorofenolindofenol y el método UV con segunda derivada para la cuantificación de ácido ascórbico</i>	75
<i>Análisis estadístico de los datos obtenidos por las metodología propuesta por la AOAC titulación con 2,6- diclorofenolindofenol y UV con Segunda Derivada (SD)</i>	77
<i>Comprobación de la repetibilidad de absorbancias obtenidas. Determinación de ordenada al origen, pendiente y coeficiente de correlación del método UV con segunda derivada</i>	78
<i>Establecimiento del límite de detección y límite de cuantificación del método UV con segunda derivada propuesto para la determinación de ácido ascórbico en jugos procesados</i>	81
IV.-APLICACIÓN DEL MÉTODO	84
<i>Resultados experimentales obtenidos para el Jugo de uva, manzana y néctar de manzana marca Del Valle por las metodologías UV y UV con segunda derivada (SD)</i>	85
<i>Resumen del contenido de ácido ascórbico en 240 mL de jugo por los métodos UV y UV con segunda derivada</i>	88
<i>Análisis estadístico de los datos obtenidos por las metodologías UV y UV con Segunda Derivada (SD)</i>	88
<i>Comparación del método AOAC con el método propuesto UV con segunda derivada (SD) para néctar de manzana</i>	89
<i>Comparación del contenido de ácido ascórbico obtenido por el método propuesto UV con Segunda Derivada y las Normas Oficiales Mexicanas</i>	92

V.-CONCLUSIONES.....	94
VI.-APÉNDICE A: DEFINICIONES Y PRUEBAS ESTADÍSTICAS.....	97
VII.-BIBLIOGRAFÍA.....	113

INTRODUCCIÓN:

El ácido ascórbico, mejor conocido como vitamina C, es un compuesto con propiedades oxido reductoras, de baja toxicidad, con actividad nutricional y de gran aplicación en la industria farmacéutica y alimentaria; por lo que su determinación analítica es de gran interés.

Existen numerosos métodos para la determinación del ácido ascórbico en alimentos pero ningún procedimiento es totalmente satisfactorio, debido a la falta de especificidad y a la existencia de numerosas sustancias que interfieren en su cuantificación¹.

Los métodos de mayor aplicación son los siguientes²:

- Yodo: Método estándar en farmacopeas, de amplio intervalo analítico, no específico.
- Cloramina-T: Utiliza KI y almidón, se emplea en el análisis de mezclas con sulfitos, glutatión, cistina y preparados farmacéuticos que no contengan otras sustancias oxidables.
- 2,6-Diclorofenolindofenol: Reactivo estándar redox poco específico, inestable, aplicable en el control de zumos de frutos que no requieran gran exactitud.
- 2,4,6-Tris-(2-piridil)-s-triazina: Complejo colorido con hierro, método clínico, determinación de ácido Ascórbico y ácido Dehidroascórbico.
- 2,4-Dinitrofenilhidrazina: Determinación del ácido ascórbico total, clásico método colorimétrico, la reacción se ve afectada por otras sustancias oxidantes, se utiliza principalmente en análisis clínicos.

¹ Fennema O., *Química de alimentos*. Págs. 555.

² Elvers B., Hawkins S., *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Págs. 550.

- **2-nitroanilina diazoada:** Aplicable en muestras biológicas (orina, por ejemplo), alimentos, estudios farmacológicos, necesita un blanco de corrección.
- **o-Fenilendiamina:** Método oficial para el análisis de alimentos, método fluorimétrico.
- **Ácido ascórbico oxidasa:** Método enzimático que cuantifica el contenido de ácido ascórbico utilizando enzima aislada, aumenta la especificidad, se utiliza en análisis clínicos y en alimentos.
- **Métodos electroquímicos:** Miden la oxidación específica del ácido ascórbico en un electrodo, procedimiento automatizado.
- **HPLC con detector Ultravioleta (UV):** se determina el ácido ascórbico total.
- **HPLC, derivatización con DNPH:** Detección electroquímica, utilizada para el análisis de fluidos biológicos, determina ácido isoascórbico y ácido ascórbico.

El método oficial para la determinación de vitamina C en jugos es el método propuesto por la AOAC por titulación directa con el indicador redox 2,6-diclorofenolindofenol, donde se aprovechan las propiedades oxido reductoras del ácido ascórbico. Este método presenta el problema que en jugos coloridos el cambio de color de este indicador es difícil de observar.

Los métodos espectrofotométricos por Ultravioleta (UV) son una buena alternativa para la cuantificación de vitamina C; estos métodos no pueden ser aplicados en jugos y néctares de fruta procesados debido que estos productos poseen matrices complejas que contienen sustancias con grupos cromóforos que absorben en las mismas longitudes de onda que el ácido ascórbico y alteran los resultados.

La Espectroscopia Ultravioleta con derivadas revela detalles espectrales que se pierden en un espectro ordinario, por lo que esta técnica resulta de gran utilidad para obtener información de espectros donde la absorción de la radiación de dos o más cromóforos se sobreponen.

En este trabajo se propone un método analítico cuantitativo para la determinación de ácido ascórbico en jugos procesados basados en la técnica de Espectrofotometría UV con derivadas.

OBJETIVOS GENERALES:

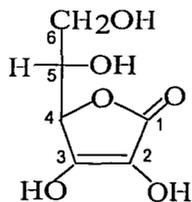
- Desarrollar un método para la determinación de ácido ascórbico (vitamina C) en jugos de fruta procesados por Espectrofotometría UV con segunda derivada.
- Utilizar la Espectrofotometría UV con segunda derivada para minimizar errores de cuantificación por la presencia de otros cromóforos en la muestra.
- Utilizar extracción en fase sólida para eliminar el color de un jugo procesado.
- Comparar los resultados obtenidos del contenido de ácido ascórbico por el método desarrollado y los obtenidos con el método establecido por la AOAC.
- Comparar los resultados obtenidos del contenido de ácido ascórbico en un jugo por el método desarrollado con los límites máximos establecidos en las Normas Oficiales Mexicanas para estos productos.

CAPÍTULO 1
FUNDAMENTOS TEÓRICOS

ÁCIDO ASCÓRBICO

I.-Estructura:

Figura 1. Estructura del ácido ascórbico (vitamina C)



El ácido ascórbico posee propiedades ácidas y fuertemente reductoras, debidas a su estructura de lactona provista de un grupo enodiol conjugado con el grupo carbonilo de la lactona.

II.-Propiedades físicas y químicas¹:

Apariencia: cristales incoloros o polvo de color blanco, inodoros y con gusto ácido.

Fórmula: C₆H₈O₆.

Peso molecular: 176.3 g/mol

Forma cristalina: monocíclica, usualmente planos, algunas veces agujas.

Temperatura de fusión: 190-192 °C.

Densidad: 1.65 g/cm³.

Rotación óptica: $[\alpha]_D^{25}$ en agua: +20.5° a +21° (c=1).

$[\alpha]_D^{20}$ en etanol: +52° (c= 0.5).

$[\alpha]_D^{20}$ en metanol: +49.5° (c= 0.5)

pH: 3 (5 g/L); 2 (50 g/L).

¹ Los libros consultados para recopilar esta información fueron:
Budabari, S., O'Neil M., Smith A. and Heckelman. (eds.): *The Merck Index*. Pág. 105.
Belitz, H. D., Grosch, W., *Química de alimentos*. Pág. 445.
Elvers, B.-Hawkins, S., Op. Cit. Pág. 548.

pK₁: 4.17 (C3-OH).

pK₂: 11.57 (C2-OH).

Potencial óxido reducción: $E^{\circ}_0 = +0.127 \text{ V}$

Solubilidad g/mL: 0.33 en agua

0.02 en etanol absoluto

0.01 en glicerol USP

0.05 en propilenglicol

insoluble en éter, benceno, aceites.

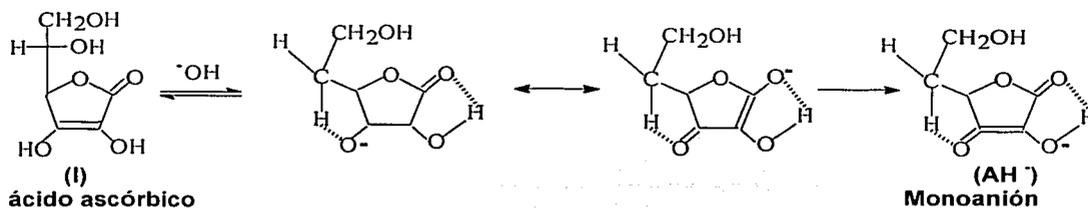
Absorción UV del ácido ascórbico a diversos valores de pH

pH	λ_{max}
2	245 nm
6-10	265 nm
>10	294 nm

II.1.-Acidez

El ácido ascórbico es un ácido débil, dibásico y con propiedades fuertemente reductoras. Los grupos hidroxilo del C2 y C3 son ácidos, la acidez del ácido ascórbico en solución es debida al monoanión formado por la disociación de un protón del hidroxilo del C3 que se ioniza con rapidez ($\text{pK}_1 = 4.1$). La pérdida de un protón del hidroxilo del C2 da un monoanión sin estabilización por resonancia por lo que la segunda disociación es menos favorable al formarse una molécula negativamente cargada (AH^-), por lo que el segundo grupo hidroxilo es mucho más resistente a la ionización como lo indica el valor más alto de pK ($\text{pK}_2 = 11.5$).

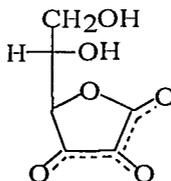
Figura 2. Monoanión formado por la disociación del grupo hidroxilo del C²



II.2.-Radical intermediario:

La formación de un radical intermediario en la oxidación del ácido ascórbico a ácido dehidroascórbico es la propiedad más singular del ascorbato (figura 3).

Figura 3. Estructura del ión ascorbato



El proceso de oxidación es reversible y se realiza en dos etapas con la formación del radical anión (A^{•-}) como intermediario. El radical (A^{•-}) tiene un electrón sin aparear distribuido por todo el sistema conjugado tricarbonilo. El radical anión es muy estable y no reactivo, se reestructura por autoreacción, terminándose la reacción en cadena por radicales libres. El ácido ascórbico forma sales monobásicas con bases, las sales dibásicas son inestables, en el ascorbato de sodio (C₆H₇O₆Na) y ascorbato de calcio [(C₆H₇O₆)₂ Ca H₂O] el metal está asociado al átomo de O en la

² Wong D. W. S., *Química de los alimentos, mecanismos y teoría*. Pág. 405.

posición del C3. La carga negativa del monoanión del ascorbato es deslocalizada en un sistema π -enlace, el cual explica su estabilidad³.

III.-Fuentes de Vitamina C:

Las frutas y las verduras son las principales fuentes de vitamina C⁴. La vitamina C se encuentra casi exclusivamente en alimentos de origen vegetal, las fuentes normales son los vegetales de hojas y los frutos cítricos, aunque se encuentra también en cantidades apreciables en las guayabas, grosellas negras y rojas, fresas, perejil, pimientos verdes, tomates y en distintas clases de coles de la familia *Brassica*. La leche humana contiene cuatro veces más vitamina C que la leche de vaca⁵.

Tabla 1. Contenido de vitamina C en algunos alimentos

Contenido de Vitamina C en algunos alimentos mg/100g de muestra ⁶ .			
Guayaba	300	Toronja	40
Grosellas negras	200	Mango	30
Pimientos verdes	100	Jugo de naranja	25-45
Berros	60	Frambuesas	25
Fresas	60	Espinacas cocidas	25
Jugo de limón	50	Camote	25
Naranjas	50	Piña, enlatada en jugo	20-40
Melón	50	Tomates	20

El ácido ascórbico que se encuentra en el mercado se produce por síntesis. La materia prima para la producción del ácido ascórbico es el sorbitol, una hexosa

³ Crawford, T. C., S.A. Crawford, *Synthesis of L-Ascorbic Acid*. Pág. 105.

⁴ Robinson, D., *Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos*. Pág.352.

⁵ Lloyd, L.E.-Mc Donald, *Fundamentos de Nutrición*. Pág. 208..

⁶ Los libros consultados para recopilar esta información fueron:
Kirk, R., *Composición y análisis de los alimentos de Pearson*. Pág. 755-762.
Evers, B.-Hawkins, S., Op. Cit. Pág. 551

presente en diversas frutas que se obtiene industrialmente por hidrogenación de la glucosa.

IV.-Metabolismo, funciones fisiológicas y requerimientos diarios de Vitamina C:

El ácido ascórbico se absorbe en el intestino delgado y se excreta en la orina, el organismo carece de reservas de vitamina C excepto los tejidos con alta actividad metabólica .

Debido a que se deriva de una hexosa, se puede considerar a la vitamina C como un hidrato de carbono. Se presenta en dos formas, ambas biológicamente activas: el ácido ascórbico (forma reducida) y el ácido dehidroascórbico (forma oxidada). Estas sustancias se oxidan y se reducen con facilidad en forma reversible, pero si el ácido dehidroascórbico se continúa oxidando hasta ácido dicetogulónico, reacción que no es reversible, el compuesto pierde su actividad vitamínica.

Figura 4. Estructuras del ácido ascórbico, ácido dehidroascórbico, ácido dicetogulónico y su actividad biológica



La propiedad química más importante de la vitamina C es su capacidad para oxidarse y reducirse, por lo tanto es muy probable que actúe como transportador de hidrógeno en la respiración celular. El ácido ascórbico en su forma oxidada es capaz de captar hidrógenos del glutatión y pasarlos al oxígeno molecular. Sin embargo, una

reacción como ésta no ha sido todavía aceptada en el esquema general del metabolismo intermedio⁷.

La vitamina C desempeña muchas funciones importantes en el organismo. Aumenta la absorción de hierro, contribuye a la formación de los huesos, dientes y tejidos, acelera la cicatrización de las heridas, ayuda a mantener la elasticidad de la piel, interviene en la producción de hormonas y mejora la resistencia a infecciones, hipertensión, arteriosclerosis y al cáncer. La vitamina C es un importante antioxidante hidrosoluble intracelular⁸.

La Ingesta Diaria Recomendada de vitamina C (IDR) es de 60 mg para los adultos sanos⁹, algunos factores aumentan las necesidades de vitamina C, por ejemplo, los climas muy cálidos o muy fríos, el humo y la píldora anticonceptiva¹⁰.

La deficiencia de vitamina C en el hombre produce escorbuto, los síntomas son: hemorragias debido al aumento de la fragilidad capilar, tumefacción de las encías y anemia. En los estados crónicos se observa una disminución de peso, dolor de las articulaciones y mala cicatrización de las heridas.

V.-Usos industriales de la vitamina C:

Las propiedades químicas del ácido ascórbico permiten una variedad importante de aplicaciones industriales. Cerca de un tercio de la producción total es usado para preparaciones vitamínicas en la industria farmacéutica. El resto es principalmente aplicado como aditivo en los alimentos para mejorar la calidad y estabilidad de los productos alimenticios.

⁷ Lloyd, L.E., Mc Donald. Op. Cit. Pág. 206.

⁸ Tolonen, M., *Vitaminas y minerales en la salud y la nutrición*. Pág. 152.

⁹ Ingesta Diaria Recomendada por el Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán.

¹⁰ Tolonen M., Op. Cit. Pág. 151

El ácido ascórbico en la industria alimentaria tiene diversas aplicaciones entre las que destacan:

- a) Inhibición de la formación de nitrosamina en productos cárnicos, estabilización del color de la carne, fijación del color de la carnes curadas.
- b) Protección enzimática en frutas y vegetales procesados.
- c) Fortificación nutricional de alimentos y bebidas
- d) Mejoramiento en la calidad de los sabores
- e) Antioxidante para evitar la descomposición de aceites, vinos, cerveza, leche y productos lácteos.
- f) Incremento de la claridad en vinos y cervezas.
- g) Mejora de la masa panaria.

JUGOS DE FRUTA PROCESADOS

Los jugos de frutas son los productos alimenticios obtenidos de la expresión de fruta madura, sana, limpia y libre de cáscara y semillas, finamente dividida y tamizada en caliente, sin diluir, ni fermentar, adicionado de edulcorantes nutritivos y aditivos alimenticios permitidos, envasados herméticamente cerrados y sometidos a un proceso de pasteurización que asegure su conservación, los jugos de fruta no deben llevar pulpa del fruto en suspensión.

Los jugos que se derivan de frutas cítricas se exprimen en un escariador, el jugo es colado, pasteurizado (al instante) y envasado en botellas que son selladas. Algunas veces se les adiciona azúcar. Los jugos concentrados se preparan por destilación a presión reducida o por congelación¹¹.

¹¹ Kirk, R., Op. Cit. Pág. 218 y 219.

I.-Néctares de frutas:

Los néctares de fruta se obtienen por homogeneización de la pulpa de fruta, o bien de frutas enteras, con adición de azúcar y agua, en algunos casos ácido cítrico y ascórbico. La proporción de fruta en el producto final es del 25 al 50%.

Las frutas a partir de las cuales se elaboran se someten a lavado, pretrituración y calentamiento con objeto de inactivar las enzimas. La pasta así obtenida se trata con mezclas de enzimas pectinolíticas y celulolíticas, para realizar la maceración, es decir, una desintegración del tejido del fruto manteniendo al mismo tiempo la estructura intacta de las células. Las pectinas altamente esterificadas y de gran peso molecular obtenidas a partir de la protopectina determinan que estos productos posean una alta viscosidad y una buena estabilidad de la turbidez. Por último estos productos se someten a tamizado en caliente, se mezclan con los aditivos necesarios, se homogeneizan y se pasteurizan¹².

II.-Análisis de jugos de fruta:

Los análisis de jugos de fruta pueden incluir la determinación de sólidos totales, acidez, cenizas, alcalinidad de las cenizas, fosfato, potasio, nitrógeno, azúcares, vitamina C, metales traza y conservadores.

II.1.- Determinación de vitamina C:

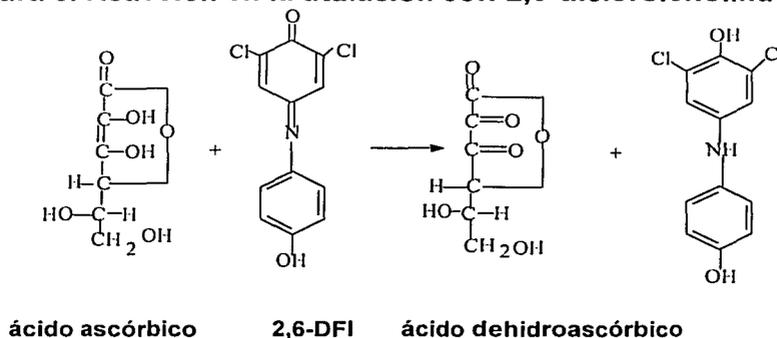
Los métodos clásicos para el análisis de vitamina C se basan en su fuerte poder reductor, que permite su determinación por volumetría oxidimétrica.

El método oficial para la determinación de ácido ascórbico en jugos es el método propuesto por J. Tillmans y establecido por la AOAC, en el cual la vitamina C se valora con el indicador 2,6-diclorofenolindofenol (2,6-DFI). Este indicador es de

¹²Belitz, H. D., Grosch, W. Op. Cit. Pág. 915.

color azul en estado sólido y en solución neutra o alcalina, la solución en medio ácido tiene una coloración rosada y se reduce a un derivado incoloro. El ácido ascórbico se reduce a ácido dehidroascórbico.

Figura 5. Reacción en la titulación con 2,6-diclorofenolindofenol:



Este método de análisis por volumetría oxidimétrica es sólo específico cuando se emplean soluciones de ácido ascórbico puro, si existen otras sustancias reductoras se consume una mayor cantidad de solución titulante y el contenido aparente de vitamina C es mayor del real. En preparados farmacéuticos las interferencias pueden eliminarse pero no en productos naturales, los compuestos orgánicos con grupos $-SH$, sustancias reductoras y otros derivados que pueden formarse durante el procesamiento de alimentos pueden interferir en la valoración de vitamina C por este procedimiento. Es frecuente que una porción de vitamina C se encuentre como ácido dehidroascórbico que tiene también actividad antiescorbútica pero no reacciona con el 2,6-diclorofenolindofenol y no puede valorarse, si no se convierte previamente a ácido ascórbico.

Método Oficial AOAC 967.21¹³**Determinación de Ácido Ascórbico en preparados vitamínicos y jugos de fruta****Titulación volumétrica directa con 2,6-diclorofenolindofenol****a).-Fundamento:**

El ácido ascórbico reduce al indicador 2,6-diclorofenolindofenol una solución de color azul y se oxida a ácido dehidroascórbico el color de la solución cambia a rosa en solución ácida. La vitamina es extraída y titulada en presencia de una solución de $\text{HPO}_3\text{-CH}_3\text{COOH}$ o $\text{HPO}_3\text{-CH}_3\text{COOH-HSO}_4$ para mantener la reacción en medio ácido y evitar la autoxidación del ácido ascórbico a pH elevado.

b).-Reactivos:

Solución de extracción: Disolver 15 g de ácido fosfórico en 40 mL de ácido acético y 200 mL de agua destilada, llevar a 500 mL con agua destilada y filtrar la solución.

Solución estándar: disolver 0.05 g de ácido ascórbico estándar en 45 mL de solución de extracción y llevar a 50 mL.

Solución estándar de indofenol: disolver 0.05 g de 2,6-diclorofenolindofenol (sal sódica) en 50 mL de agua con 42 mg de bicarbonato de sodio, llevar a 200 mL con agua destilada y filtrar. Estandarizar con una titulación de 2 mL de disolución estándar de ácido ascórbico añadidos a 5 mL de la solución de extracción.

Indicador: Disolver 0.1 g de azul de timol en 10.75 mL en solución de hidróxido de sodio 0.02 N, llevar la solución a 200 mL con agua destilada.

c).- Prueba preliminar:

Moler una cantidad representativa de muestra y añadir 25 mL de solución de extracción.

¹³ Cunniff, P. (ed.): *Official Methods of Analysis of AOAC International*, Charper 45. Pág. 1058.

Determinar el pH de la solución utilizando una gota del indicador de azul de timol, si el pH > 1.2 indica la presencia apreciable de sustancias básicas.

d).- Procedimiento para jugos de frutas y vegetales:

Agitar perfectamente el jugo o moler una muestra representativa del fruto o vegetal con una cantidad adecuada de agua, filtrar en algodón o en papel filtro de filtración rápida. A 50 –100 mL de muestra preparada agregar el mismo volumen de solución de extracción. Designar el volumen total de la dilución como V expresado en mL.

e).-Determinación:

Titular una alícuota que contenga aproximadamente 2 mg de ácido ascórbico con solución de indofenol, hacer cada determinación por triplicado. Corregir el volumen de titulante gastado con un blanco de corrección, titulando un volumen equivalente a la alícuota de solución de extracción.

La cantidad de ácido ascórbico se calcula:

$$\text{mg de ácido ascórbico: } (X-B) \times (F/E) \times (V/Y)$$

donde:

X= volumen en mL gastado en muestra titulada

B= volumen en mL gastado en el blanco

F= mg de ascórbico equivalentes a 10 mL de solución de indofenol.

E= volumen en mL de muestra

V= volumen inicial de la solución expresado en mL.

Y= volumen de la alícuota titulada expresado en mL.

ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA-VISIBLE (UV/VIS)

I.-Espectroscopia Ultravioleta:

La radiación Ultravioleta (UV) se encuentra comprendida en la zona del espectro electromagnético que contiene radiaciones de longitudes de 4 a 400 nm. La

longitud de onda en la región UV están generalmente expresadas en nanómetros nm ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$) o angstroms Å, ($\text{Å} = 10^{-10} \text{ m}$). La parte del espectro UV comprendida entre 200 a 400 nm se le conoce como ultravioleta cercano y a la región comprendida entre 4 y 200 nm se le conoce como ultravioleta lejano.

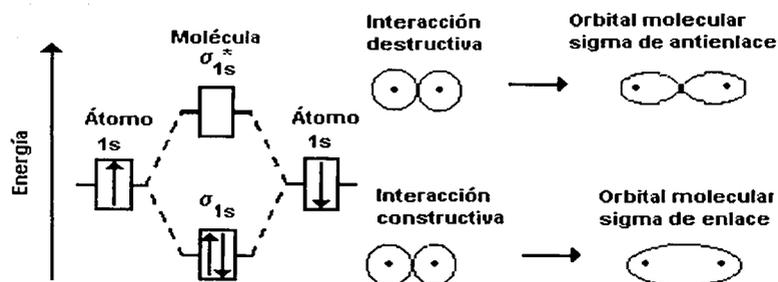
Figura 6. Región Espectroscópica UV/VIS y algunas energías asociadas¹⁴

	UV lejano		UV cercano		Visible
λ , nm	100	200	300	400	800
E, kcal mol ⁻¹	286	145	95	72	36

I.2.-Interacción de la radiación UV con la energía electrónica de la materia:

Los electrones de un átomo ocupan un nivel discreto de energía de acuerdo al orbital en que se encuentran, un orbital es la función de onda de un electrón, un orbital atómico es la función que define la distribución de la densidad electrónica en el espacio que rodea al núcleo atómico, cuando los átomos se enlazan interaccionan sus orbitales atómicos y se unen, formando un orbital molecular. La energía electrónica es la energía que utilizan los orbitales atómicos para formar un orbital molecular.

Figura 7. Unión de dos hidrógenos



¹⁴ Lambert J., Shurvell H., *Organic Structural Analysis*. Pág. 319.

La sobreposición de los orbitales $1s$ de dos átomos de hidrógeno, conduce a la formación de dos orbitales moleculares, un orbital molecular de enlace y un orbital molecular de antienlace. Un orbital molecular de enlace tiene menor energía y mayor estabilidad que los orbitales atómicos que lo formaron, un orbital molecular de antienlace tiene mayor energía y menor estabilidad que los orbitales atómicos que lo crearon¹⁵.

La reducción de la energía que resulta del traslape de los orbitales atómicos para formar un orbital molecular, depende de qué tanto se sobrepongan los orbitales atómicos, es decir, del tipo de unión química formada sigma (σ) o pi (π).

Los compuestos orgánicos con dobles ligaduras tienen dos tipos de orbitales moleculares: un orbital molecular sigma (σ) y un orbital molecular pi (π), un orbital atómico de cada carbono se traslapa por los extremos y la densidad electrónica se concentra entre los dos núcleos de los átomos que se unen formando un enlace sigma (σ), los orbitales moleculares asociados con los enlaces sencillos se denominan orbitales sigma (σ) y los electrones correspondientes son los electrones σ . Los orbitales pi (π) se forman por el traslape paralelo de los orbitales atómicos p y la densidad electrónica forma una nube electrónica arriba y abajo del plano que contiene los núcleos de los átomos enlazados, a esta tipo unión se le conoce como enlace pi (π).

Los orbitales atómicos que forman los enlaces π en los compuestos orgánicos que tienen dobles ligaduras conjugadas están deslocalizados, se considera que se encuentran moviendo a través de las uniones químicas, por lo que interactúan

¹⁵ Chang R., *Química*. Pág. 417.

menos entre ellos y la energía que pierden al formarse es menor que la de un enlace π aislado.

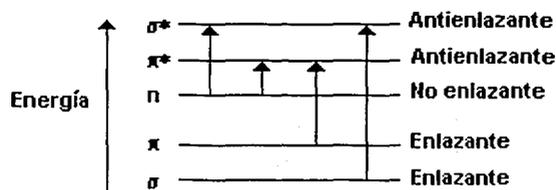
La diferencia de energía que existe entre los niveles energéticos de unión, σ o π a sus niveles de antiunión, σ^* o π^* coinciden con niveles energéticos que posee la radiación UV, si a un compuesto se le incide radiación UV, las uniones químicas absorberán esta radiación, la molécula se excita y pasa al correspondiente nivel de antiunión efectuando una transición electrónica entre los distintos niveles de energía.

Las moléculas orgánicas tienen en su estructura pares de electrones libres o no enlazantes, además uniones σ y π , que no intervienen en los orbitales moleculares, estos electrones no participan en ningún enlace y se les conoce como electrones "n".

En todos los compuestos orgánicos, los electrones pueden experimentar varias posibles transiciones energéticas al contacto con la radiación UV algunas de las más importantes son: $n \rightarrow \pi^*$, $n \rightarrow \sigma^*$, $\pi \rightarrow \pi^*$, $\sigma \rightarrow \sigma^*$

Estas transiciones son ilustradas en la figura 8.

Figura 8. Niveles de energía y transiciones electrónicas



Para que se lleve a cabo una transición $\sigma \rightarrow \sigma^*$ se necesita energía del ultravioleta lejano. Los sistemas con electrones π o sistemas conjugados son generalmente de menor energía y absorben a mayores longitudes de onda al

incrementarse la conjugación. A medida que aumenta la conjugación en un compuesto, la diferencia de energía de los niveles π y π^* se hace cada vez menor porque los electrones están más deslocalizados, la presencia de un grupo que impida la deslocalización de los electrones, es decir, que rompa la planaridad de la molécula, hace más grande la diferencia de energía entre estos orbitales.

Las transiciones $n \rightarrow \sigma^*$ y $n \rightarrow \pi$ las presentan los compuestos saturados e insaturados que contienen pares de electrones no compartidos, incluye la excitación de un electrón de un orbital no enlazante a un orbital antienlazante, la mayoría de picos aparecen por debajo de 200 nm.

1.3.-Definición de términos utilizados en espectroscopia UV:¹⁶

Cromóforo: todo grupo covalente e insaturado que absorbe al UV (C-C).

Auxócromo: es un grupo funcional saturado que no absorbe radiación arriba de 200 nm, pero al estar presente en el compuesto modifica la absorción de los cromóforos presentes (OH, NH₂ y Cl).

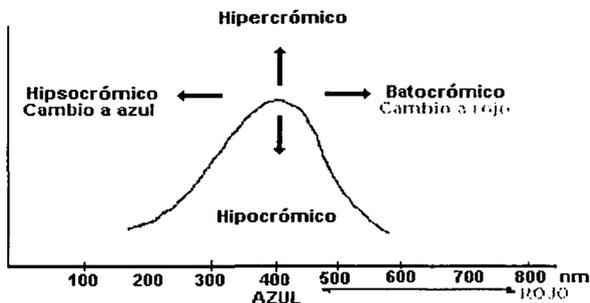
Efecto batocrómico o al rojo: cuando el auxócromo desplaza la absorción a longitudes de onda más grandes.

Efecto hipsocrómico o al azul: cuando el auxócromo desplaza la absorción a longitudes de onda menores.

Efecto hiperocrómico: cuando el auxócromo aumenta la intensidad de la absorción.

Efecto hipocrómico: cuando el auxócromo disminuye la absorción.

¹⁶ Los libros consultados para obtener esta información fueron:
Pavia D., Lampman G., Kriz G., *A guide for students of Organic Chemistry*. Pág. 191.
Silverstein R. M., Clayton B. C., *Spectrometric identification of organic compounds*. Págs. 292.

Figura 9. Efecto de los sustituyentes en las bandas de absorción

1.4.-Selección y efecto del disolvente:

La elección del disolvente utilizado en espectroscopia UV es de gran importancia, existen varios criterios que deben tomarse en cuenta para realizar la elección del disolvente.

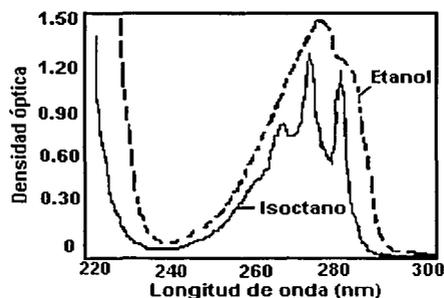
El primero es que el disolvente debe ser transparente en la región espectral de interés, es decir, no debe absorber la radiación ultravioleta en la misma región que el compuesto a analizar, generalmente los disolventes que no contienen sistemas conjugados son los más adecuados, en la tabla 2 se muestran los disolventes más usados, cada uno de ellos es transparente en las regiones del espectro ultravioleta donde la absorción de las moléculas en los compuestos ocurren.

Tabla 2. Longitudes de onda de Disolventes más utilizados en UV

Disolvente	λ de absorción al UV nm
Acetonitrilo	190
Cloroformo	240
Ciclohexano	195
1,4-Dioxano	215
Etanol al 95%	205
n-Hexano	201
Metanol	205
Iso-octano	195
Agua	190
Trimetil fosfato	210

El segundo criterio es que debe considerarse el efecto del disolvente en la forma del espectro de absorción. Con un disolvente polar el soluto puede formar puentes de hidrógeno, por lo que se forma un complejo soluto-solvente y las bandas finas del espectro de absorción pueden desaparecer. En un disolvente no polar no se forman puentes de hidrógeno con el soluto, las bandas del espectro del soluto son finas (figura 10)¹⁷.

Figura 10. Espectro de absorción ultravioleta del fenol utilizando etanol e isooctano como disolventes



¹⁷ Pavia D., Lampman G., Kriz G. Op. Cit. Pág. 188.

La tercera característica que debe ser considerada para la elección del disolvente es la influencia del disolvente en la absorción del compuesto, con disolventes polares las bandas de absorción de las transiciones $n \rightarrow \pi^*$ se desplazan a longitudes de ondas más cortas (desplazamiento hipsocrómico o al azul), provocado por una mayor solvatación del par de electrones no enlazantes que disminuye la energía del orbital n , la diferencia de energía entre los electrones " n " y el nivel π de antiunión aumenta, lo que hace que la energía de la radiación absorbida para que se efectúe la transición sea mayor, por lo tanto la longitud de la onda sea menor, produciéndose un efecto hipsocrómico. Para las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ hay un desplazamiento batocrómico (o al rojo) al incrementarse la polaridad del disolvente.

1.5.-Ley de Lambert y Beer:

La absorción de la radiación por la materia puede tener aplicaciones analíticas cualitativas y cuantitativas. Las aplicaciones cuantitativas se fundamentan en que si el número de moléculas que sufren una transición electrónica es grande, la cantidad de energía absorbida será grande y dará como resultado en el espectro de UV una banda intensa y grande.

Si el número de moléculas que sufren una transición electrónica es pequeño, la cantidad de energía absorbida será de menor intensidad y dará como resultado en el espectro de UV una banda de poca intensidad y pequeña. Esta información es el fundamento de la ley de Lambert y Beer: La fracción de radiación incidente absorbida por un medio es independiente de la intensidad de la luz incidente y es proporcional al número de átomos, iones o moléculas absorbentes a través de las cuales pasa.

La intensidad de la absorción puede ser expresada en transmitancia (T), definida como: $T = I/I_0$. Al logaritmo del inverso de la transmitancia se le conoce como absorbancia (A). La ley de Lambert y Beer establece la relación entre la absorbancia, el espesor de la muestra y la concentración de las sustancias absorbentes.

$$\text{Log } 10 (I_0/I) = kcb = A$$

Si el disolvente no absorbe, la cantidad de luz absorbida o transmitida es una fracción exponencial de la concentración del soluto y también esta en función de la longitud o espesor de muestra atravesada por la radiación, lo anterior queda expresado como lo indica la siguiente ecuación:

$$I = I_0 \times 10^{-kcl}$$

$$\log I/I_0 = kcl$$

$$-\log I/I_0 = A = -\log T = kcl$$

donde:

I_0 = Intensidad de energía radiante incidente

I = Intensidad de la energía radiante absorbida

c = concentración molar del soluto

l = longitud interna de la celda con la muestra

k = una constante característica para cada soluto

ϵ = coeficiente de absortividad molar

Cuando la concentración esta expresada en moles por litro (M) la constante es llamada coeficiente de absortividad molar (ϵ) y es una constante de cada compuesto, cuando la concentración de la solución que se pone al paso de la radiación tiene una concentración 1 M y si la celda es de 1 cm, la ecuación de la ley de Lambert y Beer es:

$$A = \epsilon cl$$

Si la concentración de la solución esta expresada en gramos por litro (g/L) la ecuación es:

$$A = acl$$

donde:

a= absortividad y esta relacionada con la absortividad molar con la ecuación:

$$\varepsilon = aM$$

donde:

M= es el peso molecular del soluto.¹⁸

Una banda de absorción al UV queda definida con su valor de lambda máxima de absorción y su ε , los valores de coeficiente de absortividad se reportan para cada longitud de onda de absorción, indicando el disolvente utilizado.

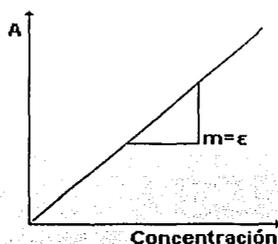
La intensidad de la señal que presente un compuesto no sólo depende de la concentración del cromóforo presente sino se debe tomar en cuenta que existen transiciones favorecidas. Las absorciones con ε mayores a 10^4 tienen una alta intensidad de absorción por lo que son transiciones favorecidas. La baja intensidad de absorción tiene valores de ε menores a 10^3 . Las transiciones con baja absorción son transiciones prohibidas. Por ejemplo la ε de las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ es al menos 1000 veces más grande que la ε de las transiciones $n \rightarrow \pi^*$

Cuando se mantiene la longitud de la radiación constante y se aumenta la concentración del analito, la absorbancia deberá incrementarse proporcionalmente con la concentración, de tal modo que si se registran los espectros de un mismo

¹⁸ Silverstein. Op. Cit. Pág. 291-292.

compuesto a diferentes concentraciones y se gráfica la concentración contra la absorbancia a la λ máxima de absorción escogida, el registro gráfico es una línea recta y la pendiente de esta el coeficiente de absorptividad. Esta gráfica es llamada curva de calibración o curva patrón y es el principio de las aplicaciones cuantitativas del UV.

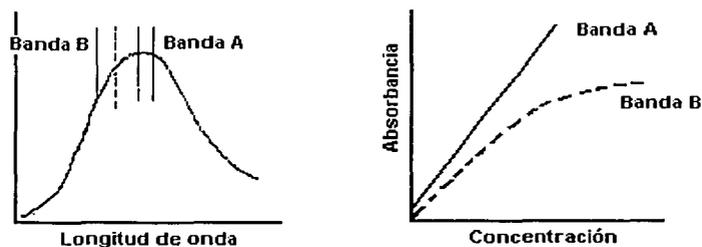
Figura 11. Curva de calibración para representar ley de Lambert y Beer



Cuando se trabaja con concentraciones altas, arriba de 0.01M, la distancia entre las partículas absorbentes disminuye provocando interacciones moleculares entre ellas, las interacciones moleculares producen cambios en la distribución de su energía alterando la capacidad de las moléculas para absorber la radiación a una determinada longitud de onda, por lo que al contacto con la radiación ultravioleta no siempre se registran las mismas energías para efectuar las transiciones, alterando la magnitud de las absorbancias. Se puede producir un efecto similar en soluciones de muy baja concentración del analito, cuando esto sucede se tienen desviaciones de la linealidad, otra causa de estas desviaciones ocurre cuando un analito se disocia y se asocia o reacciona con un disolvente para formar un producto con un espectro de absorción diferente al del analito.

La ley de Lambert y Beer se cumple solo si la radiación es monocromática, cuando la medida de la absorbancia es realizada utilizando una radiación compuesta por dos longitudes de onda se cumple la ley de Lambert y Beer pero la relación entre la A_m y la concentración deja de ser lineal cuando las absorptividades molares difieren entre si.

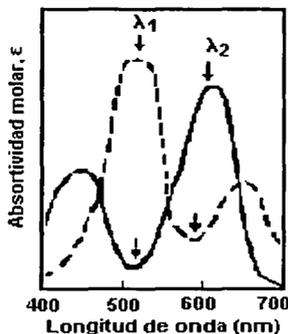
Figura 12. Desviaciones de la ley de Lambert y Beer producida por luz policromática



1.6.-Análisis de mezclas por ultravioleta:

La absorbancia total de una disolución a una longitud de onda dada es igual a la suma de las absorbancias de los componentes individuales presentes. Esta aditividad hace posible la aplicación del análisis cuantitativo por ultravioleta para analizar mezclas de analitos aún cuando exista el traslape de dos cromóforos en un espectro o sus longitudes de absorción se sobrepongan.

Figura 13. Análisis espectrofotométrico simultáneo de un sistema de dos componentes



De acuerdo a la ley de aditividades, la absorbancia de la mezcla de los dos compuestos **a** y **b**, a las dos longitudes de onda λ_1 y λ_2 , es la suma de las absorbancias particulares de **a** y de **b** a esas mismas longitudes de onda, si se mantiene constante la longitud de la celda:

$$A_{\lambda_1} = (\epsilon_a C_a) \lambda_1 + (\epsilon_b C_b) \lambda_1$$

$$A_{\lambda_2} = (\epsilon_a C_a) \lambda_2 + (\epsilon_b C_b) \lambda_2$$

Las concentraciones de los compuestos problema se calculan resolviendo el sistema de ecuaciones, donde las absortividades molares (ϵ_a y ϵ_b) de los dos compuestos a las dos longitudes de onda se pueden calcular a partir de disoluciones patrón y la absorbancia a las dos longitudes de onda se determinan directamente del espectro obtenido.

1.7.-Espectrofotometría UV/VIS con segunda derivada:

La Espectrofotometría Derivada es una técnica analítica donde los espectros se obtienen representando gráficamente la primera derivada o de mayor orden, de la absorbancia o de la transmitancia, con respecto a la longitud de onda y en función de la longitud de onda.

Estas representaciones gráficas revelan detalles espectrales que se pierden en un espectro ordinario, estos detalles pueden servir de ayuda en el análisis cuantitativo y cualitativo de una muestra, esta técnica es de gran utilidad para obtener información de espectros compuestos por diversas bandas de absorción, en el análisis cuantitativo a veces se puede realizar la cuantificación de un analito en presencia de un interferente que absorbe a una longitud de onda cercana, con mayor facilidad y precisión.

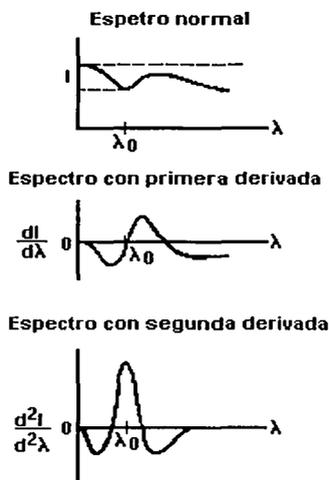
Considerando la intensidad de la radiación descrita por la ley de Lambert-Beer:

$$A = \ln \frac{I_0}{I} = abc$$

donde **A** es la absorbancia, **a** es el coeficiente de absorción como una función de la longitud de onda, **b** la longitud de la celda, **c** es la concentración de la muestra.

Para un espectro simple de un pico la primera derivada es un trazo del gradiente $dI/d\lambda$ de la absorción en función de la longitud de onda (λ), el espectro trazado presenta un máximo y un mínimo, la distancia vertical en medio de la amplitud de onda del espectro trazado es proporcional a la concentración del analito, teóricamente $dI/d\lambda$ es cero en la longitud de onda máxima (λ_{max}).

Figura 14. Intensidad y sus derivadas



La segunda derivada (SD) de un espectro $d^2I/d^2\lambda$ en función de λ , tiene dos mínimos con un máximo entre ellos en la λ_{\max} de la banda de absorción del espectro normal. En teoría la altura del pico máximo medida de $d^2I/d^2\lambda$ a la λ_0 es proporcional a la concentración del analito.

Los métodos con derivadas han encontrado aplicación no solo en la espectroscopia Ultravioleta-Visible, también han tenido aplicación en infrarrojo, en espectrometría de absorción atómica y emisión de flama y fluorometría. La espectroscopia UV/VIS con segunda derivada (SD) ha sido utilizada en análisis químicos en diversas áreas de aplicación, por ejemplo:

En el análisis de preparaciones farmacéuticas para eliminar interferencias producidas por la matriz del medicamento, para identificar y determinar vitaminas y antibióticos como amoxicilina y ampicilina, en el análisis de tabletas de pseudoefedrina y en la determinación de ácido acetil salicílico en aspirina.

En la industria de alimentos la técnica SD es utilizada en la determinación de aditivos en alimentos, colorantes artificiales, pigmentos en polvo de bebidas sabor naranja, en la determinación de sacarina, ácidos sórbico, ácido benzoico y en bebidas no alcohólicas.

En análisis clínicos y Toxicología forense la SD ha sido utilizado en el análisis de drogas ilícitas, específicamente para la identificación de compuestos que poseen espectros similares como son las anfetaminas. Han sido descritos diversos procedimientos utilizando la SD para la determinación de diversos compuestos en fluidos biológicos y aminoácidos aromáticos en proteínas.

1.8.- Instrumentación UV-VIS/ Derivadas:

Los instrumentos para medir la absorción de la radiación ultravioleta y visible están compuestos por los siguientes componentes:

Lámparas o fuentes:

Los equipos de UV utilizan dos fuentes de radiación. Una lámpara de tungsteno que provee la radiación visible y una lámpara de deuterio que provee la radiación ultravioleta. Cerca de donde están situadas las lámparas existe un sistema de aire que remueve el exceso de calor y ozono para mantener estable el funcionamiento de las lámparas.

Sistema óptico:

El sistema óptico está basado en un monocromador, compuesto por una rendija de entrada que proporciona una imagen óptica rectangular, un espejo que conduce un haz paralelo de radiación, un prisma que dispersa la radiación en sus diferentes longitudes de onda individuales y un elemento focalizador que forma de

nuevo la imagen de la rendija de entrada y la enfoca en una superficie plana denominada plano focal.

Un motor mueve el espejo M_1 a la lámpara elegida bajo el control del software que controla el funcionamiento del equipo. Las lámparas emiten radiación, el haz pasa a través del monocromador, después la radiación pasa a través de la referencia y de la muestra, en seguida la radiación pasa a un modulador que permite ver al detector la radiación absorbida por los cromóforos presentes en la muestra.

Detectores:

Existen dos tipos de detectores los detectores de fotodiodos y los detectores con fotomultiplicador.

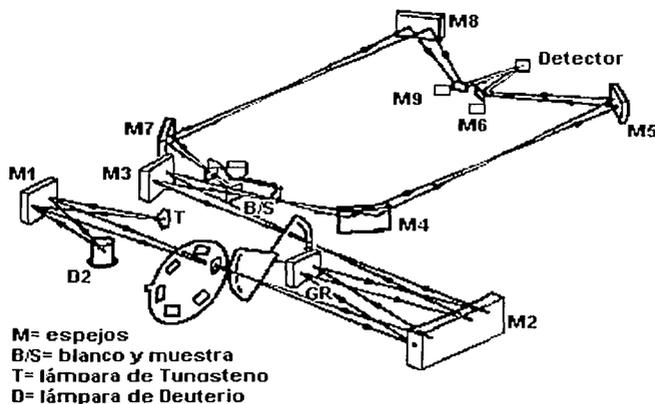
El detector de fotodiodo esta formado por una unión polarizada inversamente montada en un chip de silicio, cuando la radiación incide sobre el detector de electrones que al moverse a través del dispositivo dan lugar a una corriente que es proporcional a la potencia radiante.

En el detector fotomultiplicador los fotones pasan al fotocátodo el cual emite un número de electrones por cada fotón, estos electrones son dirigidos al ánodo y amplificados en un pre-amplificador. Los fotomultiplicadores son muy sensibles a la radiación ultravioleta y visible, además tienen tiempos de respuesta muy rápida.

Tipos de instrumentos:

Existen cuatro principales tipos de instrumentos espectroscópicos: haz sencillo, doble haz espacial, doble haz temporal y multicanal.

La figura 15 muestra los detalles de la construcción de un equipo de doble haz. En este instrumento la radiación se dispersa en una red cóncava que enfoca al haz sobre un espejo de sectores rotatorio.

Figura 15. Diagrama del sistema óptico del equipo UV/VIS de doble haz¹⁹

Para obtener espectros derivados se utilizó un espectrofotómetro con diferenciador digital donde las derivadas de un espectro son calculadas numéricamente por computadoras. Las señales del espectrofotómetro son transferidas a un convertidor análogo-digital y el valor promedio es calculado. Este método es frecuentemente utilizado con el uso de microcomputadoras en el control de los espectrofotómetros.

EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA Y COLUMNAS DE EXTRACCIÓN:

La extracción en fase sólida es un proceso de extracción física que incluye un líquido y una fase sólida. La muestra en solución pasa a través del sorbente empacado en la columna de extracción, el analito es retenido o aislado mientras que el resto de la solución pasa a través del sorbente, seguido por la elución en un mínimo de volumen de disolvente. En la extracción de fase sólida el sorbente posee

¹⁹ Manual Thermo Spectronic Unicam UV Series Installation and Maintenance. Chapter 9. Getting the best.

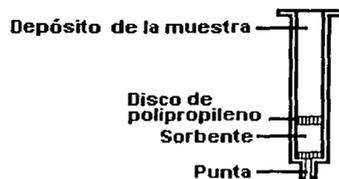
una mayor atracción por el analito que por el disolvente en el que se encuentra disuelto.

Los mecanismos de separación ocurren por interacciones intermoleculares entre las moléculas del analito y los grupos funcionales del sorbente, estas fuerzas son: Iónicas, Enlaces de hidrógeno, Dipolo-dipolo, Dipolo inducido, Fuerzas de dispersión (dipolo-dipolo inducido).

Un sorbente muy utilizado es el Octadecyl C18, es el sorbente de menor polaridad disponible y el más adecuado de todos los sorbentes para aislar con un mecanismo no polar. Los compuestos extremadamente no polares son difíciles de eluir de C18, este sorbente no retiene moléculas muy polares como los hidratos de carbono. Es considerado el sorbente menos selectivo y no retiene nada de matrices acuosas. El sorbente C18 es excelente para desalinizar matrices porque las sales pasan a través del sorbente sin ser retenidas. Las interacciones polares entre el analito por aislar y el sorbente son menos significativas con C18 que con otro sorbente por el efecto de la larga cadena de hidrocarburos que posee.

La figura 16 muestra la estructura de una columna desechable pre-empacada con una fase sólida de sorbente. Estas columnas de polipropileno están empacadas con 100, 200, 500 y 1000 mg de sorbente C18 colocado en polipropileno. La capacidad de muestra de las columnas son de 1, 3, o 6 mL. La muestra puede ser introducida a la columna por un depósito desechable.

Figura 16. Columna desechable con depósito de sorbente



A la cantidad total de compuestos (analitos e interferencias) que pueden ser retenidos de la matriz de una muestra específica por la masa definida de sorbente se le llama capacidad de la columna. La capacidad de la columna ha sido estimada de 10-20 mg de analito/cartucho. En análisis ambientales, farmacéuticos y en alimentos se ha estimado una capacidad de 3-12 mg, la capacidad de la columna es específica para cada analito como se muestra en la tabla 3.

Tabla 3 . Capacidad de columna para varios analitos

Analito	Columna 200 mg	Adsorción mg/200 mg	Disolvente
Hidrocortisona	Octadecyl-silica	8.0	Agua (pH 7.0)
Colesterol	Octadecyl	6.0	Metanol/cloroformo (9/1)
Palmitato	Octadecyl	~5.0	Metanol/cloroformo (9/1)

Para utilizar esta columna de extracción se debe seguir el procedimiento a continuación descrito:

1. Acondicionar la columna con un solvente adecuado (metanol, hexano o cloroformo) para solvatar los grupos funcionales del sorbente.
2. Aplicar la muestra a la columna: la solución o matriz que contiene la muestra se pone en contacto con el sorbente colocando la muestra dentro de la columna.

3. Aspirar la muestra a través de la columna: la solución de la muestra es obligada a pasar a través del sorbente de la columna por presión positiva (con una jeringa), presión negativa (al vacío) o por centrifugación a una velocidad de 5mL/min. o menos.
4. Eliminar las impurezas con un disolvente de lavado: la columna que contiene al analito retenido se lava con un disolvente adecuado que selectivamente eluya las impurezas pero permita que el analito se quede en la columna.
5. Eluir el analito con el disolvente de elusión: el analito purificado se eluye con un solvente lo suficientemente fuerte que desplace al analito del sorbente.

CAPÍTULO 2
DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO

DETERMINACIÓN DE ÁCIDO ASCÓRBICO EN JUGO DE UVA PROCESADO APLICANDO EL MÉTODO PROPUESTO POR LA AOAC

Titulación volumétrica directa con 2,6-Diclorofenolindofenol

Se aplicó el método oficial AOAC (Pág. 15 del Capítulo 1, Fundamentos teóricos) en jugo de uva procesado marca Del Valle, la muestra preparada tenía una coloración muy intensa por lo que al comenzar a titular, el color del jugo de uva de la muestra interfería con el color del titulante y no fue posible realizar la titulación.

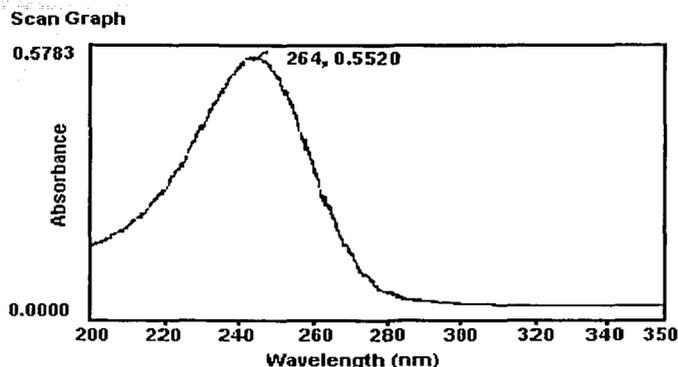
Con los resultados obtenidos concluimos que debido al color que tienen los jugos procesados, no es posible utilizar esta metodología para cuantificar el contenido de ácido ascórbico.

DETERMINACIÓN DEL ÁCIDO ASCÓRBICO POR ESPECTROFOTOMETRÍA UV

Se utilizó el equipo Unicam UV/VIS de Thermo Spectronic, este equipo de UV/VIS es de doble haz y utiliza el programa de computadora Vision 32 Software V1.23.

Absorción al UV del ácido ascórbico en agua

Se preparó una disolución estándar de ácido ascórbico 5×10^{-3} mg/mL en agua destilada protegiendo la solución del contacto con la luz, se midió el pH de la disolución de ácido ascórbico, el pH de la solución fue de 4.5. Se registró el espectro de absorción UV de 200-350 nm, utilizando como blanco agua destilada.

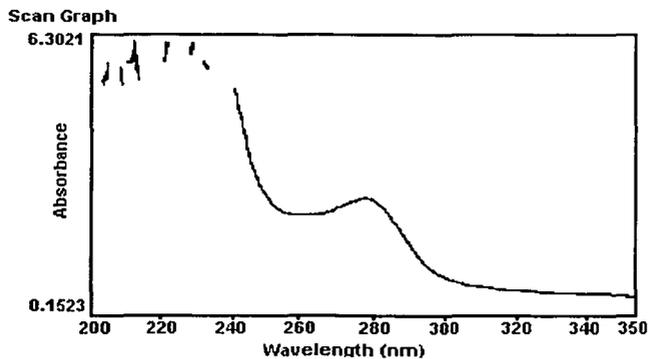
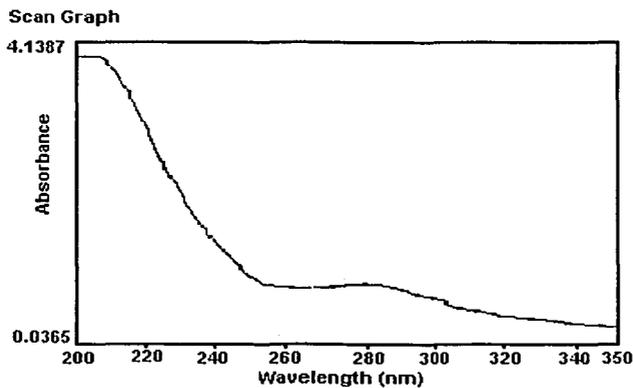
Espectro 1. Ácido ascórbico preparado en agua destilada agua

Se encontró una absorción a una lambda máxima (λ_{\max}) de 264 nm y una absorbancia de 0.5520 (espectro 1).

Absorción del jugo de uva al UV

Para evitar la interferencia del color se utilizó un cartucho desechable de C18 una columna Bakerbond con 500 mg de Octadecyl como sorbente no polar, de capacidad de 3 mL.

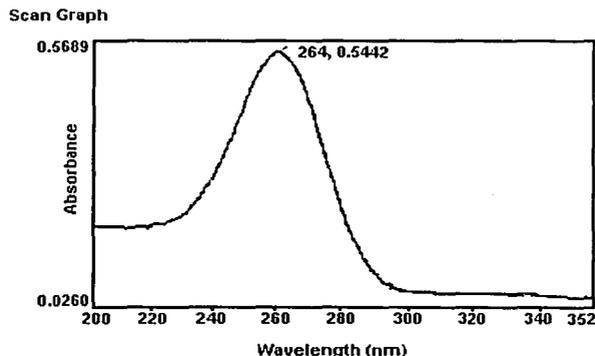
Se tomó 1 mL de jugo de uva recién abierto y se llevó a 100 mL con agua destilada, una porción de este se filtró por un cartucho de C18 previamente activado con 1 mL de metanol absoluto. Los primeros mililitros filtrados no fueron recolectados ya que la solución al pasar elimina el metanol que pudiera permanecer en el cartucho. Al filtrado se le registró su espectro UV (espectro 3)

Espectro 2. Espectro del jugo de uva recién abierto**Espectro 3. Jugo diluido 1/ 100mL con agua destilada filtrado por el cartucho de C18**

En el jugo el uso del cartucho elimina bandas interferentes en el espectro producidas por el color, pero no se descarta la presencia en el jugo filtrado de otros compuestos que absorban al UV.

Interacción del ácido ascórbico con el cartucho de C18.

Para demostrar que el ácido ascórbico no se retiene en el cartucho de C18, se filtró una porción de la disolución estándar de ascórbico empleada para registrar el espectro UV (espectro 1) en un cartucho y se registró su espectro.

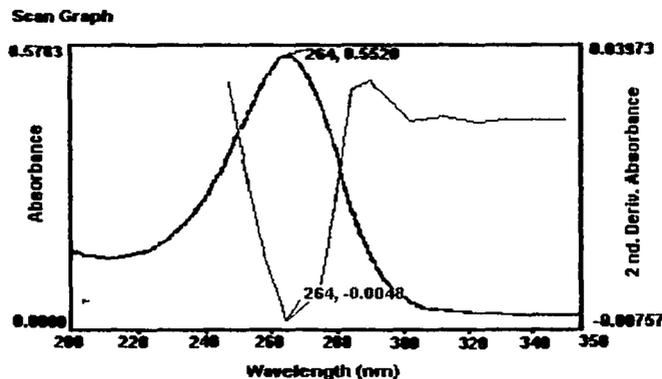
Espectro 4. Ácido ascórbico preparado en agua y filtrado por el cartucho de C18

Comparando los espectros 1 y 4 se observa que el ácido ascórbico no se retiene en la columna C18. La absorbancia obtenida en el espectro de la disolución estándar de ácido ascórbico sin filtrar es de 0.5520 y la absorbancia obtenida en el espectro registrado de la disolución estándar filtrada por el cartucho de C18 es de 0.5442 por lo que la absorbancia obtenida para ambos casos es similar.

ESPECTROFOTOMETRÍA UV CON SEGUNDA DERIVADA

Se preparó una disolución estándar de ácido ascórbico 5×10^{-3} mg/mL; se registraron sus espectros UV y UV con segunda derivada (SD).

Espectro 5. Ácido ascórbico preparado en agua. Espectro UV y por Segunda derivada (SD)



En el gráfico anterior se muestran los espectros UV del ácido ascórbico en color negro y el espectro UV con Segunda Derivada (SD) de color rojo para la disolución estándar de ácido ascórbico, el valor mínimo de absorbancia obtenido en el espectro SD se encuentra a una λ_{max} de 264 nm igual que el máximo obtenido en su espectro UV con una absorbancia de -0.0048 .

Determinación cuantitativa de ácido ascórbico por espectrofotometría UV

Se prepararon estándares de ácido ascórbico de diferentes concentraciones para realizar una curva patrón y comprobar si el ácido ascórbico tiene un comportamiento de acuerdo a la ley de Lambert-Beer.

Se preparó una disolución de ácido ascórbico 0.05 mg/mL. La solución estándar de ácido ascórbico en cada uno de los matraces se protegió de la luz forrando cada uno de los matraces con papel aluminio.

La curva patrón se preparó con las siguientes diluciones:

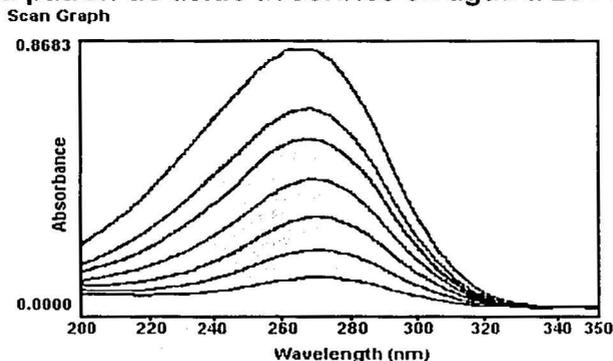
Tabla 4. Curva patrón de ácido ascórbico en agua

Número de matraz	mL de solución 0.05 mg/mL de ácido ascórbico	Aforo con agua destilada	Concentración final mg/mL
1	1	25	0.002
2	2	25	0.004
3	3	25	0.006
4	4	25	0.008
5	5	25	0.010
6	6	25	0.012
7	7	25	0.014

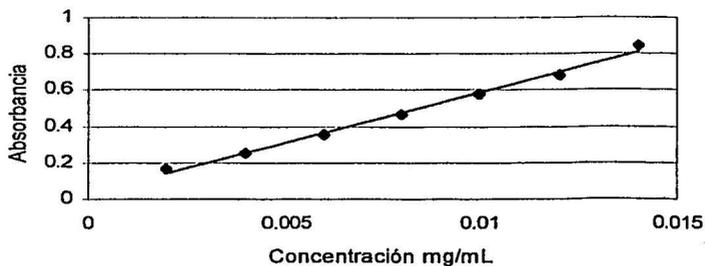
Cada una de las disoluciones patrón se filtró por un cartucho de C18. Se registraron los espectros de absorción al UV y su espectro por Segunda Derivada (SD) de cada disolución preparada. Las lecturas se realizaron a una λ de 264 nm.

Tabla 5. Curva Patrón de ácido ascórbico en agua a 264 nm

Número de matraz	A 264 nm	A 2D 264 nm
1	0.1621	-0.0022
2	0.2512	-0.0042
3	0.3542	-0.0064
4	0.4660	-0.0090
5	0.5791	-0.0111
6	0.6804	-0.0130
7	0.8440	-0.0160

Espectro 6. Curva patrón de ácido ascórbico en agua a 264 nm filtrada por C18

Gráfica 1. Curva Patrón de ácido ascórbico en agua a 264 nm



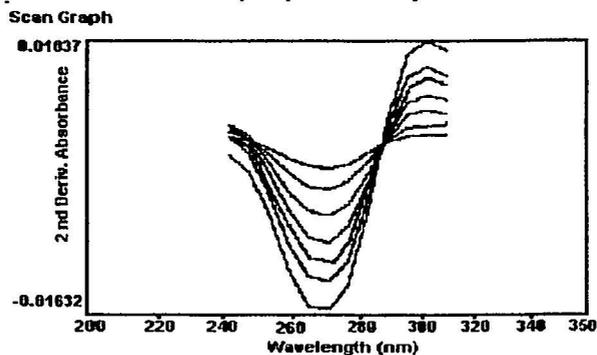
Datos de regresión lineal:

A= 0.02971

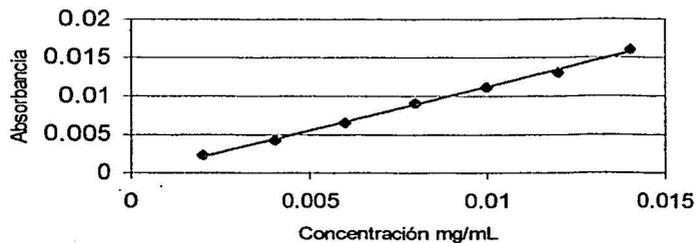
B= 55.875

r= 0.99691

Espectro 7. Curva patrón de ácido ascórbico en agua a 264 nm con Segunda Derivada (SD) filtrada por C18



Gráfica 2. Curva Patrón de ácido ascórbico en agua a 264 nm por Segunda Derivada (SD)



Datos de regresión lineal:

$$A = -2.5714 \times 10^{-4}$$

$$B = 1.1375$$

$$r = 0.9987$$

Para trazar la gráfica de la segunda derivada se tomó el valor absoluto de las absorbancias.

Con las curvas patrón obtenidas y con los datos de regresión lineal se comprobó que la absorbancia y la concentración son proporcionales, por lo que el ácido ascórbico en agua sigue la ley de Lambert-Beer.

Comprobación de la reproducibilidad de resultados y estabilidad del ácido ascórbico

Para comprobar la reproducibilidad de los resultados se probó la estabilidad del ácido ascórbico en las mismas concentraciones en las que se había trabajado, se realizaron lecturas de todas las disoluciones patrón cada cinco minutos durante media hora. Se registró el espectro de la curva patrón al término de este tiempo. Los resultados se muestran en la tabla 6.

Espectro 8. Curva patrón de ácido ascórbico en agua a 264 nm, registrada de 30 minutos después de su preparación.

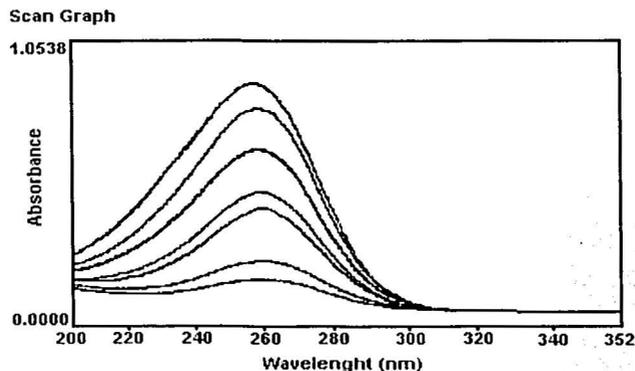
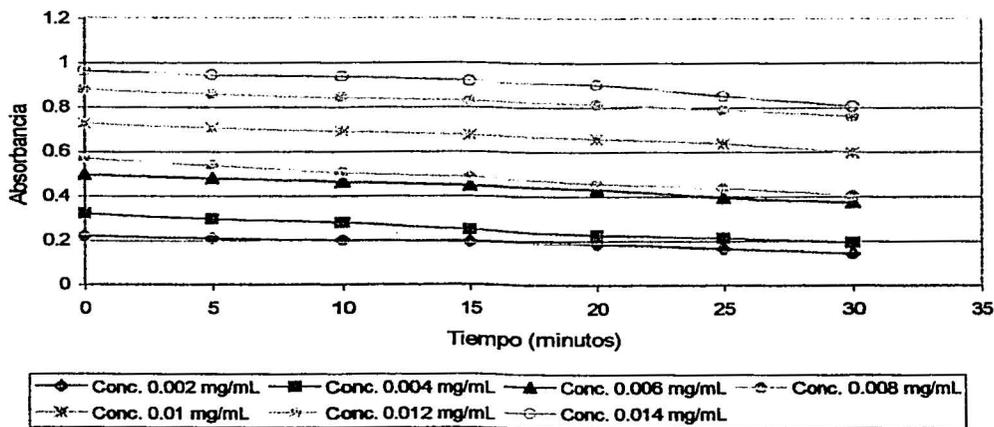


Tabla 6. Lecturas de absorbancia realizadas a la curva patrón de ácido ascórbico en agua a 264 nm durante 30 minutos

Número de matraz	1	2	3	4	5	6	7
Tiempo (minutos)	Conc. 0.002 mg/mL	Conc. 0.004 mg/mL	Conc. 0.006 mg/mL	Conc. 0.008 mg/mL	Conc. 0.01 mg/mL	Conc. 0.012 mg/mL	Conc. 0.014 mg/mL
0	0.2170	0.3187	0.4942	0.5670	0.7241	0.8769	0.9609
5	0.2052	0.2947	0.4775	0.5346	0.7032	0.8566	0.9422
10	0.1996	0.2782	0.4627	0.5035	0.6881	0.8410	0.9343
15	0.1929	0.2476	0.4451	0.4847	0.6719	0.8271	0.9149
20	0.1838	0.2231	0.4292	0.4543	0.6563	0.8104	0.8988
25	0.1624	0.2098	0.3945	0.4367	0.6358	0.7890	0.8484
30	0.1421	0.1918	0.3746	0.4032	0.5967	0.7592	0.8032

Gráfica 3. Lecturas realizadas para cada concentración de la curva patrón de ácido ascórbico en agua a 264 nm



En las gráficas 1 y 2 se observa que el ácido ascórbico en agua sigue la ley de Lambert-Beer, pero la estabilidad de este compuesto en agua no es adecuada para realizar un análisis cuantitativo ya que durante el tiempo de análisis las absorbancias registradas disminuían en función del tiempo, lo que indica que las absorciones del ácido ascórbico bajo estas condiciones de trabajo no son constantes, el tiempo de trabajo en el que se mantiene estable el ácido ascórbico es de 5 minutos (gráfica 3).

Condiciones de trabajo

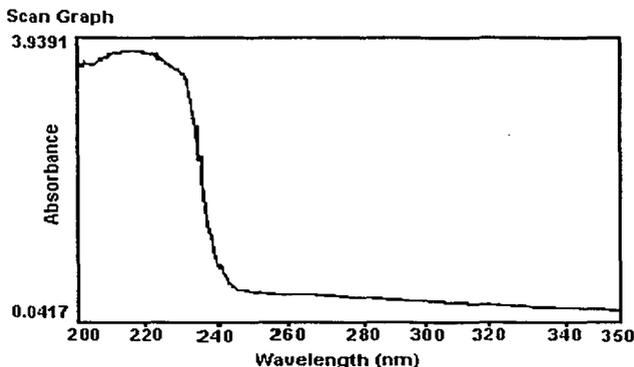
Paso I:

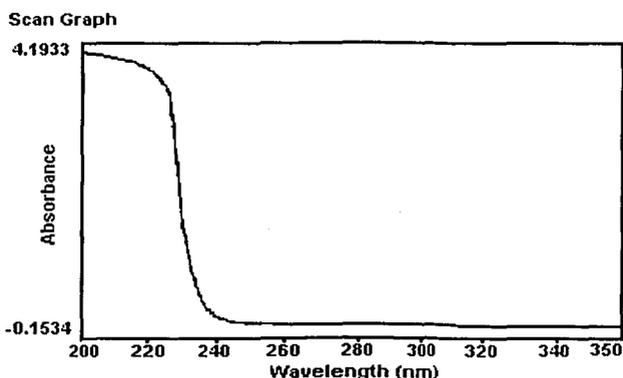
Para mantener sin variación la absorción al UV de las disoluciones de ácido ascórbico se probaron diferentes medios de disolución para establecer las condiciones de trabajo del método.

El primer medio que se probó fue la solución de extracción empleada en el método propuesto por la AOAC para la cuantificación del ácido ascórbico. Esta solución de extracción consiste en una mezcla de ácido metafosfórico y ácido acético que evitan la auto-oxidación del ácido ascórbico (Pág. 15 del Capítulo 1, Fundamentos teóricos).

Para esto se prepararon 100 mL de solución de extracción, se mezclaron 8 mL de CH_3COOH concentrado con 40 mL de agua destilada, en esta solución se disolvieron 3 g de HPO_3 en lentejas y se registró su espectro (espectro 9). Con esta solución se preparó una disolución estándar de ácido ascórbico 5×10^{-3} mg/mL y se registró también su espectro.

Espectro 9. Solución de extracción



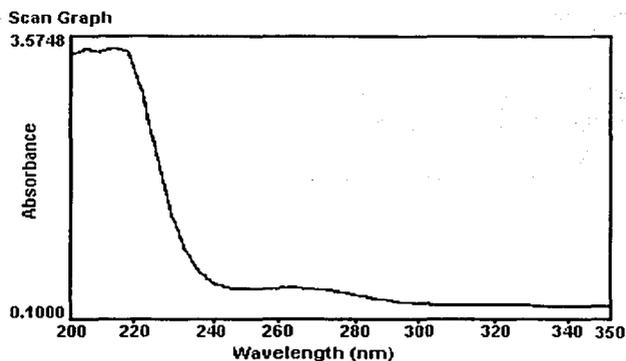
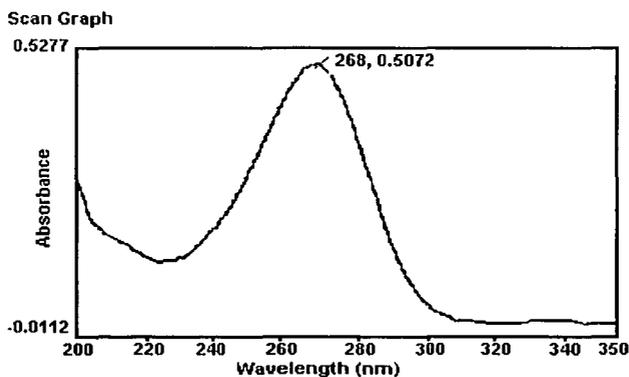
Espectro 10. Ácido ascórbico preparado con solución de extracción

En el espectro 9 se observa que la solución de extracción presenta absorción de 200-240 nm en la región de UV, en la zona en donde se esperaría la absorción del ácido ascórbico en medio ácido (245 nm reportado en la bibliografía²⁸). En el espectro 10 se observa que la solución estándar del ácido ascórbico sólo presenta la absorción de la solución de extracción, no se observa la absorción del ácido ascórbico, por lo que este medio no es el adecuado para realizar la determinación cuantitativa de ácido ascórbico.

Paso II:

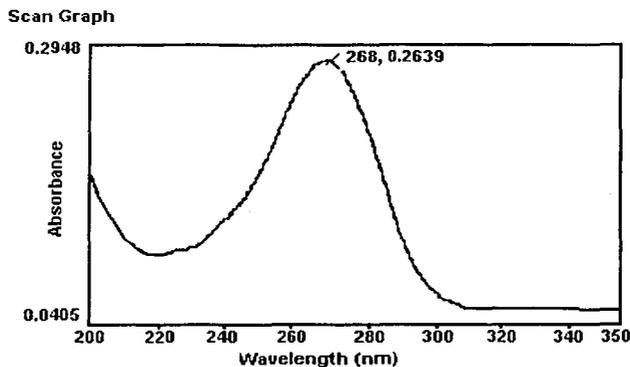
Se probó un buffer de acetatos pH 4.6 con una concentración de 2 M y se registró su espectro, se preparó una disolución de ácido ascórbico estándar 5×10^{-3} mg/mL en este buffer y se registró su espectro.

²⁸ Belitz, H. D., Grosch, W., Op. Cit. Pág. 445, 1997.

Espectro 11. Buffer de acetatos**Espectro 12. Ácido ascórbico preparado en buffer de acetatos**

En el espectro 11 se observa que el buffer de acetatos presenta absorción en la región del UV. En el espectro 12 del ácido ascórbico preparado en buffer de acetatos se encontró una absorción a una $\lambda_{\text{máx}}$ de 268 nm y una absorbancia de 0.5072.

Se comprobó si el ácido ascórbico preparado en buffer de acetatos se retiene en el cartucho de C18 por lo que se filtró esta misma disolución estándar por un cartucho activado previamente y se registró su espectro.

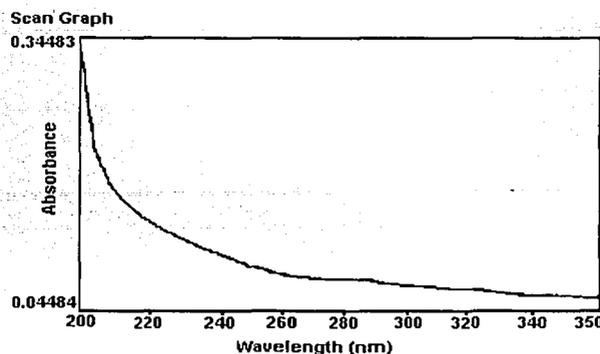
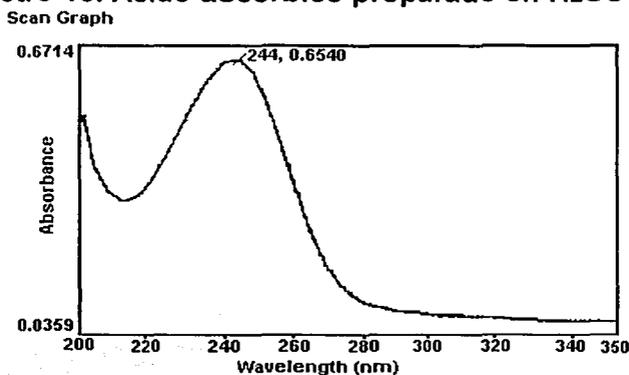
Espectro 13. Ácido ascórbico en buffer de acetatos filtrado por el cartucho de C18

Del espectro del ácido ascórbico preparado en buffer de acetatos y filtrado por el cartucho de C18 la absorbancia a 268 nm disminuye a 0.2639, por lo que se deduce que el ácido ascórbico preparado en buffer de acetatos se retiene el cartucho de C18.

Por lo tanto este medio de estabilización no es adecuado para realizar el análisis cuantitativo del ácido ascórbico en jugo.

Paso III:

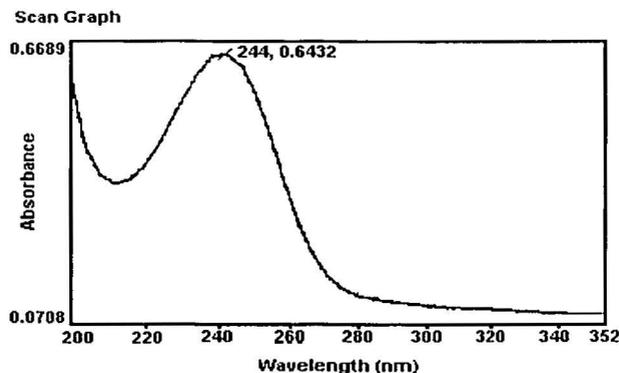
Se probó el ácido sulfúrico como medio estabilizador del ácido ascórbico, se preparó una disolución de H_2SO_4 0.1 M y se registró su espectro. Se preparó disolución estándar de ácido ascórbico 5×10^{-3} mg/mL en H_2SO_4 0.1M, se registró su espectro utilizando como blanco H_2SO_4 0.1 M.

Espectro 14. Ácido sulfúrico**Espectro 15. Ácido ascórbico preparado en H₂SO₄ 0.1M**

De los espectros obtenidos se observa que el H₂SO₄ 0.1M no presenta absorción en la región UV (espectro 14). La disolución estándar ácido ascórbico preparado en H₂SO₄ 0.1M presenta absorción en la región UV a una λ_{max} de 244 nm y una absorbancia de 0.6540 (espectro 15). La λ_{max} de absorción de ácido ascórbico se desplazó a longitudes de onda menor en H₂SO₄ 0.1M comparada con la λ_{max} de absorción registrada en agua (264 nm), debido a un efecto hipsocrómico en medio ácido de los sustituyentes del anillo láctónico del ácido ascórbico.

Se probó que el ácido ascórbico preparado en H_2SO_4 0.1M no se retuviera en el cartucho de C18 por lo que se filtró esta misma disolución estándar por un cartucho activado previamente y se registró su espectro.

Espectro 16. Ácido ascórbico preparado en H_2SO_4 0.1M filtrado por el cartucho de C 18



Del espectro 16 del ácido ascórbico preparado en H_2SO_4 0.1M y filtrado por el cartucho de C18 la absorbancia registrada a 244 nm es de 0.6432, como las absorbancias registradas son similares se deduce que el ácido ascórbico preparado en H_2SO_4 0.1M no se retiene el cartucho de C18.

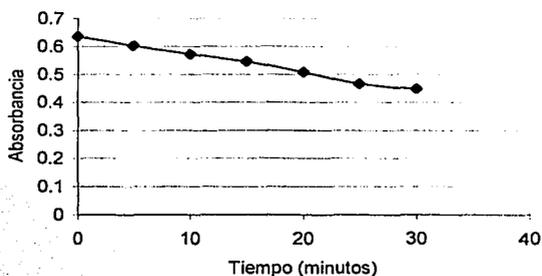
Por lo tanto este medio de estabilización es adecuado para realizar el análisis cuantitativo del ácido ascórbico en jugo.

Estabilidad de ácido ascórbico en diferentes medios de disolución

Se comprobó la estabilidad del ácido ascórbico en el nuevo medio de disolución, se realizaron lecturas de esta misma disolución cada cinco minutos durante media hora los resultados de absorbancia obtenidos se encuentran en la tabla 7.

Tabla 7. Lecturas realizadas a la disolución de ácido ascórbico en H₂SO₄ 0.1M

Tiempo (minutos)	Absorbancia (244 nm)
0	0.6370
5	0.6045
10	0.5730
15	0.5474
20	0.5089
25	0.4674
30	0.4495

Gráfica 4. Lecturas realizadas para la disolución de ácido ascórbico en H₂SO₄ 0.1M

Durante el tiempo de análisis las absorbancias registradas para el ácido ascórbico preparado en H₂SO₄ 0.1M disminuían, lo que indica que la absorbancia del ácido ascórbico al UV no es constante, lo que prueba que el ácido ascórbico se degrada bajo estas condiciones de trabajo.

Se deduce que la descomposición del ácido ascórbico en solución no sólo se debe al pH sino a la presencia de oxígeno disuelto, por esta razón se comenzó a trabajar combinando un medio fuertemente ácido y eliminando el oxígeno presente burbujeando N₂ a las disoluciones de ácido ascórbico.

Para esto se prepararon estándares de ácido ascórbico 8×10^{-3} mg/mL en agua y H_2SO_4 0.1M, y se probaron diferentes condiciones de trabajo en presencia y ausencia de oxígeno disuelto, se burbujeó nitrógeno para eliminarlo (tabla 8), el nitrógeno utilizado es de alta pureza (99.997% min.) de la marca INFRA

Las absorbancias se registraron a una λ_{max} de 244 nm para las disoluciones preparadas en H_2SO_4 0.1M y a 264 nm para las preparadas en agua. Los resultados se presentan la tabla 9.

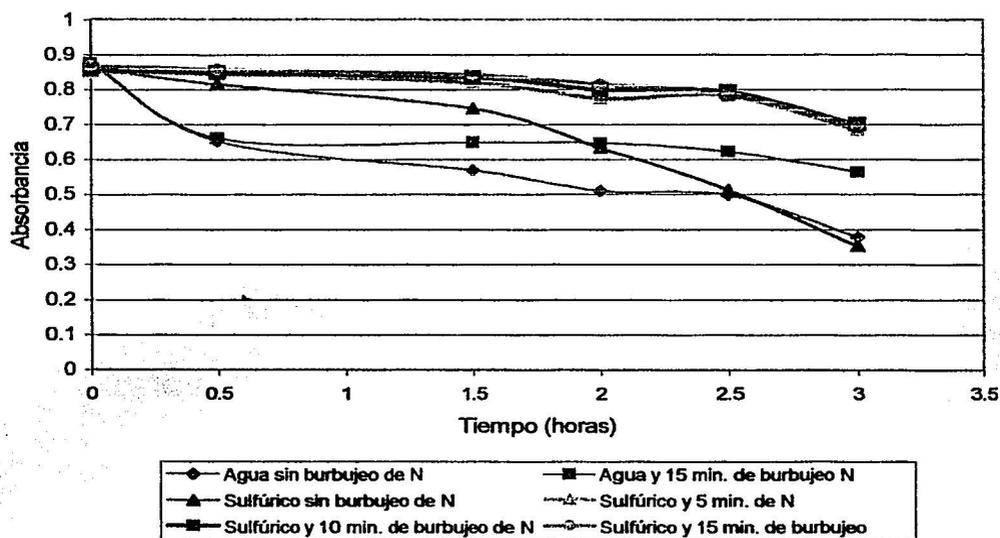
Tabla 8. Diferentes condiciones de preparación de ácido ascórbico para probar su estabilidad

Ácido ascórbico preparado en	Tiempo de Burbujeo con N_2
Agua destilada	sin burbujeo de N_2
Agua destilada	15 minutos
H_2SO_4 0.1M	sin burbujeo de N_2
H_2SO_4 0.1M	5 minutos
H_2SO_4 0.1M	10 minutos
H_2SO_4 0.1M	15 minutos

Tabla 9. Lecturas de absorbancia del ácido ascórbico en Agua destilada a 264 nm y en H_2SO_4 0.1M a 244 nm con diferentes condiciones de preparación

Tiempo horas	Agua sin burbujeo	Agua y 15 min. de burbujeo	H_2SO_4 0.1M sin burbujeo	H_2SO_4 0.1M con 5 min. de burbujeo	H_2SO_4 0.1M 10 min. de burbujeo	H_2SO_4 0.1M 15 min. de burbujeo
0	0.873	0.874	0.859	0.866	0.848	0.855
0.5	0.651	0.660	0.814	0.857	0.842	0.848
1.0	0.569	0.649	0.746	0.841	0.819	0.834
1.5	0.510	0.647	0.633	0.814	0.774	0.799
2.0	0.498	0.622	0.513	0.789	0.781	0.793
2.5	0.378	0.564	0.351	0.693	0.685	0.700

Gráfica 5. Estabilidad del ácido ascórbico en diferentes condiciones de preparación.



Con los resultados de la tabla 9 y con la gráfica 5 se concluye que las disoluciones acuosas de ácido ascórbico en presencia de oxígeno disuelto son menos estables que las disoluciones en ausencia de oxígeno disuelto. Las disoluciones más estables son las preparadas con H_2SO_4 0.1M y burbujeo de N_2 . Por esta razón el mejor medio de estabilización de la absorbancia del ácido ascórbico al UV es un medio fuertemente ácido en ausencia de oxígeno, por lo anterior se eligió como medio de estabilización H_2SO_4 0.1M y burbujeo con N_2 durante un tiempo de 5 a 15 minutos.

Preparación de la muestra para el análisis

Se prepararon diferentes diluciones de un jugo de uva recién abierto con H_2SO_4 0.1M de acuerdo a la tabla 10, filtrándose por el cartucho C18 y se registro su

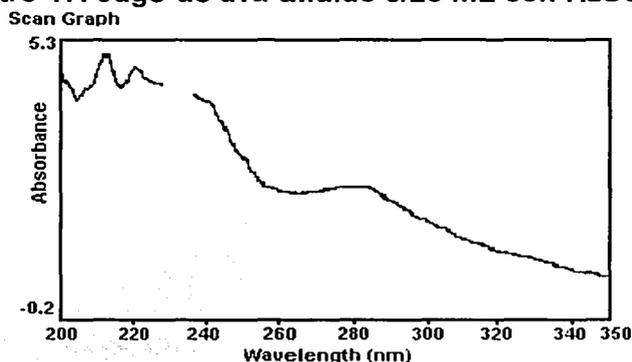
espectro de absorción al UV y su espectro con SD. Las lecturas se realizaron a una λ de 244 nm.

Tabla 10. Diferentes diluciones de jugo de uva en H₂SO₄ 0.1M

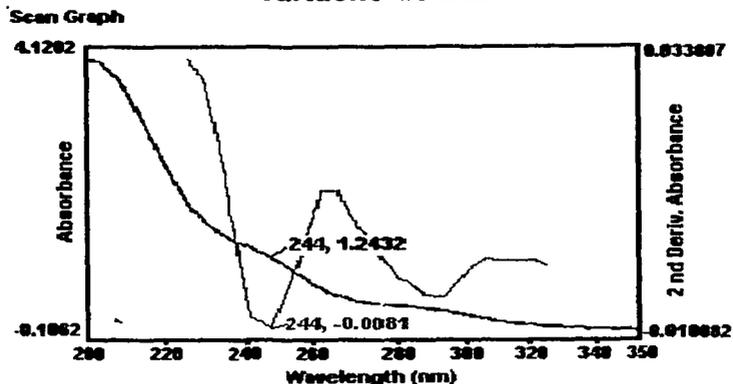
Número de dilución	mL de jugo	Volumen de aforo (mL) con de H ₂ SO ₄ 0.1M.
1	5	100
2	5	50
3	5	25
4	10	25
5	1	100

De las diluciones realizadas se concluye que la dilución 5/25 mL es la más adecuada para realizar el análisis cuantitativo de ácido ascórbico en el jugo ya que se observa la banda de absorción al UV del ácido ascórbico a 244 nm (1.2432) así como el mínimo bien definido de -0.0081 en la misma λ_{\max} en el espectro SD.

Espectro 17. Jugo de uva diluido 5/25 mL con H₂SO₄ 0.1M



Espectro 18. Jugo de uva diluido 5/25 mL con H₂SO₄ 0.1M filtrado por el cartucho de C18



En las soluciones más diluidas a la elegida la concentración de ácido ascórbico es tan pequeña que no se observa en el espectro.

Comportamiento del jugo en H₂SO₄ 0.1M y burbujeo de N₂

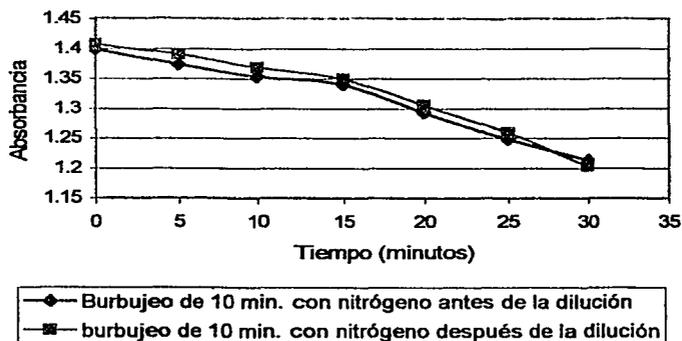
Se probó la estabilidad del ácido ascórbico en la dilución elegida para determinar el tiempo de análisis donde se mantenga el ácido ascórbico estable en el jugo, este se trabajó en las condiciones que se muestran en la tabla 11:

Tabla 11. Diferentes condiciones para probar la estabilidad del ácido ascórbico en el jugo.

Jugo de uva diluido en:	Tiempo de Burbujeo con N ₂
H ₂ SO ₄ 0.1M	Previo a la dilución 10 minutos
H ₂ SO ₄ 0.1M	10 minutos después de la dilución

Tabla 12. Absorbancias obtenidas para cada condición durante 30 minutos.

Tiempo minutos	A a 244 nm H ₂ SO ₄ 0.1 M previamente burbujeado con N ₂ 10 min.	A a 244 nm H ₂ SO ₄ 0.1 M y 10 min. de burbujeo posterior de N ₂
0	1.3980	1.4062
5	1.3830	1.3994
10	1.3624	1.3875
15	1.3394	1.3584
20	1.3021	1.3043
25	1.2478	1.2380
30	1.2134	1.2027

Gráfica 6. Estabilidad del ácido ascórbico en el jugo diluido

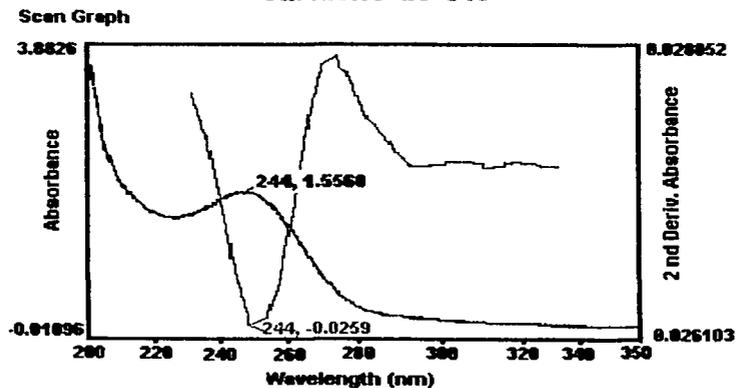
Con los resultados de la tabla 12 y la gráfica 6 se concluye que el comportamiento del ácido ascórbico en el jugo diluido presenta la misma estabilidad burbujeando nitrógeno antes o después de realizar la dilución. La absorbancia del ácido ascórbico en el jugo diluido con H₂SO₄ 0.1M se mantiene estable en un periodo de 10 minutos después de preparada la muestra, por lo que es el tiempo óptimo para realizar el análisis.

Se decidió trabajar con H₂SO₄ 0.1M burbujeado con N₂ antes de realizar la dilución.

Análisis de néctares de fruta

El contenido de ácido ascórbico en el néctar de manzana es de 29.64 mg/240 mL de acuerdo a la etiqueta del envase, por lo que la dilución que se hizo del néctar es mayor que para el jugo de uva.

Al néctar de manzana se le diluyó 5/50 mL con H₂SO₄ 0.1M burbujeado previamente con N₂ durante 10 minutos, una porción se filtró en papel filtro Whatman #50 para evitar que el cartucho de C18 se tapara, se filtró una porción del néctar diluido por el cartucho de C18 y se registró el espectro de absorción UV y su espectro con segunda derivada (SD).

Espectro 19. Néctar de manzana diluido 5/50 mL con H₂SO₄ 0.1M filtrado por el cartucho de C18

En el espectro del néctar de manzana se observa una absorción de ácido ascórbico en un λ_{max} de 244 nm y la absorbancia obtenida es de 1.5560 en el espectro UV y por SD es de -0.0259 , por lo tanto la dilución que se realizó es la adecuada para el análisis.

METODOLOGÍA PROPUESTA**DETERMINACIÓN DE ÁCIDO ASCÓRBICO POR ESPECTROFOTOMETRÍA UV
CON SEGUNDA DERIVADA EN JUGO DE FRUTA PROCESADO****I.- Preparación de reactivos:**

Solución de H₂SO₄ 0.1M: en un matraz aforado de 500 mL se colocan 3 mL de H₂SO₄ concentrado y se lleva al aforo con agua destilada, se mezcla y se vierte en un frasco de vidrio previamente rotulado.

Solución estándar de ácido ascórbico 0.05 mg/mL: en una nave de vidrio se pesan 5 mg de ácido ascórbico se traspasan a un vaso de precipitados de 100 mL, se adicionan aproximadamente 20 mL de H₂SO₄ 0.1M burbujeado N₂ durante 5 minutos y se disuelve agitando con un agitador de vidrio. La disolución se vierte en un matraz aforado de 100 mL y se lleva al volumen con H₂SO₄ 0.1M previamente burbujeado con N₂ durante 5 minutos. Se agita y el matraz se forra con papel aluminio. Burbujear esta disolución estándar durante 10 minutos con N₂.

Activación cartucho de C18: los cartuchos de C18 se colocan en un vaso de precipitado de 50 mL, a cada cartucho se le adiciona 1 mL de metanol absoluto y con una jeringa de 5 mL se ayuda a que el metanol pase por la fase sólida y salga del cartucho. Se utiliza un cartucho para cada concentración utilizada en la curva patrón así como para cada muestra que se va a trabajar.

II.- Procedimiento de la preparación de la curva patrón de ácido ascórbico en H₂SO₄ 0.1M y filtrada en un cartucho de C18:

La curva patrón se prepara realizando las siguientes diluciones:

Tabla 13.-Curva patrón de ácido ascórbico en H₂SO₄ 0.1M burbujeado previamente con N₂ durante 10 minutos y filtrada por el cartucho de C18

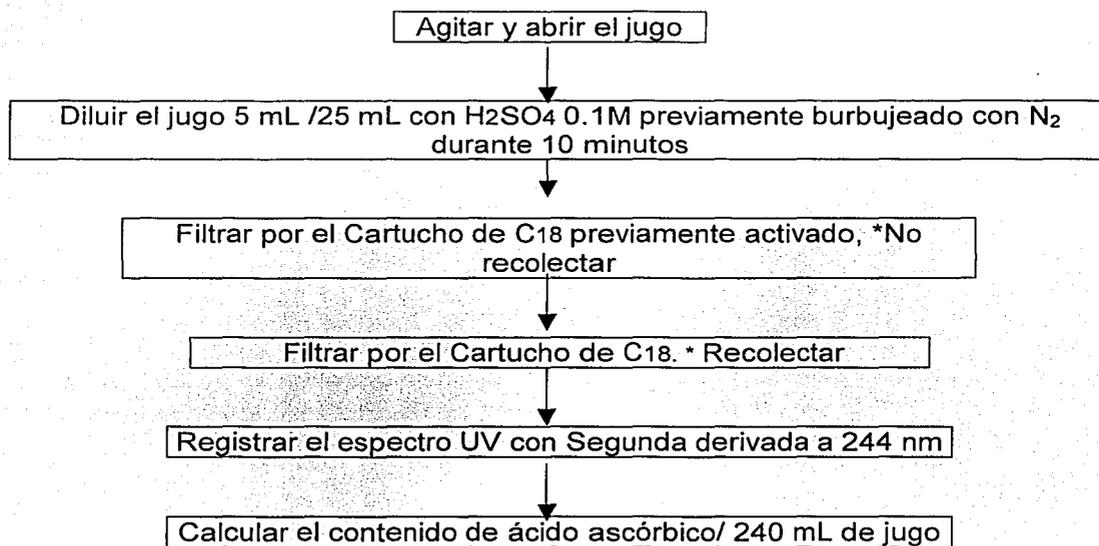
Número de matraz	mL de solución 0.05 mg/mL de ácido ascórbico	Llevar al volumen con H ₂ SO ₄ 0.1M	Concentración final mg/mL
1	0.4	25	0.0008
2	1	25	0.002
3	3	25	0.006
4	5	25	0.010
5	7	25	0.014
6	9	25	0.018
7	11	25	0.022
8	13	25	0.026
9	15	25	0.030
10	17	25	0.034

Filtrar una porción de cada dilución por un cartucho de C18 activado previamente y descartar, filtrar 5 mL más de la solución estándar y recolectar en un matraz aforado de 25 mL forrado con papel aluminio y rotulado.

Registrar a cada dilución el espectro de absorción al UV con Segunda Derivada (SD). Las lecturas se realizan a una λ_{max} de 244 nm utilizando como blanco H₂SO₄ 0.1M burbujeado con N₂ durante 10 minutos.

III.- Trabajo con la muestra:

Esquema 1.- Jugo de fruta procesado sin fruta suspendida



Procedimiento:

1. Agitar el jugo y abrirlo.
2. Tomar el jugo con una pipeta volumétrica de 5 mL y transferirlo a un matraz aforado de 25 mL.
3. Llevar al aforo con H₂SO₄ 0.1M previamente burbujeado con N₂ durante 10 minutos y mezclar.
4. Filtrar por el cartucho de C18 previamente activado. Introducir aproximadamente 3 mL del jugo diluido en el cartucho de C18 y con una jeringa de 5 mL ayudar a que el líquido se filtre por la fase sólida, recolectar este líquido filtrado en un vaso de desechos, este filtrado no es recolectado

para evitar que el jugo se diluya más por el metanol que se encuentra absorbido en la fase sólida, se filtran otros 5 mL de jugo diluido y se recolecta.

5. Registrar el espectro de absorción al UV con Segunda Derivada (SD) del jugo filtrado utilizando como blanco el H₂SO₄ 0.1M burbujeado con N₂, medir la absorbancia a una λ_{max} de 244 nm en el espectro UV con Segunda Derivada (SD)
6. Calcular el contenido de ácido ascórbico en el jugo.

Esquema 2.- Néctar de fruta procesado



Procedimiento:

1. Agitar el néctar y abrirlo.
2. Tomar el néctar con una pipeta volumétrica de 5 mL y transferirlo a un matraz aforado de 50 mL.
3. Llevar al aforo con H_2SO_4 0.1M previamente burbujeado con N_2 durante 10 minutos y mezclar.
4. Filtrar una parte del néctar diluido por papel Whatman #50 y recolectar en un matraz aforado de 25 mL.
5. Filtrar por el cartucho de C18 previamente activado. Introducir aproximadamente 3 mL del néctar diluido y filtrado en el cartucho de C18 y con una jeringa de 5 mL ayudar a que el líquido se filtre, recolectar el filtrado en un vaso de desechos, este filtrado no es recolectado para evitar que el jugo se diluya más por el metanol que se encuentra absorbido en la fase sólida, se filtran otros 5 mL de néctar diluido y se recolecta.
6. Registrar el espectro de absorción al UV con Segunda Derivada (SD) del néctar filtrado utilizando como blanco el H_2SO_4 0.1M burbujeado con N_2 . Medir la absorbancia a una λ_{max} de 244 nm en el espectro UV con Segunda Derivada (SD)
7. Calcular el contenido de ácido ascórbico en el néctar.

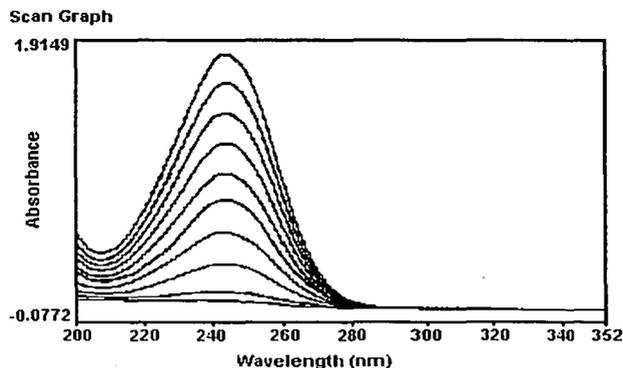
CAPÍTULO 3
COMPROBACIÓN DEL MÉTODO

Para la comprobación del método propuesto se preparó la curva patrón de trabajo siguiendo la metodología propuesta en la página 60 del Capítulo 2 (Desarrollo del Método Analítico), se registraron sus espectros de UV y UV con Segunda Derivada a 244 nm. Los resultados de la curva patrón se muestran en la tabla 14.

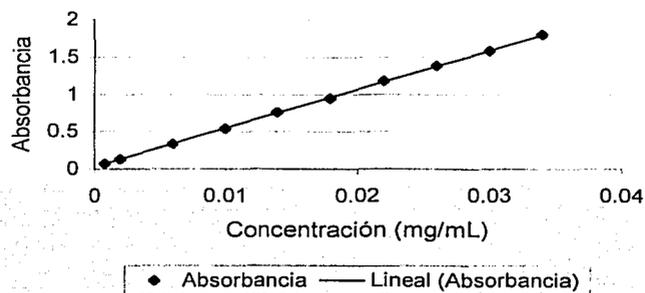
Tabla 14. Resultados de la Curva patrón de ácido ascórbico en H₂SO₄ 0.1 M a 244 nm por UV filtrada por C18

Concentración mg/mL de ácido ascórbico	A de UV a 244 nm	A de UV con segunda derivada (SD) a 244 nm
0.0008	0.0740	-0.0012
0.002	0.1341	-0.0034
0.006	0.3390	-0.0092
0.010	0.5421	-0.0143
0.014	0.7650	-0.0201
0.018	0.9531	-0.0263
0.022	1.1853	-0.0324
0.026	1.3830	-0.0360
0.030	1.5810	-0.0470
0.034	1.8031	-0.0501

Espectro 20. Curva patrón de ácido ascórbico en H₂SO₄ 0.1 M a 244 nm por UV filtrada por C18



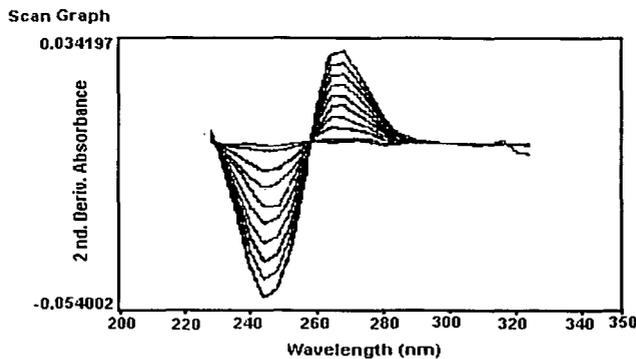
Gráfica 7. Curva patrón de ácido ascórbico en H₂SO₄ 0.1 M a 244 nm por UV filtrada por C18



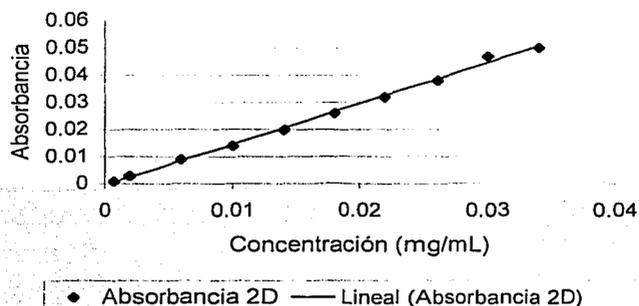
Datos de la regresión lineal:

A= 0.2877
B= 52.0367
r= 0.9999

Espectro21. Curva patrón de ácido ascórbico en H₂SO₄ 0.1 M a 244 nm con UV por Segunda Derivada filtrada por C18



Gráfica 8. Curva patrón de ácido ascórbico en H₂SO₄ 0.1 M a 244 nm con Segunda Derivada filtrada por C18



Datos de la regresión lineal:

$r = 0.9985$

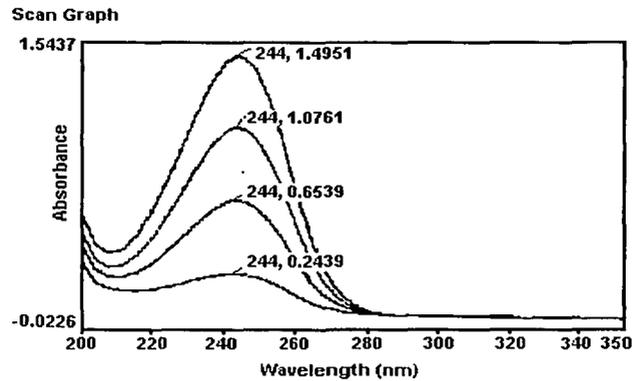
$A = -4.4760 \times 10^{-4}$

$B = 1.5034$

Para trazar la gráfica de la segunda derivada se tomó el valor absoluto de las absorbancias.

Para comprobar la linealidad y la respuesta de la curva patrón se prepararon diferentes disoluciones de ácido ascórbico estándar de concentraciones 4×10^{-3} mg/mL, 0.012 mg/mL, 0.020 mg/mL y 0.028 mg/mL y se registró su espectro UV y su espectro UV con Segunda Derivada a 244 nm. Obteniéndose los siguientes resultados:

Espectro 22. Adiciones patrón de ácido ascórbico para comprobar el método propuesto por UV



Espectro 23. Adiciones patrón de ácido ascórbico para comprobar el método propuesto por UV con segunda derivada

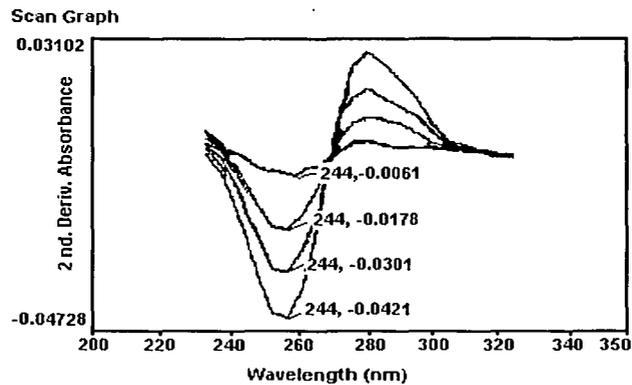


Tabla 15. Resultados de la solución estándar de ácido ascórbico 4×10^{-3} mg/mL en H_2SO_4 0.1 M a 244 nm por UV

Número de repetición	A de UV a 244 nm	Concentración mg/mL de ácido ascórbico
1	0.2439	4.1341×10^{-3}
2	0.2428	4.1130×10^{-3}
3	0.2432	4.1207×10^{-3}
4	0.2400	4.0600×10^{-3}
5	0.2400	4.0600×10^{-3}
6	0.2437	4.1303×10^{-3}

7	0.2419	4.0960×10^{-3}
8	0.2440	4.1360×10^{-3}
9	0.2435	4.1264×10^{-3}
10	0.2439	4.1341×10^{-3}
Promedio		4.1211×10^{-3}

Tabla 16. Resultados de la solución estándar de ácido ascórbico 4×10^{-3} mg/mL en H_2SO_4 0.1 M a 244 nm por UV con segunda derivada

Número de repetición	A de UV con segunda derivada (SD) a 244 nm	Concentración mg/mL de ácido ascórbico
1	0.0061	4.1779×10^{-3}
2	0.0060	4.1113×10^{-3}
3	0.0061	4.1779×10^{-3}
4	0.0059	4.0448×10^{-3}
5	0.0059	4.0448×10^{-3}
6	0.0061	4.1779×10^{-3}
7	0.0058	3.9790×10^{-3}
8	0.0061	4.1779×10^{-3}
9	0.0061	4.1779×10^{-3}
10	0.0060	4.1113×10^{-3}
Promedio		4.1181×10^{-3}

Tabla 17. Resultados de la solución estándar de ácido ascórbico 0.012 mg/mL en H_2SO_4 0.1 M a 244 nm por UV.

Número de repetición	A de UV a 244 nm	Concentración mg/mL de ácido ascórbico
1	0.6539	0.01201
2	0.6590	0.01211
3	0.6580	0.01209
4	0.6560	0.01206
5	0.6550	0.01203
6	0.6550	0.01203
7	0.6570	0.01199
8	0.6540	0.01201
9	0.6533	0.01206
10	0.6520	0.01197
Promedio		0.01203

Tabla 18. Resultados de la solución estándar de ácido ascórbico 0.012 mg/mL en H₂SO₄ 0.1 M a 244 nm por UV con segunda derivada

Número de repetición	A de UV con segunda derivada (SD) a 244 nm	Concentración mg/mL de ácido ascórbico
1	0.0178	0.11970
2	0.0180	0.01210
3	0.0181	0.01217
4	0.0179	0.01203
5	0.0179	0.01203
6	0.0179	0.01203
7	0.0178	0.01197
8	0.0179	0.01203
9	0.0178	0.01197
10	0.0178	0.01197
Promedio		0.01202

Tabla 19 . Resultados de la solución estándar de ácido ascórbico 0.020 mg/mL en H₂SO₄ 0.1 M a 244 nm por UV

Número de repetición	A de UV a 244 nm	Concentración mg/mL de ácido ascórbico
1	1.0761	0.02012
2	1.0759	0.02012
3	1.0721	0.02004
4	1.0742	0.02019
5	1.0741	0.02018
6	1.0728	0.02006
7	1.0788	0.02017
8	1.0725	0.02005
9	1.0788	0.02071
10	1.0792	0.02018
Promedio		0.02013

Tabla 20. Resultados de la solución estándar de ácido ascórbico 0.020 mg/mL en H₂SO₄ 0.1 M a 244 nm por UV con segunda derivada

Número de repetición	A de UV con segunda derivada (SD) a 244 nm	Concentración mg/mL de ácido ascórbico
1	0.0301	0.02016
2	0.0301	0.02016
3	0.0299	0.02003
4	0.0302	0.02023
5	0.0301	0.02016
6	0.0300	0.02009
7	0.0301	0.02016
8	0.0300	0.02009
9	0.0301	0.02016
10	0.0301	0.02016
Promedio		0.02014

Tabla 21. Resultados de la solución estándar de ácido ascórbico 0.028 mg/mL en H₂SO₄ 0.1 M a 244 nm por UV.

Número de repetición	A de UV a 244 nm	Concentración mg/mL de ácido ascórbico
1	1.4951	0.02817
2	1.4952	0.02818
3	1.4874	0.02803
4	1.4925	0.02812
5	1.4947	0.02817
6	1.4939	0.02815
7	1.4356	0.02803
8	1.4741	0.02777
9	1.4932	0.02814
10	1.4785	0.02786
Promedio		0.02796

Tabla 22. Resultados de la solución estándar de ácido ascórbico 0.028 mg/mL en H₂SO₄ 0.1 M a 244 nm por UV con segunda derivada

Número de repetición	A de UV con segunda derivada (SD) a 244 nm	Concentración mg/mL de ácido ascórbico
1	0.0421	0.02815
2	0.0422	0.02822
3	0.0419	0.02802
4	0.0420	0.02809
5	0.0421	0.02815
6	0.0420	0.02809
7	0.0415	0.02775
8	0.0416	0.02785
9	0.0422	0.02822
10	0.0417	0.02789
Promedio		0.02804

Los resultados de la concentración de ácido ascórbico de las soluciones estándares calculadas por UV y UV por segunda derivada se presentan en la tabla 23.

Con el promedio y la desviación estándar de los resultados obtenidos del contenido de ácido ascórbico para cada jugo por el método de UV y UV con segunda derivada se calculó el intervalo de confianza con una probabilidad del 99.99%. El cálculo del límite de confianza se muestra en la página 101 del Apéndice A.

Tabla 23. Concentración de ácido ascórbico en soluciones estándar calculadas por los métodos UV y UV con segunda derivada (SD).

Concentración de la solución estándar mg/mL	Concentración de ácido ascórbico mg/mL por UV a 244 nm	Concentración de ácido ascórbico mg/mL por UV con SD a 244 nm
4×10^{-3}	$4.1211 \times 10^{-3} \pm 3.4952 \times 10^{-5}$	$4.1181 \times 10^{-3} \pm 6.222 \times 10^{-5}$
0.012	$0.01203 \pm 3.9678 \times 10^{-5}$	$0.01202 \pm 5.8611 \times 10^{-5}$
0.020	$0.02013 \pm 5.2666 \times 10^{-5}$	$0.02014 \pm 4.9407 \times 10^{-5}$
0.028	$0.02796 \pm 3.1844 \times 10^{-4}$	$0.02804 \pm 1.4471 \times 10^{-4}$

Análisis estadístico de los datos obtenidos por las metodologías UV y UV con Segunda Derivada (SD)

Se comparó el contenido de ácido ascórbico cuantificado por el método UV y UV con segunda derivada (SD) para cada concentración de disolución estándar de ácido ascórbico. Para hacer esta comparación se realizó el análisis estadístico de comparación de medias de dos muestras mediante una prueba t-Student.

Se realizó la comparación de desviaciones estándar mediante la prueba F de dos colas para conocer los errores aleatorios de estos dos conjuntos de datos.

Las pruebas de hipótesis y los cálculos de prueba t-Student y F de dos colas teóricas se muestran en las páginas 102 y 105 del Apéndice A.

Los resultados obtenidos para ambas pruebas se muestran en la tabla 24.

Tabla 24. Resumen de pruebas estadísticas. Estadísticas calculadas y teóricas para la prueba t-Student y prueba F.

Concentración de la solución estándar mg/mL	t calculada	t teórica con 18 grados de libertad	F calculada	F teórica con 9,9 grados de libertad
4×10^{-3}	0.1359	2.5524	0.2874	5.351 y 0.1869
0.012	0.3986	2.5524	0.4582	5.351 y 0.1869
0.020	0.3907	2.5524	1.1362	5.351 y 0.1869
0.028	-0.6452	2.5524	4.8374	5.351 y 0.1869

De los resultados obtenidos de las pruebas estadísticas se tiene que las medias de los dos métodos probados son iguales con una probabilidad del 99.99%. Con esta información concluimos que la media del método UV es igual que la media del método UV con segunda derivada por lo que el contenido de ácido ascórbico cuantificado por el método UV es el mismo que el contenido de ácido ascórbico cuantificado con segunda derivada para las soluciones estándar 4×10^{-3} , 0.012, 0.020, 0.028 mg/mL de ácido ascórbico con un nivel de significancia de $\alpha = 0.01$.

Con los resultados de la prueba F concluimos que la precisión del método UV con segunda derivada propuesto es igual que la del método UV con un nivel de significancia de $\alpha = 0.01$ para cada una de las soluciones estándar de ácido ascórbico analizadas, por lo que se concluye que el método UV con segunda derivada tiene la misma precisión que el método de UV.

Comparación del método AOAC por titulación directa con 2,6-diclorofenolindofenol y el método de UV con segunda derivada para la cuantificación de ácido ascórbico

Para comparar el método establecido por la AOAC con el método propuesto de UV con segunda derivada se preparó una solución estándar de ácido ascórbico 0.25 mg/mL y se diluyó para tener una concentración 0.025 mg/mL, ambas disoluciones se titularon con el indicador 2,6-diclorofenolindofenol preparado como lo indica el método descrito en la página 15 del Capítulo 1 Fundamentos teóricos, a cada una de estas disoluciones se les registró su espectro de absorción al UV con segunda derivada y se cuantificó el contenido de ácido ascórbico con el método desarrollado.

Tabla 25. Resultados de la concentración de ácido ascórbico estándar 0.25 mg/mL determinada por la titulación con 2,6-diclorofenolindofenol y por el método propuesto por UV con segunda derivada

Número de repetición	Titulación con 2,6-diclorofenolindofenol	UV con segunda derivada
1	0.2559	0.2572
2	0.2559	0.2565
3	0.2608	0.2565
4	0.2559	0.2565
5	0.2559	0.2559
6	0.2608	0.2559
7	0.2559	0.2552
8	0.2559	0.2552
9	0.2559	0.2552
10	0.2608	0.2559
Promedio	0.2573	0.2560

Tabla 26. Resultados de la concentración de ácido ascórbico estándar 0.025 mg/mL determinada por la titulación con 2,6-diclorofenolindofenol y por el método propuesto de UV con segunda derivada

Número de repetición	Titulación con 2,6-diclorofenolindofenol	UV con segunda derivada
1	0.02461	0.02585
2	0.02461	0.02579
3	0.02461	0.02565
4	0.02953	0.02565
5	0.02953	0.02585
6	0.02953	0.02585
7	0.02461	0.02565
8	0.02953	0.02565
9	0.02953	0.02579
10	0.02953	0.02565
Promedio	0.02657	0.02574

Tabla. 27. Resumen de resultados del contenido de ácido ascórbico calculado a partir de soluciones estándares por el método AOAC y el método propuesto de UV con segunda derivada

Concentración de la solución estándar de ácido ascórbico	Titulación con 2,6-diclorofenolindofenol	UV con segunda derivada
0.25 mg/mL	$0.2573 \pm 2.1117 \times 10^{-3}$ mg/mL	$0.2560 \pm 6.0941 \times 10^{-4}$ mg/mL
0.025 mg/mL	$0.02657 \pm 2.2722 \times 10^{-3}$ mg/mL	$0.02574 \pm 8.1625 \times 10^{-5}$ mg/mL

Análisis estadístico de los datos obtenidos por la metodología propuesta por la AOAC titulación con 2,6- diclorofenolindofenol y UV con Segunda Derivada (SD)

Se comparó el contenido de ácido ascórbico cuantificado por el método propuesto por la AOAC titulación con 2,6- diclorofenolindofenol y UV con segunda derivada (SD) para cada concentración de la solución estándar de ácido ascórbico. Para hacer esta comparación se realizó el análisis estadístico de comparación de medias de dos muestras mediante una prueba t-Student.

Se realizó la comparación de desviaciones estándar mediante la prueba F para conocer los errores aleatorios de estos dos conjuntos de datos.

Los resultados obtenidos para ambas pruebas se muestran en la tabla 28.

Tabla 28. Resumen de pruebas estadísticas. Estadísticas calculadas y teóricas para la prueba t-Student y prueba F para la concentración de ácido ascórbico

Concentración mg/mL	t calculada	t teórica con 18 grados de libertad	F calculada	F teórica con 9,9 grados de libertad
0.25	1.6696	2.5524	12.1789	5.352
0.025	1.0323	2.5524	710	5.352

De los resultados obtenidos de las pruebas estadísticas se tiene que las medias de los dos métodos probados son iguales con una probabilidad del 99.99%.

Con esta información concluimos que la media del método establecido por la AOAC por titulación con 2,6-diclorofenolindofenol es igual que la media del método UV con segunda derivada por lo que el contenido de ácido ascórbico cuantificado por el método establecido por la AOAC es el mismo que el contenido de ácido ascórbico cuantificado con segunda derivada para las soluciones 0.25 mg/mL y 0.025 mg/mL de ácido ascórbico estándar con un nivel de significancia de $\alpha = 0.01$.

Con los resultados de la prueba F concluimos que la varianza del método establecido por la AOAC por titulación con 2,6-diclorofenolindofenol es mayor que la varianza del método UV con segunda derivada propuesto con un nivel de significancia de $\alpha = 0.01$ para cada una de las soluciones estándar de ácido ascórbico analizadas. También se puede concluir que mientras las disoluciones de ácido ascórbico sean de una concentración menor de 0.025 mg/mL el método establecido por las AOAC es menos preciso que el método UV con segunda derivada desarrollado.

Por lo que se concluye que el método UV con segunda derivada tiene mayor precisión que la titulación con 2,6-diclorofenolindofenol.

Comprobación de la repetibilidad de absorbancias obtenidas. Determinación de ordenada al origen, pendiente y coeficiente de correlación del método UV con segunda derivada.

Para comparar la reproducibilidad de resultados se preparó la curva patrón varias veces con el método propuesto, se registraron los espectros de cada curva patrón en UV con segunda derivada a 244 nm. Los resultados se presentan en la tabla 29.

Con los resultados de concentración y absorbancia obtenida se calculó el coeficiente de correlación, la ordenada al origen (A) y la pendiente (B), para estos dos últimos se calculó el intervalo de confianza.

Los cálculos para determinar el intervalo de confianza de la ordenada al origen y la pendiente se muestran en la página 106, 107 Y 108 del Apéndice A.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

Tabla 29. Resultados experimentales obtenidos de las curvas patrón de ácido ascórbico

Conc. mg/mL de ácido ascórbico	Curva patrón 1	Curva patrón 2	Curva Patrón 3	Curva patrón 4	Curva patrón 5	Curva patrón 6	Curva patrón 7	Curva patrón 8	Curva patrón 9
8×10^{-4}	0.0018	0.0019	0.0017	0.0018	0.0016	0.0018	0.0020	0.0021	0.0019
2×10^{-3}	0.0028	0.0029	0.0030	0.0029	0.0027	0.0031	0.0032	0.0031	0.0032
6×10^{-3}	0.0091	0.0093	0.0094	0.0092	0.0089	0.0094	0.0098	0.0099	0.0094
0.010	0.0145	0.0147	0.0150	0.0151	0.0143	0.0153	0.0155	0.0160	0.0154
0.014	0.0205	0.0211	0.0214	0.0213	0.0204	0.0217	0.0220	0.0226	0.0216
0.018	0.0268	0.0267	0.0275	0.0274	0.0265	0.0273	0.0277	0.0283	0.0276
0.022	0.0325	0.0324	0.0336	0.0338	0.0319	0.0337	0.0334	0.0345	0.0319
0.026	0.0389	0.0390	0.0393	0.0399	0.0392	0.0398	0.0400	0.0401	0.0389
0.030	0.0442	0.0452	0.0461	0.0463	0.0447	0.0464	0.0468	0.0466	0.0453
0.034	0.0509	0.0510	0.0524	0.0519	0.0512	0.0521	0.0524	0.0524	0.0519
Coefficiente de correlación r	0.99986	0.99988	0.99986	0.99988	0.99960	0.99990	0.99980	0.99983	0.99940
Ordenada al origen A	$4.69 \times 10^{-5} \pm$ 1.87×10^{-3}	$1.6 \times 10^{-4} \pm$ 1.85×10^{-3}	$6.4 \times 10^{-4} \pm$ 1.67×10^{-3}	$4.11 \times 10^{-5} \pm$ 1.5×10^{-3}	$-2.68 \times 10^{-4} \pm$ 2.6×10^{-3}	$2.06 \times 10^{-4} \pm$ 1.3×10^{-4}	$4.1 \times 10^{-4} \pm$ 1.98×10^{-3}	$6.87 \times 10^{-4} \pm$ 1.8×10^{-3}	$3.94 \times 10^{-4} \pm$ 1.9×10^{-3}
Pendiente B	$1.4836 \pm$ 0.03007	$1.4901 \pm$ 0.02981	$1.5280 \pm$ 0.02679	$1.5295 \pm$ 0.0241	$1.4992 \pm$ 0.0409	$1.5267 \pm$ 0.02025	$1.5276 \pm$ 0.03162	$1.5282 \pm$ 0.02923	$1.4936 \pm$ 0.03198

A los resultados de absorbancia de las curvas patrón obtenidas se les aplicó un análisis de varianza (ANOVA) para demostrar que no existe diferencia significativa entre ellos y los resultados son repetibles.

La hipótesis planteada y el desarrollo estadístico se muestran en las páginas 110, 111 y 112 en el Apéndice A. Los resultados del análisis de varianza se muestran en la tabla 30.

Tabla 30. Resumen de resultados del Análisis de Varianza realizado a los resultados de absorbancia de las curvas patrón

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F ₀	F teórica con 9,70 grados de libertad
Tratamientos	9	0.06725	7.4722×10^{-3}	-0.5.5259	2.672
Bloques	8	0.05540	-1.3522×10^{-3}		
Error	72	-0.09736			
Total	89	0.02528			

Puesto que F calculada es menor que la teórica la conclusión es que con un nivel de significancia $\alpha = 0.01$ los resultados de las nueve curvas patrón elaboradas no presentan diferencia significativa entre ellos, por lo que concluimos que los resultados del método propuesto son repetibles.

Establecimiento del límite de detección y límite de cuantificación del método UV con segunda derivada propuesto para la determinación de ácido ascórbico en jugos procesados

Para determinar la sensibilidad del método propuesto se estableció el límite de detección o concentración del analito que proporciona una señal igual a la señal del blanco y el límite de cuantificación o la concentración más baja para realizar mediciones cuantitativamente precisas del método propuesto se utilizaron los

resultados de ordenada al origen (A) y pendiente (B) obtenidos para cada curva patrón elaborada. Los cálculos realizados de límite de detección y límite de cuantificación se muestran en la página 109 del Apéndice A.

Se calculó el promedio de los resultados obtenidos de absorbancia, coeficiente de correlación, ordenada al origen, pendiente, límite de detección, límite de cuantificación para determinar cada uno de estos parámetros del método desarrollado de UV con segunda derivada.

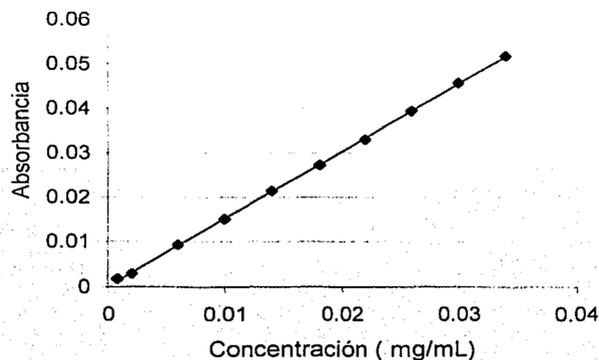
Los resultados de las absorbancias promedio se muestran en la tabla 31.

Tabla 31. Resultados promedio de las curvas patrón realizadas

Concentración mg/mL de ácido ascórbico	Promedio de las 9 curvas patrón
8×10^{-4}	0.00184
2×10^{-3}	0.00298
6×10^{-3}	0.00937
0.010	0.01508
0.014	0.02140
0.018	0.02731
0.022	0.03307
0.026	0.03945
0.030	0.04573
0.034	0.05180

Los resultados de concentración y absorbancia se graficaron para obtener la recta de regresión lineal del método desarrollado (Gráfica 9).

Gráfica 9. Curva patrón del método desarrollado por espectrofotometría UV con segunda derivada para la determinación de ácido ascórbico en jugo de fruta procesado



Datos de la regresión lineal:

$r = 0.9999$

$A = 1.8838$

$B = 1.5119$

Los resultados límite de detección y límite de cuantificación del método propuesto por espectrofotometría UV con segunda derivada para la determinación de ácido ascórbico en jugos de fruta procesados se muestran en la tabla 32.

Tabla 32. Parámetros del método establecido para la determinación de ácido ascórbico por Ultravioleta con segunda derivada en jugos procesados.

$r = 0.9999$
$A = 1.8838 \pm 0.001347$
$B = 1.5119 \pm 0.0217$
Límite de detección (LDD): 5.2155×10^{-4} mg/mL
Límite de cuantificación (LDC): 1.7385×10^{-3} mg/mL

CAPÍTULO 4

APLICACIÓN DEL MÉTODO

El método desarrollado se utilizó para determinar el contenido de ácido ascórbico en productos de marca Del Valle, en dos jugos, uva y manzana y un néctar de manzana, de cada producto se trabajó con un mismo lote de producción.

Se trabajó con la curva patrón UV y UV con Segunda Derivada utilizada en la comprobación del método (Pág. 66, 67 y 68 del Capítulo 3, Comprobación del Método). Cada jugo se analizó siguiendo la metodología propuesta en las páginas 62 y 63 del Capítulo 2, Desarrollo del Método Analítico.

Tabla 33. Resultados experimentales obtenidos para el Jugo de uva marca Del Valle por UV

# Jugo	A de UV a 244 nm	mg ascórbico/ 240 mL de jugo de uva
1	1.5465	35.0000
2	1.5240	34.4819
3	1.5523	35.1346
4	1.5549	35.1945
5	1.5571	35.2453
6	1.4951	33.8155
7	1.4919	33.7417
8	1.5683	35.5036
9	1.5547	35.1899
10	1.5517	35.1207
Promedio		34.8428

Tabla 34. Resultados experimentales obtenidos para el Jugo de uva marca Del Valle por UV con Segunda Derivada

# Jugo	A de UV con segunda derivada (SD) a 244 nm	mg ascórbico/240 mL de jugo de uva
1	0.0216	17.8338
2	0.0221	18.2425
3	0.0231	19.0600
4	0.0234	19.3053
5	0.0223	18.4060
6	0.0217	17.9155
7	0.0226	18.6513

8	0.0221	18.2425
9	0.0221	18.2425
10	0.0223	18.4060
Promedio		18.4305

Tabla 35. Resultados experimentales obtenidos para el Jugo de manzana marca Del Valle por UV.

# Jugo	A de UV a 244 nm	mg ascórbico/ 240 mL de jugo de manzana
1	1.5461	34.9916
2	1.5146	34.2652
3	1.5213	34.4197
4	1.5137	34.2444
5	1.4842	33.5641
6	1.3673	30.8682
7	1.3668	30.8567
8	1.3599	30.6976
9	1.3993	31.6062
10	1.3491	30.4485
Promedio		32.5962

Tabla 36. Resultados experimentales obtenidos para el Jugo de manzana marca Del Valle por UV con Segunda Derivada

# Jugo	A de UV con segunda derivada (SD) a 244 nm	mg ascórbico/240 mL de jugo de manzana
1	0.0230	18.9783
2	0.0225	18.5695
3	0.0239	19.7141
4	0.0233	19.2235
5	0.0230	18.9783
6	0.0220	18.1608
7	0.0219	18.0790
8	0.0217	17.9155
9	0.0241	19.8776
10	0.0242	19.9593
Promedio		18.9456

Tabla 37. Resultados experimentales obtenidos para el Néctar de manzana marca Del Valle por UV

# Jugo	A de UV a 244 nm	mg ascórbico/ 240 mL de néctar de manzana
1	1.5560	69.4398
2	1.4886	67.3312
3	1.4733	66.6256
4	1.5152	68.5580
5	1.5254	69.0285
6	1.7173	69.8791
7	1.7462	70.2123
8	1.7071	70.4090
9	1.7640	68.0333
10	1.7800	72.7716
Promedio		69.2289

Tabla 38. Resultados experimentales obtenidos para el Néctar de manzana marca Del Valle por UV con Segunda Derivada

# Jugo	A de UV con segunda derivada (SD) a 244 nm	mg ascórbico/240 mL de néctar de manzana
1	0.0239	38.9760
2	0.0237	38.5920
3	0.0237	38.5920
4	0.0238	38.7360
5	0.0235	38.2560
6	0.0242	39.3840
7	0.0245	38.2560
8	0.0245	38.2560
9	0.0237	38.5920
10	0.0241	39.2160
Promedio		38.6856

Con el promedio y la desviación estándar de los resultados obtenidos del contenido de ácido ascórbico para cada jugo por el método de UV y UV con segunda derivada se calculó el intervalo de confianza con una probabilidad del 99.99%.

El cálculo de desviación estándar y límite de confianza se muestran en la página 101 en el Apéndice A.

Tabla 39. Contenido de ácido ascórbico en 240 mL de jugo por los métodos UV y UV con segunda derivada

Nombre de jugo	mg de ácido ascórbico/240 mL de jugo por UV a 244 nm	mg de ácido ascórbico/240 mL de jugo por UV con SD a 244 nm
Uva	34.3428 ± 1.4309	18.4305 ± 0.1054
Manzana	32.5962 ± 1.1681	18.9456 ± 0.67331
Néctar de manzana	69.2289±2.7436	38.6856 ± 0.3564

Análisis estadístico de los datos obtenidos por las metodologías UV y UV con Segunda Derivada (SD)

Se comparó el contenido de ácido ascórbico cuantificado por el método UV y UV con segunda derivada (SD) para cada jugo y néctar analizados. Para realizar esta comparación se realizó el análisis estadístico de comparación de medias de dos muestras mediante una prueba t-Student.

Se realizó la comparación de desviaciones estándar mediante la prueba F para conocer los errores aleatorios de estos dos conjuntos de datos. Las pruebas de hipótesis y los cálculos de las pruebas t-Student y F de una cola se muestran en las páginas 102 y 104 en el Apéndice A.

Los resultados obtenidos para ambas pruebas se muestran en la tabla 40.

Tabla 40. Resumen de pruebas estadísticas. Estadísticas calculadas y teóricas para la prueba t-Student y prueba F.

Jugo/néctar	t calculada	t teórica con 18 grados de libertad	F calculada	F teórica con 10 grados de libertad
Uva	67.2084	2.5524	1.7683	5.351
Manzana	21.6298	2.5524	5.9802	5.351
Néctar de manzana	53.7072	2.5524	19.2796	5.351

De los resultados obtenidos de las pruebas estadísticas se tiene que las medias de los dos métodos probados son diferentes significativamente con una probabilidad del 99.99%. Con esta información también concluimos que la media del método UV es mayor que la media del método UV con segunda derivada por lo que el contenido de ácido ascórbico cuantificado por el método UV es mayor que el contenido de ácido ascórbico cuantificado con segunda derivada para los jugos de uva, manzana y néctar de manzana con un nivel de significancia de $\alpha = 0.01$.

Con los resultados de la prueba F concluimos que la precisión del método UV con segunda derivada propuesto es significativamente más grande que la del método UV con una nivel de significancia de $\alpha = 0.01$ para cada uno de los jugos y néctar analizados, por lo que se concluye que el método UV con segunda derivada es más preciso para el análisis que el método de UV.

Comparación del método AOAC con el método propuesto UV con segunda derivada (SD) para néctar de manzana

El método establecido por la AOAC (página 15, Capítulo 1. Fundamentos teóricos) presenta el problema de no poder aplicarse en muestras coloridas, por lo

que se decidió comparar el método propuesto con el oficialmente establecido por la AOAC sólo con los resultados obtenidos con el néctar de manzana.

El néctar de manzana se filtró a través de papel filtro Wathman #50 para eliminar la fruta suspendida, se tomaron 10 mL de jugo filtrado y se añadieron 10 mL de solución de extracción esta mezcla se tituló con solución de 2,6-diclorofenolindofenol previamente preparada y estandarizada con solución de ácido ascórbico. Este mismo néctar se analizó mediante la metodología UV con segunda derivada propuesta, los resultados obtenidos para la titulación y el método por segunda derivada se muestran en la tabla 41.

Tabla 41. Resultados obtenidos con Néctar de manzana con el método establecido por la AOAC y el método UV por segunda derivada propuesto.

# Jugo	mg ascórbico/240 mL de néctar de manzana por el método AOAC	mg ascórbico/240 mL de néctar de manzana por el método UV con Segunda Derivada (SD)
1	41.0786	38.9760
2	41.2448	38.5920
3	41.6216	38.5920
4	41.7008	38.7360
5	41.0768	38.2560
6	41.7776	39.3840
7	41.7008	38.2560
8	41.6216	38.2560
9	41.7008	38.5920
10	41.6216	39.2160
Promedio	41.5145	38.6856

Con el promedio y la desviación estándar de los resultados obtenidos del contenido de ácido ascórbico para cada jugo por el método de AOAC y UV con segunda derivada se calculó el límite de confianza con una probabilidad del 99.99%. Los resultados se muestran en la tabla 42.

Tabla 42. Contenido de ácido ascórbico en 240 mL de néctar por los métodos AOAC y con el método propuesto UV con segunda derivada

Nombre de jugo	Método AOAC mg de ácido ascórbico/240 mL de jugo	Método propuesto UV/SD mg de ácido ascórbico/240 mL de jugo
Néctar de manzana	41.5145 ± 0.2420	38.6856 ± 0.3564

Se realizó la comparación estadística de las medias del contenido de ácido ascórbico calculado por el método establecido por la AOAC mediante la titulación con 2,6-diclorofenolindofenol para la determinación de ácido ascórbico y por el método propuesto por UV con segunda derivada. También se realizó la comparación de la varianza de estos dos conjuntos de datos para comparar que método es más preciso.

Los resultados obtenidos de estas pruebas estadísticas se muestran en la tabla 43.

Tabla 43. Resumen de pruebas estadísticas. Estadísticas teóricas y calculadas para la prueba t-Student y prueba F para la comparación de los métodos AOAC y UV/SD.

Nombre del néctar	t calculada	t teórica con 18 grados de libertad	F calculada	F teórica con 9,9 grados de libertad
Néctar de manzana	13.0064	2.5524	0.1840	5.351

De los resultados obtenidos de las pruebas estadísticas se tiene que las medias de los dos métodos probados son diferentes significativamente con una probabilidad del 99.99%. Con esta información también concluimos que la media del método AOAC por titulación con 2,6-diclorofenolindofenol es mayor que la media del método UV con segunda derivada por lo que el contenido de ácido ascórbico cuantificado por el método AOAC es mayor que el contenido de ácido ascórbico

cuantificado con el método propuesto UV con segunda derivada para el néctar de manzana con un nivel de significancia de $\alpha = 0.01$.

Con los resultados de la prueba F concluimos que la precisión del método AOAC por titulación con 2,6-diclorofenolindofenol es significativamente más grande que la del método UV con segunda derivada con un nivel de significancia de $\alpha = 0.01$ para el néctar analizado, por lo que se concluye que el método UV con segunda derivada es menos preciso para el análisis de néctar de manzana que el método por titulación con 2,6-diclorofenolindofenol.

Comparación del contenido de ácido ascórbico obtenido por el método propuesto UV con Segunda Derivada y las Normas Oficiales Mexicanas

El contenido de ácido ascórbico cuantificado por el método propuesto para cada jugo y néctar se comparó con el límite máximo de ácido ascórbico permitido de acuerdo a las normas mexicanas para alimentos –frutas y derivados-: Jugo de uva NMX-F-044-1983, jugo de manzana NMX-F-045-1982 y néctar de manzana NMX-F-073-1980. Los resultados obtenidas se muestran en la tabla 44.

Tabla 44. Contenido de ácido ascórbico en jugos y límite máximo permitido en las norma Oficial Mexicana para jugos

Nombre del jugo	Límite máximo de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana	mg de ácido ascórbico/ Kg calculado por el método UV/VIS por segunda derivada
Uva	150 mg/kg	76.6235 ± 1.7120
Manzana	150 mg/kg	78.9864 ± 2.8452
Néctar de manzana	150 mg/kg	153.1831 ± 1.4116

Con los resultados obtenidos se demuestra que el contenido de ácido ascórbico calculado por el método espectrofotométrico por UV con segunda derivada

propuesto es mayor que el indicado en la etiqueta de cada jugo, pero este resultado se encuentra dentro del límite máximo de ácido ascórbico que puede estar presente en un jugo procesado de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana para cada jugo. Para el néctar de manzana el contenido de ácido ascórbico es mayor al límite máximo.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES:

- Se desarrolló un método por espectrofotometría UV con segunda derivada para la determinación de ácido ascórbico en jugos de fruta procesados.
- Se puede cuantificar el contenido de ácido ascórbico en cualquier jugo de fruta procesado sin que el color que poseen interfiera en el análisis.
- El método UV con segunda derivada es más preciso para el análisis de ácido ascórbico en jugos de fruta procesados que el método de UV.
- El método AOAC por titulación con 2,6-diclorofenolindofenol es más preciso que el método propuesto UV con segunda derivada para el análisis de néctar de manzana.
- El método UV con segunda derivada es más exacto que el método AOAC por titulación con 2,6-diclorofenolindofenol.
- El método AOAC utiliza una cantidad de reactivos menor que el método desarrollado: para el método AOAC titulación se utiliza el indicador 2,6-diclorofenolindofenol y ácidos tricloroacético, acético y sulfúrico. Para el método por UV con segunda derivada para determinar el contenido de ácido ascórbico utiliza cartuchos de extracción, nitrógeno y ácido sulfúrico.
- La inestabilidad del ácido ascórbico en agua se debe al pH de la solución y a la presencia de oxígeno.
- Las condiciones para estabilizar la absorbancia del ácido ascórbico estándar en solución son: prepararlo en ácido sulfúrico concentrado o un medio fuertemente ácido y ausencia de oxígeno, el tiempo de análisis es de 10 minutos manteniendo la misma absorbancia y de 1.5 horas manteniéndolo estable para evitar su degradación.

- El contenido de ácido ascórbico cuantificado en los jugos analizados con el método por espectrofotometría UV con Segunda Derivada es mayor que el reportado en la etiqueta. Para los jugos de uva y manzana el contenido reportado es de 8.4 mg/240 mL y el cuantificado por UV (SD) para el jugo de uva es 18.4305 mg/240 mL y para el jugo de manzana es 18.9456 mg/240 mL de jugo. Para el néctar de manzana el contenido reportado en la etiqueta es de 29.4 mg/240 mL y el calculado por el método desarrollado es de 38.6856 mg/240 mL de néctar.
- Las interferencias del color del jugo son eliminadas por un cartucho de C18, otro tipo de interferencias como pueden ser los aditivos adicionados a estos productos no son eliminados por este cartucho y pueden producir interferencias en la absorción como en el caso de los néctares.
- Los parámetros de cuantificación del método desarrollado son:
 - $r = 0.9999$
 - $A = 1.8838 \pm 0.001347$
 - $B = 1.5119 \pm 0.0217$
 - Límite de detección (LDD): 5.2155×10^{-4} mg/mL
 - Límite de cuantificación (LDC): 1.7385×10^{-3} mg/mL
- Las concentraciones de ácido ascórbico que se pueden cuantificar en un jugo de fruta de forma cuantitativa es de acuerdo al Límite de cuantificación (LDC) 1.7385×10^{-3} mg/mL de acuerdo a los parámetros establecidos para el método desarrollado.

APÉNDICE A
DEFINICIONES Y PRUEBAS ESTADÍSTICAS

DEFINICIONES:

Análisis de varianza: el análisis de varianza es una técnica estadística que se utiliza para separar y estimar las diferentes causas de variación.

En un diseño experimental en bloques aleatorizados completos el modelo lineal supuesto es:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta_j + \varepsilon_{ij}, \quad i=1, \dots, t; \quad j=1, \dots, b.$$

Análisis de varianza para el diseño de bloques aleatorizados completos

Pruebas de hipótesis:

$$H_0: \tau_1 = \tau_2 = \tau_3 = \tau_4 = \tau_5 = \tau_6 = \tau_7 = \tau_8 = \tau_9$$

Ha: al menos un tratamiento es diferente.

Tabla 1. Tabla de cálculo de Análisis de Varianza

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Fo
Tratamientos	t-1	$\sum_{i=1}^t \frac{Y_i^2}{b} - \frac{Y_{..}^2}{bt}$	$\frac{\text{S.C. Trat.}}{t-1}$	$\frac{\text{C.M. Trat.}}{\text{C.M. Error}}$
Bloques	b-1	$\sum_{j=1}^b \frac{Y_j^2}{t} - \frac{Y_{..}^2}{bt}$		
Error	(t-1)(b-1)	$\sum_{i=1}^t \sum_{j=1}^b Y_{ij}^2 - \frac{1}{b} \sum_{i=1}^t \frac{Y_i^2}{b} - \sum_{j=1}^b \frac{Y_j^2}{t} + \frac{Y_{..}^2}{bt}$	S.C. Error (t-1)(b-1)	
Total	bt-1	$\sum_{i=1}^t \sum_{j=1}^b Y_{ij}^2 - \frac{Y_{..}^2}{bt}$		

Errores aleatorios: son los errores que provocan que los resultados individuales caigan a ambos lados del valor medio, los errores aleatorios afectan la precisión o reproducibilidad de un experimento.

Errores sistemáticos: los cuales provocan que todos los resultados sean erróneos en el mismo sentido. Los errores sistemáticos afectan la exactitud, es decir, la proximidad al valor verdadero.

Intervalo de confianza: es el intervalo dentro del cual podemos suponer con una cierta probabilidad que se encuentra el valor verdadero de nuestro resultado experimental.

Grados de libertad: es el número de desviaciones estándar independientes.

Límite de confianza: son los valores extremos del intervalo de confianza.

Para calcularlo se necesita conocer la media de la población de datos, la desviación estándar y el valor adecuado de t que depende de (n-1), que se conoce como grados de libertad.

$$\mu = \bar{X} \pm t(s/\sqrt{n})$$

Límite de cuantificación: es la concentración o límite más bajo para realizar mediciones cuantitativamente precisas, en oposición a la detección cualitativa.

$$y = y_B + 10s_B$$

Límite de detección de un analito: es la de concentración de analito que proporciona una señal igual a la señal del blanco o "señal de fondo".

$$y - y_B = 3s_B.$$

Prueba de dos colas: se utiliza para comprobar si dos métodos A y B difieren en su precisión.

Prueba de una cola: se utiliza para probar si el método A es más preciso que el método B.

Prueba F: considera la razón de dos varianzas muestrales (la razón de los cuadrados de la desviación estándar). El estadístico de prueba es:

$$F = S_X^2 / S_Y^2$$

Los valores de F teórica están registrados en tablas de acuerdo a la probabilidad o al nivel de significancia al que se trabaja, se busca de acuerdo al grado del libertad que hay en el numerador y en el denominador.

$$F_{n-1}^{m-1}$$

Prueba t: considera la comparación de la media de dos poblaciones.

- 1) Planteamos un juego de hipótesis de acuerdo a lo que se quiere comprobar estadísticamente, dependiendo si es una prueba de dos colas o de una.
- 2) Se calculan las estadísticas siguientes: media, desviación estándar y varianza.
- 3) Se obtiene el estimador ponderado de la varianza común a ambas poblaciones.

$$S_p^2 = \frac{(n-1)S_X^2 + (m-1)S_Y^2}{n+m-2}$$

donde n y m es el número de repeticiones del experimento de cada población.

- 4) Se calcula la estadística de prueba t experimental, se utiliza el estadístico:

$$t_0 = \frac{\bar{X} - \bar{Y}}{\sqrt{\frac{S_p^2}{n} + \frac{S_p^2}{m}}} \sim t(n+m-2)$$

- 5) Se busca la t teórica de acuerdo a t(m+n-2).
- 6) De acuerdo a la regla de decisión se rechaza o se acepta la hipótesis planteada.

Pruebas de significación comparando desviación estándar: se utiliza para determinar los errores aleatorios de dos conjuntos de datos.

Pruebas de significación de comparación de medias: se utilizan para detectar errores sistemáticos.

Repetitividad: es la precisión dentro de un conjunto de datos.

Reproducibilidad: La precisión entre diferentes conjuntos de datos es la reproducibilidad.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

Límite de confianza:

Se muestra el cálculo realizado con los resultados del contenido de ácido ascórbico en disoluciones estándar de ácido ascórbico para comprobar el método.

Pág. 69, Capítulo 3. Comprobación del método.

Tabla 2.- Resultados de la solución estándar de ácido ascórbico 4×10^{-3} mg/mL en H_2SO_4 0.1 M a 244 nm por UV

Número de repetición	A de UV a 244 nm	Concentración mg/mL de ácido ascórbico
1	0.2439	4.1341×10^{-3}
2	0.2428	4.1130×10^{-3}
3	0.2432	4.1207×10^{-3}
4	0.2400	4.0600×10^{-3}
5	0.2400	4.0600×10^{-3}
6	0.2437	4.1303×10^{-3}
7	0.2419	4.0960×10^{-3}
8	0.2440	4.1360×10^{-3}
9	0.2435	4.1264×10^{-3}
10	0.2439	4.1341×10^{-3}
Promedio		4.1211×10^{-3}
Desviación estándar (S)		3.9175×10^{-5}

El promedio y la desviación estándar se calcularon en Excel.

Para calcular el límite de confianza al 99.99% se necesitan las estadísticas:

Promedio: 4.1211×10^{-3} ,

Desviación estándar (S): 3.9175×10^{-5} y el

Valor de t teórica con 9 grados de libertad con una $\alpha=0.01$: 2.8214¹

La t teórica se busca de acuerdo a n-1 grados de libertad y con el nivel de significancia o probabilidad elegida.

Calculamos el límite de confianza:

$$\mu = \bar{X} \pm t(s/\sqrt{n})$$

$$\mu = 4.1211 \times 10^{-3} \pm 2.8214 (3.9175 \times 10^{-5} / \sqrt{10})$$

$$\mu = 4.1211 \times 10^{-3} \pm 3.4952 \times 10^{-5}$$

Prueba t:

Para hacer más representativa la explicación se como se realizó la prueba t se muestran los cálculos realizados para el contenido de ácido ascórbico en el jugo de uva con los resultados de las páginas 85 y 86 del Capítulo 4, Aplicación del Método.

Tabla 3. Concentración de ácido ascórbico en el Jugo de uva calculado por el espectro UV y por segunda derivada

# Jugo	Espectrofotometría UV mg ascórbico/ 240 mL de jugo	Espectrofotometría UV/SD mg ascórbico/240 mL de jugo
1	35.0000	17.8338
2	34.4819	18.2425
3	35.1346	19.0600
4	35.1945	19.3053
5	35.2453	18.4060
6	33.8155	17.9155
7	33.7417	18.6513
8	35.5036	18.2425
9	35.1899	18.2425
10	32.1207	18.4060

¹ Infante G. S., *Métodos estadísticos, Un enfoque interdisciplinario*. Pág. 619.

Promedio	34.3428	18.4305
Desviación estándar (S)	1.6038	0.4641
Varianza (S ²)	0.25721	0.2154

La hipótesis que se quiere comprobar es que las medias de estos dos métodos dan resultados cuyas medias difieren significativamente. Por lo que la hipótesis nula adoptada es que la media de los resultados proporcionada por ambos métodos es la misma.

$$H_0: \mu_X = \mu_Y \text{ en oposición a } H_a: \mu_X \neq \mu_Y$$

las estadísticas necesarias son:

$$\bar{X}_{UV} = 34.3428, \quad \bar{Y}_{SD} = 18.4305$$

$$S_X^2 = 2.5721 \quad S_Y^2 = 0.2154$$

Estimador ponderado de la varianza:

$$S_p^2 = \frac{(n-1)S_X^2 + (m-1)S_Y^2}{n+m-2}$$

Estimador ponderado de la varianza es : $(9)(2.5721) + (9)(0.2154) / 18 = 1.3938$

Enseguida se calcula t_0

$$t_0 = \frac{\bar{X} - \bar{Y}}{\sqrt{\frac{S_p^2}{n} + \frac{S_p^2}{m}}} \sim t(n+m-2)$$

$$t_0 = \frac{(34.3428 - 18.4305)}{\sqrt{\frac{1.3938}{10} + \frac{1.3938}{10}}} = 29.6098$$

Elegimos un nivel de significancia $\alpha = 0.01$ con 18 grados de libertad, la t teórica es $t_{0.001,18}$ es 2.5524², por lo que la regla de decisión es rechazar H_0 si $t_0 > 2.5524$ o $t_0 < -2.5524$. Puesto que $t_0 = 67.2084$ la conclusión es que se rechaza H_0 con $\alpha = 0.01$. En realidad el valor de t_0 es tan extremo que se rechaza H_0 con cualquier α razonablemente grande. La conclusión es que la media de los dos métodos analíticos son diferentes con una probabilidad del 99.99%.

Puesto que $\bar{X} > \bar{Y}$, hay suficiente información estadística por lo que también concluimos que $\mu_X > \mu_Y$.

Pruebas F:

PRUEBA DE UNA COLA

Prueba F para determinar que método UV o UV con segunda derivada es más preciso en el análisis de jugo de uva.

La hipótesis que se quiere comprobar: Es la precisión del método propuesto por UV con segunda derivada significativamente mayor que la del método por UV.

En este caso se quiere saber que método es más preciso por lo que se realiza una prueba F de una sola cola

La prueba F está dada por la razón de las varianzas, es decir, el cociente del cuadrado de las desviaciones estándar de los resultados de cada método:

$$S_X^2 = 2.5721 \quad S_Y^2 = 0.2154$$

$$F_0 = S_X^2 / S_Y^2$$

$$F_0 = 2.5721 / 0.2154 = 11.9410$$

² Infante G. S., Op. Cit. Pág. 619.

De las tablas para la prueba F se busca el valor de F con 9 grados de libertad en el numerador y 9 grados de libertad en el denominador con una probabilidad de 99.99%, la F teórica es de $F_{9,9}(\alpha=0.01)=5.352^3$. Ya que el valor F_0 calculado lo excede la varianza del método UV es mayor que la del método UV con segunda derivada con un nivel de significancia de $\alpha=0.01$.

Por lo que concluimos que el método propuesto UV por segunda derivada es más preciso.

PRUEBA F DE DOS COLAS

Prueba F para determinar si los métodos UV y UV con segunda derivada tienen la misma precisión al trabajar con soluciones estándar

Para comprobar que los métodos UV y UV con segunda derivada tienen la misma precisión al trabajar con solución estándar de ácido ascórbico se realizó una prueba F de dos colas, ya que en este caso no tenemos ninguna razón para esperar que la varianza del método UV y UV con segunda derivada deba ser mayor que la del otro al trabajar con soluciones estándar de ácido ascórbico

La hipótesis que se plantea es que la varianza de los dos métodos no difieren significativamente, por lo que es necesario probar que:

$$H_0: \frac{\sigma_x^2}{\sigma_y^2} = 1 \text{ en oposición a } H_a: \frac{\sigma_x^2}{\sigma_y^2} \neq 1$$

Las estadísticas necesarias son:

$$S_x^2 = 1.5347 \times 10^{-9}$$

$$S_y^2 = 5.4308 \times 10^{-9}$$

$$F_0 = S_x^2 / S_y^2$$

³ Infante G. S., Op. Cit., Pág. 626

$$F_0 = 1.5347 \times 10^{-9} / 5.4308 \times 10^{-9} = 0.2874$$

De las tablas para la prueba F con 9 grados de libertad den el numerador y 9 grados de libertad en el denominador con una probabilidad de 99.99% la F teórica es de 5.352⁴.

Como la prueba F realizada es de dos colas los valores críticos de F 9,9 ($\alpha = 0.01$) son: 5.352 y 0.1869.

$$F_{9,9} (\alpha = 0.01) = 5.352 \text{ y}$$

$$F_{9,9} (\alpha = 0.01) = 1 / F_{9,9} (\alpha = 0.01) = 1 / 5.351 = 0.018$$

La regla de decisión consiste en rechazar H_0 si $F_0 \geq 5.351$ o si $F_0 \leq 0.01869$, puesto que el valor de $F_0 = 0.1788$, la conclusión es que con una $\alpha = 0.01$

No hay razón para rechazar la hipótesis H_0 . Por lo excede las varianzas de ambos métodos son iguales.

Por lo que método UV tiene la misma precisión que el método UV con segunda derivada con un nivel de significancia de $\alpha = 0.01$.

Intervalo de confianza (Desviaciones estándar) de la ordenada al origen y de la pendiente –Límite de cuantificación y Límite de detección-.

Para calcular el límite de detección de un compuesto a partir de la curva patrón elaborada se necesitan conocer primero la ordenada en el origen y la pendiente de la curva de regresión, los intervalos de confianza de la ordenada al origen (A) y pendiente (B) así como el estadístico $S_{y/x}$. De los valores de

⁴ Infante G. S., Op. Cit., Pág. 626

concentración (xi) y absorbancia (yi) obtenidos se utilizan para completar la siguiente tabla y calcular las estadísticas requeridas⁵.

Tabla 4. Cálculo de estadísticos necesarios para establecer el intervalo de confianza de la pendiente y ordenada en el origen

xi	$x_i - \bar{x}_i$	$(x_i - \bar{x}_i)^2$	x_i^2	yi	\hat{y}_i	$ y_i - \hat{y}_i $	$(y_i - \hat{y}_i)^2$
8×10^{-4}	-0.01548	2.39×10^{-4}	6.4×10^{-7}	0.0018	0.0012	5.67×10^{-4}	3.33×10^{-7}
2×10^{-3}	-0.01424	2.03×10^{-4}	4×10^{-6}	0.0028	0.0030	2.14×10^{-4}	4.58×10^{-8}
6×10^{-3}	-0.01082	1.05×10^{-5}	3.6×10^{-5}	0.0091	0.0089	2×10^{-4}	4×10^{-8}
0.010	-6.28×10^{-3}	3.94×10^{-5}	1×10^{-4}	0.0145	0.0148	3×10^{-4}	9×10^{-8}
0.014	-2.28×10^{-3}	5.19×10^{-6}	1.96×10^{-4}	0.0205	0.0208	3×10^{-4}	9×10^{-8}
0.018	1.72×10^{-3}	2.95×10^{-6}	3.24×10^{-4}	0.0268	0.0267	1×10^{-4}	1×10^{-8}
0.022	5.72×10^{-3}	3.27×10^{-5}	4.84×10^{-4}	0.0325	0.0326	1×10^{-4}	1×10^{-8}
0.026	9.72×10^{-3}	9.44×10^{-5}	6.76×10^{-4}	0.0389	0.0386	2.8×10^{-4}	7.8×10^{-8}
0.030	0.01372	1.88×10^{-4}	9×10^{-4}	0.0442	0.0445	3.5×10^{-4}	1.23×10^{-7}
0.034	0.01772	3.13×10^{-4}	1.15×10^{-3}	0.0509	0.0504	5×10^{-4}	2.7×10^{-7}

De los resultados anteriores tenemos:

$$\bar{x}_i = 0.01628$$

$$\Sigma (x_i - \bar{x}_i)^2 = 1.2273 \times 10^{-3}$$

$$\Sigma x_i^2 = 3.8767 \times 10^{-3}$$

$$\Sigma (y_i - \hat{y}_i)^2 = 1.0581 \times 10^{-6}$$

Intervalo de confianza de la ordenada al origen y de la pendiente

Para calcular los intervalos de confianza de la ordenada al origen y de la pendiente tenemos que calcular el dato estadístico $S_{y/x}$ que esta dado por:

⁵ Miller J. C., Miller J. N., *Estadística para Química Analítica*. Pág. 96-98.

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}}$$

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}} = \sqrt{\frac{1.0581 \times 10^{-3}}{8}} = 3.6369 \times 10^{-4}$$

Después de calcular el valor de $S_{y/x}$ podemos calcular S_b y S_a , las desviaciones estándar de la pendiente (b) y de la ordenada al origen (a). Los valores de S_b y S_a se pueden utilizar para estimar límites de confianza para la pendiente y la ordenada en el origen, los límites de confianza en la pendiente son $b \pm tS_b$ donde el valor de t se obtiene para un nivel de confianza deseado y $(n-2)$ grados de libertad. Los límites de confianza para la ordenada en el origen están dados por $a \pm tS_a$.

El valor de t con un 99.99% probabilidad y 8 grados de libertad es de 2.8965.

Intervalo de confianza de la ordenada al origen:

$$S_a = \sqrt{\frac{S_{y/x}}{\frac{\sum x^2}{n_x \sum (x_i - \bar{x}_i)^2}}} \times t_{n-2}$$

$$S_a = \sqrt{\frac{S_{y/x}}{\frac{\sum x^2}{n_x \sum (x_i - \bar{x}_i)^2}}} \times t_{n-2} = \sqrt{\frac{3.6369 \times 10^{-4}}{\frac{3.8767 \times 10^{-3}}{10 \times (1.2273 \times 10^{-3})}}} \times 2.8965 = 1.8744 \times 10^{-3}$$

$$a = 4.6904 \times 10^{-5} \pm 1.8744 \times 10^{-3}$$

Intervalo de confianza de la pendiente:

$$S_b = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x}_i)^2}} \times t_{n-2}$$

$$S_b = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x}_i)^2}} \times t_{n-2} = \frac{3.6369 \times 10^{-4}}{\sqrt{1.2273 \times 10^{-3}}} \times 2.8965 = 0.03007$$

$$b = 1.4836 \pm 0.03007$$

Límite de cuantificación de una muestra a partir de la recta de regresión de una curva patrón:

Para calcular el límite de cuantificación o límite más bajo para determinaciones cuantitativas se utiliza la ecuación $y = y_B + 10S_B$ donde los valores de $y_B (=A)$ y $S_B (=S_{y/x})$ calculados previamente para determinar el intervalo de confianza de la ordenada al origen y la pendiente. El valor de y para el límite de detección está dado por:

$$y = y_B + 10S_B \quad \text{donde: } S_B = S_{y/x} \quad y \quad y_B = A$$

$$y = 4.6904 \times 10^{-5} + (10 \times 3.6369 \times 10^{-4}) = 3.6838 \times 10^{-3}$$

El resultado de y obtenido es el valor de absorbancia, esta absorbancia se interpola a la curva patrón y se obtiene la concentración correspondiente a la absorbancia calculada, el límite de Cuantificación (L.D.C.) es de 2.4514×10^{-3} mg/mL de ácido ascórbico.

Límite de detección de una muestra a partir de la recta de regresión de una curva patrón:

Se utiliza la ecuación $y - y_B = 3S_B$ con los valores de $y_B (=A)$ y $S_B (=S_{y/x})$ calculados previamente. El valor de y para el límite de detección está dado por

$$y = y_B + 3S_B \quad \text{donde: } S_B = S_{y/x} \quad y \quad y_B = A$$

$$y = 4.6904 \times 10^{-5} + (3 \times 3.6369 \times 10^{-4}) = 1.1379 \times 10^{-3}$$

el resultado de y obtenido es el valor de absorbancia, esta absorbancia se interpola a la curva patrón y se obtiene la concentración correspondiente a la absorbancia calculada, el límite de detección (L.D.) es de 7.3536×10^{-4} mg/mL de ácido ascórbico.

Análisis de varianza (ANOVA) de los resultados de absorbancias obtenidos en las nueve curvas patrón de ácido ascórbico preparadas:

Para probar que no existe diferencia entre los resultados de absorbancias obtenidos al registrar los espectros de absorción de cada una de las disoluciones de ácido ascórbico estándar se realizó un análisis de varianza para comprobar que todos los resultados son iguales.

Se planteó la hipótesis: $H_0: \tau_1 = \tau_2 = \tau_3 = \tau_4 = \tau_5 = \tau_6 = \tau_7 = \tau_8 = \tau_9$ en oposición a H_a : al menos los resultados de una curva patrón es diferente.

En la tabla 4 se presentan los resultados y cálculos parciales necesarios para obtener la S.C.

Tabla 5. Resultados obtenidos de las curvas patrón de ácido ascórbico realizadas para calcular los estadísticos del Análisis de Varianza

Concentración mg/mL de ácido ascórbico	Curva patrón 1	Curva patrón 2	Curva patrón 3	Curva patrón 4	Curva patrón 5	Curva patrón 6	Curva patrón 7	Curva patrón 8	Curva patrón 9	Y _i	\bar{Y}_i	Y _i ²
8×10^{-4}	0.0018	0.0019	0.0017	0.0018	0.0016	0.0018	0.0020	0.0021	0.0019	0.0166	1.8×10^{-3}	2.7×10^{-4}
2×10^{-3}	0.0028	0.0029	0.0030	0.0029	0.0027	0.0031	0.0032	0.0031	0.0032	0.0269	2.9×10^{-3}	7.2×10^{-4}
6×10^{-3}	0.0091	0.0093	0.0094	0.0092	0.0089	0.0094	0.0098	0.0099	0.0094	0.844	9.4×10^{-3}	7.1×10^{-6}
0.010	0.0145	0.0147	0.0150	0.0151	0.0143	0.0153	0.0155	0.0160	0.0154	0.1358	0.01508	0.01844
0.014	0.0205	0.0211	0.0214	0.0213	0.0204	0.0217	0.0220	0.0226	0.0216	0.1926	0.0214	0.03709
0.018	0.0268	0.0267	0.0275	0.0274	0.0265	0.0273	0.0277	0.0283	0.0276	0.2458	0.02731	0.06041
0.022	0.0325	0.0324	0.0336	0.0338	0.0319	0.0337	0.0334	0.0345	0.0319	0.2782	0.03313	0.08892
0.026	0.0389	0.0390	0.0393	0.0399	0.0392	0.0398	0.0400	0.0401	0.0389	0.3551	0.03946	0.12609
0.030	0.0442	0.0452	0.0461	0.0463	0.0447	0.0464	0.0468	0.0466	0.0453	0.4116	0.4573	0.16941
0.034	0.0509	0.0510	0.0524	0.0519	0.0512	0.0521	0.0524	0.0524	0.0519	0.4662	0.0519	0.21734
Y _{.j}	0.2420	0.2442	0.2494	0.2496	0.2414	0.2506	0.2528	0.2556	0.02471	2.233		0.60522
\bar{Y}_j	0.0242	0.02442	0.02494	0.02496	0.02414	0.02506	0.02528	0.02556	0.02471			
Y _{.j} ²	0.05856	0.05963	0.06220	0.06230	0.05827	0.06280	0.0639	0.6533	0.6105	0.05540		
Y _{ij} ²	8.5×10^{-3}	8.7×10^{-3}	9.1×10^{-3}	9.1×10^{-3}	8.6×10^{-3}	9.1×10^{-3}	9.3×10^{-3}	9.4×10^{-3}	8.9×10^{-3}	$\sum_{i=1}^t \sum_{j=1}^b Y_{ij}^2$		0.08065

Con estos datos calculamos:

$$F.C. = (2.233)^2 / (10 \times 9) = 0.05540$$

$$S.C. \text{ Total} = (0.0018)^2 + \dots + (0.0519)^2 - F.C. = 0.02528$$

$$S.C. \text{ Tratamiento} = (0.0166)^2 + \dots + (0.4662)^2 / 9 = 0.06725$$

$$S.C. \text{ Bloques} = (0.2420)^2 + \dots + (0.2471)^2 / 10 = 0.05540$$

$$S.C. \text{ Error} = S.C. \text{ Total} - S.C. \text{ Tratamiento} - S.C. \text{ Bloques}$$

$$S.C. \text{ Error} = 0.02528 - 0.06724 - 0.05540 = -0.09736$$

En seguida se presenta la tabla de análisis de varianza

Tabla 6. Resumen de resultados del Análisis de Varianza realizado a los resultados de absorbancia de las curvas patrón

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F0	F teórica con 9,70 grados de libertad
Tratamientos	9	0.06725	7.4722×10^{-3}	-0.5.5259	2.672
Bloques	8	0.05540	-1.3522×10^{-3}		
Error	72	-0.09736			
Total	89	0.02528			

Para probar que $H_0: \tau_1 = \tau_2 = \tau_3 = \tau_4 = \tau_5 = \tau_6 = \tau_7 = \tau_8 = \tau_9$ en oposición H_a : al menos los resultados de absorbancia de una curva patrón es diferente con $\alpha = 0.01$, comparamos la $F_0 = -5.5259$ calculada con $F_{9,70}$ ⁶, se tomo el valor de 70 ya que era el más cercano al grado de libertad de trabajo. Puesto que $F_0 = -5.5259 < 2.672$ F teórica, la conclusión es que con un nivel de significancia de 0.01 todas las curvas patrón tienen los mismos valores de absorbancia, es decir, no existe diferencia significativa entre los valores de absorbancia registrados para cada curva patrón.

Por lo que también podemos concluir que para el método propuesto los resultados son repetibles y no existe fuente de variación significativa entre ellos.

⁶ Infante G. S., Op. Cit., Pág. 626.

BIBLIOGRAFÍA:

1. Abdelmageed O. H., *Spectrophotometric determination of ascorbic acid in drugs and foods*. *Talanta* 42 (4): 573-579, 1995.
2. Backheet E. Y., *Selective Spectrophotometric method for the determination of ascorbic acid in pharmaceutical preparations and fresh fruit juices*. *Analyst* 166: 861-865, 1991.
3. Baker W., *Sensitive ascorbic acid assay for the analysis of pharmaceutical products and fruit juices*. *Analyst* 110: 1189-1191, 1985.
4. Belitz, H. D., Grosch, W., *Química de alimentos*. Acribia, 2^a edic., España. Págs. 444-447, 1997.
5. Blevins D.D, Burke M.F., Good T.J., *Sorbent Extraction Technology Handbook*, Varian, 2^{sd} ed., Págs. 1-104, 1993.
6. Bosh O. C., Sánchez R. F., *Derivative ultraviolet/visible region absorption spectrophotometry and its analytical applications*. *Talanta* 35(10): 753-761, 1988.
7. Bosh O. C., Sánchez R. F., *Review Recent developments in derivative ultraviolet/visible absorption spectrophotometry*. *Talanta* 42: 1195- 1214, 1995.
8. Budabari S., O'Neil M., Smith A., Heckelman P.E. (eds.): *The Merck Index*, Merck & Co., 11th ed., U.S.A. Pág. 130, 1989.
9. Chang R., *Química*, Mc Graw Hill, 4^a edic., México. Págs. 259-280, 419-425, 1992.
10. Crawford T. C., *Synthesis of L-Ascorbic Acid*. *Chem. Biochem.* (37):79-105, 1980.

11. Cunniff P., *Official Methods of Analysis of AOAC International*, AOAC International, 16th ed., U.S.A., Chapter 45, Págs. 16-18, 1995.
12. Davies M.B., Austin J., Partridge D.A., *Vitamin C Its chemistry and biochemistry*. The Royal Society of Chemistry. 1st ed., U.K. Págs. 66-97, 126-133, 1991.
13. Elvers B., Hawkins S., *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, VCH, 15th ed., Germany, Volume A 27. Págs. 547-559, 1996.
14. Fennema O., *Química de alimentos*, Acribia, 1^a edic., España. Págs. 550-557, 1993.
15. Gennaro A., *Remington Farmacia*, Médica-Panamericana, 19^a edic., España. Págs. 1384-1385, 1995.
16. Hager R., *Derivative Spectroscopy with Emphasis on Trace Gas Analysis*. Analytical Chemistry 45(13): 1973 A-1138 A, 1973.
17. Infante G.S., *Métodos estadísticos -Un enfoque interdisciplinario*, Trillas, 2^a edic., México, Págs. 401-413, 619, 620. 1994.
18. Kirk R., *Composición y análisis de los alimentos de Pearson*, Compañía editorial Continental, 2^a edic., México. Págs. 218-222, 267-269, 285-291, 759-760, 1996.
19. Lambert J. B., Shurvell H. F., *Organic Structural Analysis*, Mc Millan Publishing Co., U.S.A. Págs. 317-325., 1996.
20. Lloyd L. E., *Fundamentos de Nutrición*, Acribia, 1^a edic., España, Págs. 205-211, 1982.
21. *Manual Thermo Spectronic Unicam UV Series Instalation and Maintenance*. Chapter 9 Getting the best.

22. Mc William I. G., *Derivative Spectroscopy and its Application to the Analysis of Unresolved Bands*. Analytical Chemistry, 41(4): 674-676, 1969.
23. Miller J. C., Miller J. N., *Estadística para Química Analítica*, 2^a edic., Addison-Wesley Iberoamericana, U.S.A. Págs. 42-55, 87-93, 96-98, 1993.
24. Morris Z., Ruthann K., *Solid phase extraction for sample preparation*. J.T. Baker Inc. Págs. 1-55. 1994.
25. Muralikrishna U., *Spectrophotometric determination of ascorbic acid in pharmaceutical preparations and fruit juices*. Analyst 114: 407-408, 1989.
26. Norma Oficial Mexicana NMX-F-045-1982. *Alimentos - frutas y derivados – Jugo de manzana*.
27. Norma Oficial Mexicana NMX-F-073-S-1980. *Néctar de manzana*.
28. Norma Oficial Mexicana NMX-F-44-1983. *Alimentos - frutas y derivados – Jugo de uva*.
29. O'Haver T.C., *Derivative and Wavelength Modulation Spectrometry*. Analytical Chemistry, 51(1): 91 A-100 A, 1979.
30. Ottaway B., *The technology of vitamins in food*. Blackie Academic and Professional. 1st ed., England. Pág. 260. 1993.
31. Pandey N. K., *Spectrophotometric and titrimetric determinations of ascorbic acid*. Analytical Chem. 54: 793-796, 1982.
32. Pavia D. L., Lampman G.M., Kriz S.G., *Introduction to Spectroscopy : A guide for students of Organic Chemistry*, Saunders College Publishing. U.S.A. Págs. 183-196, 1979.
33. Robinson D., *Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos*, Acribia, 1^a edic., España. Págs. 352-359, 1991.

34. Silverstein R. M., Clayton B. C., *Spectrometric identification of organic compounds*, John Wiley & Sons, 5th ed., U.S.A. Págs. 289-315, 1991.
35. Skoog D. A., Holler F. J., Nieman T. A., *Principios de análisis instrumental*, McGraw Hill, 5^a edic., España. Págs. 324-347, 353-376, 2001.
36. Srividya K., *Indirect spectrophotometric determination of ascorbic acid in pharmaceutical samples and fruit juices*. *Analyst* 121: 1653-1655, 1996.
37. Tolonen M., *Vitaminas y minerales en la salud y la nutrición*, Acribia, 1^a edic., España. Págs. 150-155, 1995.
38. Üstün O., *Third order derivative spectrophotometric determination of ascorbic acid in fruits and vegetables*. *Talanta* 42: 1631-1640. 1995.
39. Willard H., *Métodos instrumentales de análisis*, Compañía Editorial Continental, 3^a edic., México. Págs. 161- 176, 1990.
40. Wong D. *Química de los alimentos: Mecanismos y teoría*. Acribia,. España. Págs. 403-411. 1995.