



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO PARA LA  
DETERMINACIÓN DE ÁCIDO  
ASCÓRBICO EN JUGOS PROCESADOS  
UTILIZANDO ESPECTROFOTOMETRÍA  
UV CON SEGUNDA DERIVADA Y SU  
COMPARACIÓN CON EL MÉTODO  
OFICIAL (AOAC)

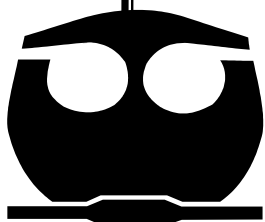
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A:

SUSANA VELASCO LOZANO



MÉXICO, D.F.

2006



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.

## **Jurado asignado**

<b>Presidente</b>	Profa. Ernestina Cervera Flores
<b>Vocal</b>	Prof. Adolfo García Osuna
<b>Secretario</b>	Profa. Lucía Cornejo Barrera
<b>1<sup>er</sup> Suplente</b>	Profa. Georgina Artemisa Duarte Lisci
<b>2<sup>do</sup> Suplente</b>	Profa. Rosa María Argote Espinosa

### **Sitio en el que se desarrolló el tema:**

Departamento de Química Analítica  
Edificio "A" Laboratorio 3A y 3B  
Facultad de Química Cd. Universitaria

### **Asesor del tema**

---

Q. Ernestina Cervera Flores

### **Supervisor técnico**

---

Q.F.B. Silvia Mendoza Arellano

### **Sustentante**

---

Susana Velasco Lozano

*A mi padre:*

Por creer en mi, por su apoyo y el cariño tan grande que siempre me ha dado

*A mi madre:*

Por brindarme la fuerza que me motiva para seguir adelante, su apoyo y cariño incondicional

*A mi hermana:*

Por sus regaños y consejos que aunque no crea siempre tomo en cuenta, te quiero mucho Dani

*A María Elena López*

Por su amistad y apoyo incondicional

*A toda mi familia:*

Por creer en mi y apoyarme siempre

*A mi directora de tesis Ernestina Cervera Flores:*

Por el apoyo y confianza incondicionales, así como los conocimientos que me dio y sigue dando

*A mi asesora técnica Silvia Mendoza Arellano:*

Por su apoyo incondicional y la constante capacitación para aprender el uso de la instrumentación

*Al profesor Adolfo García Ozuna:*

Por todas las asesorías, cursos y el gran apoyo académico que me proporcionó

*A todas mis amigas y amigos*

Por su apoyo y amistad incondicional

“Daría todo lo que sé,  
por la mitad de lo que ignoro”

*RENÉ DESCARTES*

## ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b>	2
<b>OBJETIVOS</b>	3
<b>ANTECEDENTES</b>	
Vitamina C	5
Propiedades físicas y químicas	5
Estabilidad	6
Funciones, requerimientos y metabolismo	7
Escorbuto	7
Jugos de fruta procesados	8
Néctares de fruta	8
Método Oficial AOAC para la determinación de ácido ascórbico en preparados vitamínicos y jugos de frutas	9
Pectinas	10
Espectroscopia UV-VIS	11
Espectroscopia UV-VIS con segunda derivada	13
Componentes y funcionamiento de un espectrofotómetro de UV	14
Ley de Lambert-Beer	16
Extracción en fase sólida y cartuchos de extracción	19
Validación de métodos	21
Linealidad del sistema	21
Precisión del sistema	23
Precisión del método	24
Recobro	27
<b>METODOLOGÍA</b>	
Reactivos, equipo y muestras analizadas	30
Estudio espectrofotométrico al UV y UV con segunda derivada del ácido ascórbico	32
Preparación de muestras	34
Métodos químicos	35
Métodos físicos	38
Determinación cuantitativa al UV con segunda derivada de ácido ascórbico en jugos y néctares	42
Aplicación del método propuesto a muestras comerciales	43
Aplicación del método por UV con segunda derivada en jugos claros	43
Aplicación del método por UV con segunda derivada en jugos oscuros	45
Aplicación del método por UV con segunda derivada en néctares claros	47
Aplicación del método por UV con segunda derivada en néctares oscuros	52
Estudio estadístico de la metodología propuesta	54
Estudio estadístico del método Oficial (AOAC)	55
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	
Preparación de las muestras	57
Estudio espectrofotométrico al UV y UV con segunda derivada del ácido ascórbico	58

Resultados del estudio estadístico de la metodología propuesta	65
Resultados del estudio estadístico del Método Oficial (AOAC)	71
Comparación de resultados obtenidos con la metodología propuesta y el método Oficial (AOAC)	78
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>80</b>
<b>ANEXO</b>	<b>83</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>93</b>

# **INTRODUCCIÓN**

## **Y OBJETIVOS**



## INTRODUCCIÓN

El ácido ascórbico ó vitamina C, es una sustancia muy soluble en disolventes polares con propiedades ácidas y fuertemente reductoras; posee actividad nutricional y participa en muchas reacciones biológicas del cuerpo humano. Se usa en la industria farmacéutica, y en la industria alimentaria.

En la industria de alimentos, el ácido ascórbico es utilizado como aditivo para mejorar la estabilidad de los productos. Algunas de las aplicaciones más específicas en los alimentos son:

- ❖ Inhibir la formación de nitrosaminas en productos cárnicos, estabilización del color de la carne, fijación del color de las carnes curadas.
- ❖ Protección enzimática en frutas y vegetales procesados.
- ❖ Fortificación nutricional de alimentos y bebidas.
- ❖ Mejoramiento en la calidad de los sabores.
- ❖ Antioxidante para evitar la descomposición de aceites, vinos, cerveza, leche y productos lácteos.
- ❖ Incrementa la claridad en vinos y cervezas.
- ❖ Mejora la masa panaria.

Los métodos para la determinación de vitamina C publicados hasta la fecha no son suficientemente específicos debido a la amplia variedad de matrices en que se encuentra esta vitamina. El método oficial para la determinación de vitamina C en jugos propuesto por la AOAC<sup>1</sup>, se basa en la titulación directa con el indicador redox 2,6-diclorofenolindofenol. El inconveniente que presenta esta técnica, es la presencia de otras sustancias reductoras que afectan las mediciones en los jugos. Además los jugos oscuros como el de uva, o néctares con sólidos suspendidos hacen que el cambio de color del indicador redox durante la titulación sea poco detectable con la vista.

La espectrofotometría UV con segunda derivada es una buena alternativa para cuantificar la vitamina C, se ha probado satisfactoriamente con jugos de uva, manzana y néctar de manzana, ya que es una técnica más específica y permite medir el contenido de ácido ascórbico en los jugos y néctares, sin embargo es importante optimizarla.

Como comprobación de la metodología propuesta, se hizo la comparación de los resultados obtenidos con la determinación de ácido ascórbico por el método Oficial AOAC en muestras comerciales de jugos y néctares de diferentes sabores, intensidad de colores y marcas.

---

<sup>1</sup> Cunniff P., *Oficial Methods of Análisis of AOAC Internacional*, AOAC Internacional, 16<sup>th</sup> ed., Arlington Virginia U.S.A., 1995, Charper 45, p. 16-18

**OBETIVO GENERAL**

- ❑ Cuantificar ácido ascórbico en jugos y néctares de frutas.

**OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- ❑ Optimizar el método de determinación cuantitativa de vitamina C estándar por espectrofotometría UV con segunda derivada.
- ❑ Optimizar la técnica de preparación de muestras utilizando la técnica de extracción en fase sólida (EFS por sus siglas en español)
- ❑ Cuantificar la vitamina C en jugos procesados transparentes, no transparentes y néctares.
- ❑ Determinar la precisión del método por espectrofotometría UV con segunda derivada.
- ❑ Determinar la precisión del método Oficial AOAC para la determinación de ácido ascórbico.
- ❑ Determinar el recobro del método de espectrofotometría UV con segunda derivada.
- ❑ Determinar el recobro del método Oficial AOAC para la determinación de ácido ascórbico.
- ❑ Comparar la precisión y el recobro obtenidos para cada método.

# **ANTECEDENTES**

## ANTECEDENTES

### VITAMINA C

La vitamina C corresponde al grupo de las vitaminas hidrosolubles. No se almacena en el cuerpo por un largo período de tiempo y se elimina a través de la orina, por este motivo, es importante su administración diaria.

Es una sustancia muy soluble en disolventes polares que posee propiedades ácidas y fuertemente reductoras, tales propiedades se deben a su estructura endiol que está conjugada con el grupo carbonilo de una lactona. La forma natural de la vitamina es el isómero L-; el isómero D- tiene alrededor del 10% de la actividad del L-.<sup>2</sup>

### PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS

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

Fórmula:  $C_6H_8O_6$

Peso molecular: 176.3g/mol

Forma cristalina: monocíclica, usualmente planos, algunas veces agujas

Punto de fusión: 190 – 192°C

Densidad: 1.65g/cm<sup>3</sup>

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

pK<sub>1</sub>: 4.17 (C3-OH)

pK<sub>2</sub>: 11.57 (C2-OH)

Potencial óxido reducción:  $E^1_o = +0.127 V$

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.<sup>5</sup>

Absorción UV del ácido ascórbico a diversos valores de pH:

pH	$\lambda$ max
2	245 nm
6-10	265 nm
>10	294 nm

<sup>2</sup> Fennema R. Owen, *Química de los alimentos*, Edit. ACRIBIA S.A., Zaragoza España, 1993, p. 550

**ESTABILIDAD**

El ácido ascórbico en solución se ioniza rápidamente, el hidroxilo en la posición C3 tiene un  $pK_1 = 4.17$  a  $25^\circ\text{C}$  y una solución de ácido libre tiene un pH de 2.5. El segundo grupo hidroxilo en C2 es mucho más resistente a la ionización ( $pK_2 = 11.57$ ).

El ácido ascórbico es muy sensible a la degradación. Algunos de los factores que influyen en estos mecanismos son la temperatura, la concentración de sal y azúcar presentes en el sustrato que lo contenga, el pH, el oxígeno, la presencia de enzimas, de catalizadores metálicos, etc.

En presencia de oxígeno, el ácido ascórbico se degrada fundamentalmente vía su monoanión ( $\text{HA}^-$ ) dando ácido dehidroascórbico (A). Es una reacción de primer orden que es catalizada por metales de los que depende su velocidad. Cuando no hay presencia de catalizadores, la velocidad de la oxidación del ácido ascórbico es proporcional a la concentración de oxígeno.<sup>5</sup>

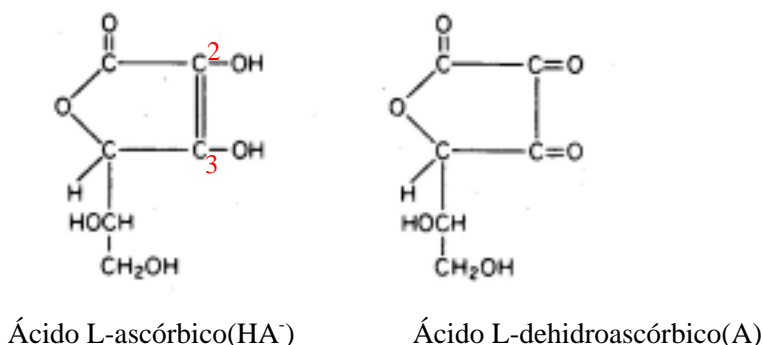


Figura 1. Estructura del ácido L-ascórbico y del ácido L-dehidroascórbico, indicado con rojo el número del carbono 2 y del carbono 3.

La velocidad de la reacción de oxidación del ácido ascórbico disminuye al bajar la temperatura, es decir que el ácido ascórbico se degrada menos a temperaturas bajas, mientras que durante el calentamiento se pierde una gran cantidad de vitamina C.

Otro compuesto que disminuye la velocidad de oxidación del ácido ascórbico es el dióxido de azufre, esto se ha comprobado ya que las frutas que se tratan con dióxido de azufre muestran menores pérdidas de vitamina C durante su procesado y almacenamiento.<sup>5</sup>

## FUNCIONES, REQUERIMIENTOS Y METABOLISMO

La vitamina C es esencial para el hombre ya que ésta no se sintetiza en el cuerpo humano. Interviene en muchos aspectos de la fisiología humana, algunos de los cuales aún no se comprenden perfectamente. Entre las funciones que se conocen de esta vitamina se encuentra su capacidad reductora la cual puede contribuir en varias reacciones biológicas en donde actúe como transportador de hidrógeno, contribuye a la regeneración de tejidos, a la formación de colágeno y en la reposición de hueso, participa en el metabolismo del ácido fólico y de los aminoácidos aromáticos. Está implicada en otros procesos biológicos como los niveles de lípidos y colesterol en la sangre, la absorción y transporte del hierro desde la sangre a los tejidos, la síntesis de esteroides, la actividad de los leucocitos y la formación de anticuerpos.<sup>11</sup>

El ácido ascórbico se absorbe en el intestino delgado y se excreta en la orina. Según el Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán<sup>3</sup> la ingesta diaria recomendada de vitamina C para los adultos sanos es de 60mg.

Las principales fuentes de vitamina C son:

<b>Tabla 1. Contenido de vitamina C en algunos alimentos (mg / 100 g de alimento)<sup>6</sup></b>			
Guayabas	300	Col cruda	55
Grosellas negras	200	Melón	50
Pimiento verde	100	Jugo de limón	50
Berros	60	Naranjas	50
Fresas	60	Toronja	40

## ESCORBUTO

El escorbuto es una enfermedad muy antigua que se describió por los egipcios cuando se observó que podía evitarse entre los marinos con la ingestión de limones, naranjas y guayabas frescas. Esta enfermedad es causada por la deficiencia de ácido ascórbico y puede describirse como una disminución o pérdida de las funciones de este mismo, como hidroxilación de la prolina, que conduce a la formación defectuosa de colágeno en las membranas basales capilares, y de lisina y precursores de catecolaminas y otras sustancias vasoactivas y neurotóxicas.

<sup>3</sup> Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, *Tablas de composición de los Alimentos, Ingestión diaria recomendada (IDR) de proteínas, vitaminas y nutrimentos inorgánicos para la población mexicana*, 2001.

La carencia de vitamina C se manifiesta por múltiples síntomas como: fatiga, debilidad, letargia, irritabilidad, hemorragia gingival, dolor muscular y articular, así como la pérdida de peso.

El escorbuto se puede ver en alcohólicos y en ocasiones en personas de edad avanzada. El tratamiento preventivo es apropiado para pacientes con ingestión limitada de ácido ascórbico, malabsorción o aumento en la necesidad de vitamina C de más de dos semanas. Las dosis excesivas de vitamina C pueden provocar desarrollo de cálculos renales y la formación de cálculos oxalato de calcio.<sup>4</sup>

### **JUGOS DE FRUTA PROCESADOS**

Se entiende por jugos al producto obtenido de la expresión de frutas solas o combinadas, las cuales deben estar maduras, sanas, frescas, limpias, libre de cáscaras, semillas, podrán llevar o no la pulpa del fruto en suspensión; sin diluir, ni fermentar adicionados de edulcorantes y vitamina C, envasados en recipientes sanitarios herméticamente cerrados y sometidos a un proceso térmico para asegurar su conservación y calidad.<sup>4</sup>

La mayoría de los jugos de fruta que aparecen en el mercado provienen de las frutas cítricas. Después de exprimirlo en un escareador, el jugo se filtra, se pasteuriza por el método rápido, se envasa en latas o botellas y se sella. Algunas veces se añade azúcar. El jugo concentrado se prepara mediante destilación a presión reducida o mediante congelación.

Para el análisis de jugos se hacen las siguientes determinaciones: sólidos totales, acidez, cenizas, alcalinidad de las cenizas, fosfatos, potasio, nitrógeno, azúcares, vitamina C, metales traza, aminoácidos y conservadores. Casi siempre en la industria se determina además el índice de refracción, la gravedad específica, el pH, los ácidos volátiles y la actividad enzimática en el jugo<sup>7</sup>.

### **NÉCTARES DE FRUTA**

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 porción de fruta en el producto final es del 25 al 50%.

Las frutas a partir de las cuales se elaboran los néctares de fruta se someten a lavado, pretrituración y calentamiento con objeto de inactivar las enzimas. La pasta así obtenida, con alto

---

<sup>4</sup> Norma Oficial Mexicana NMX-F-463-1984. Alimentos – Alimentos Para infantes y niños de corta edad – Jugos.

contenido en pectinas, se trata con mezclas de enzimas pectinolíticas y celulolíticas, para realizar la maceración. 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 pasteurizan<sup>7,10</sup>.

## **DETERMINACIÓN DE ÁCIDO ASCÓRBICO EN PREPARADOS VITAMÍNICOS Y JUGOS DE FRUTA (MÉTODO OFICIAL AOAC 967.21)**

### **Titulación volumétrica directa con 2,6-diclorofenolindofenol<sup>3</sup>**

#### **A) Fundamento:**

El ácido ascórbico reduce al indicador 2,6-diclorofenolindofenol de color azul oxidándose a ácido dehidroascórbico de color rosa. La vitamina es extraída y titulada en presencia de una solución de ácido fosfórico y ácido acético para mantener la reacción en medio ácido y evitar la autoxidación del ácido ascórbico a pH elevado.

#### **B) Reactivos:**

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

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

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

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

#### **C) Prueba preliminar:**

A una cantidad representativa de muestra añadir 25mL de solución de extracción. Determinar el pH de la solución utilizando una gota del indicador de azul de timol, si el pH es mayor a 1.2 indica la presencia apreciable de sustancias básicas, las cuales deberán neutralizarse antes de realizar la determinación.

#### **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 una



porción entre 50-100mL 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 2mg de ácido ascórbico con solución de indofenol, hacer cada determinación por triplicado. Corregir el volumen de titulante gastado con un blanco de corrección titulando el mismo volumen de solución de extracción.

## **PECTINAS**

La pectina es un polisacárido constituido por 150-500 unidades de ácido galacturónico (P.M. 30,000 a 100,000 Daltones) parcialmente esterificado con un grupo metoxilo. Se encuentran en los tejidos vegetales sobre todo en los tejidos blandos como en las frutas, (pectina nativa o protopectina) tienen un importante papel en la textura por lo que son muy importantes en la elaboración de zumos. Hay que destacar también sus propiedades gelificantes.

La molécula fundamental es el ácido galacturónico que va a estar parcialmente metilado en su grupo carboxilo. En determinados puntos de la estructura de las pectinas, existe otro azúcar que es la L-ramnosa, la cual provoca la formación de codos pécticos doblando el polímero de ácido galacturónico. Las zonas lisas corresponderán a las cadenas lineales de ácido galacturónico que se doblan en el codo péctico por la presencia de la L-ramnosa. Además hay azúcares neutros ( $\beta$ -D-galactopiranososa y  $\alpha$ -L-arabinofuranosa) que forman cadenas pequeñas que dan lugar a la formación de lo que se denominan cadenas rugosas.

El grado de esterificación (GE) de las pectinas es el porcentaje de grupos carboxilos metilados (ésteres metílicos) entre los carboxilos totales de las moléculas de ácido galacturónico. En función del grado de esterificación podremos hablar de distintos tipos de pectinas: Pectinas de alto metoxilo donde GE es mayor al 50%. Pectinas de bajo metoxilo donde GE es menor al 50%

Aparte de las pectinas hay otras sustancias pécticas como las protopectinas que son un material insoluble que se encuentra unido a otros componentes de la pared celular de los tejidos vegetales como la celulosa o la hemicelulosa. Están presentes en la fruta no madura, y a medida que ésta madura, la protopectina se va solubilizando y se transforma en pectinas. Si ocurre una sobremaduración, las pectinas se van a degradar por determinadas enzimas y forman el ácido péctico que es cuando no hay metilación en los grupos carboxilos del ácido galacturónico. Si continúa degradándose dará lugar a la formación de monómeros de ácido galacturónico. Todas estas sustancias confieren distintas textura a la fruta.

Las pectinas son solubles en disoluciones acuosas lo que es necesario para elaborar geles y sustancias viscosas. La solubilidad varía en función de las condiciones, los enlaces metálicos provocan un separamiento entre las cadenas de polipéptidos lo que las hace más solubles. Cuanto mayor sea el grado de esterificación, mayor será la solubilidad. Pueden ser insolubles en presencia de calcio o de otros cationes bivalentes por la formación de pectatos cálcicos que van a precipitar. Se pueden precipitar agregando solventes orgánicos como acetona, metanol, etanol y propanol.<sup>1,5,15</sup>

## ESPECTROSCOPIA UV-VIS

La radiación ultravioleta (UV) se encuentra en la zona del espectro electromagnético que va de 4 a 400nm de longitud de onda, (1286 y 36 Kcal/mol.) Esta zona está dividida en dos regiones conocidas como ultravioleta cercano (de 200 a 400nm) y ultravioleta lejano (4 a 200nm). De los 400 a los 800nm del espectro electromagnético encontramos a la radiación visible.

Los electrones que contribuyen a la absorción de radiación UV por una molécula orgánica son: (1) aquellos que participan directamente en la formación del enlace entre átomos y, por tanto, se asocian con más de un átomo; (2) y los electrones de no enlace (n) que están en gran parte localizados alrededor de átomos como oxígeno, halógenos, azufre y nitrógeno.

Las transiciones electrónicas entre distintos niveles de energía se pueden producir por absorción de radiación. Son posibles cuatro tipos de transiciones de acuerdo a los enlaces que absorben la radiación:  $\sigma \rightarrow \sigma^*$ ,  $n \rightarrow \sigma^*$ ,  $n \rightarrow \pi^*$  y  $\pi \rightarrow \pi^*$

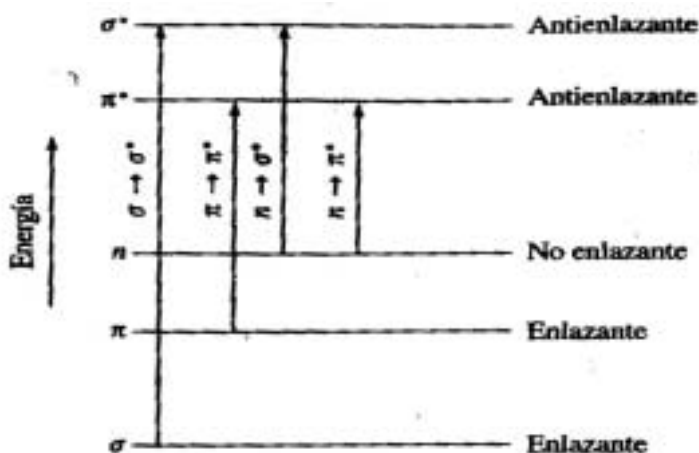


Figura 2. Niveles de energía y transiciones electrónicas.

En la transición  $\sigma \rightarrow \sigma^*$ , un electrón de un orbital  $\sigma$  de enlace de una molécula se excita al correspondiente orbital antienlazante mediante la absorción de radiación. La energía que se necesita para lograr esta transición es la más grande y corresponde a una frecuencia radiante de la región ultravioleta de vacío.

Las transiciones  $n \rightarrow \sigma^*$  suceden cuando existen pares de electrones no compartidos (electrones no enlazantes). Se pueden producir por radiación de la región comprendida entre 150nm y 250nm. Los máximos de absorción para transiciones  $n \rightarrow \sigma^*$  tienden a desplazarse hacia longitudes de onda más cortas en presencia de disolventes polares como agua o etanol.

Los dos últimos tipos de transiciones ( $n \rightarrow \pi^*$  y  $\pi \rightarrow \pi^*$ ) producen picos de absorción dentro de una región espectral experimentalmente accesible (200 a 700nm). Ambas transiciones requieren la presencia de grupos funcionales no saturados que aportan los electrones  $\pi$ . Los picos asociados con transiciones  $n \rightarrow \pi^*$  generalmente se desplazan hacia longitudes de onda más cortas (desplazamiento hipsocrómico o hacia el azul) cuando aumenta la polaridad del disolvente. Ocurre lo contrario con las transiciones  $\pi \rightarrow \pi^*$  (desplazamiento batocrómico o hacia el rojo).

Los sistemas con electrones  $\pi$  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  $\pi$  y  $\pi^*$  se hace cada vez menor porque los electrones están más deslocalizados.

Al átomo o conjunto de átomos que absorben radiación se le denomina cromóforo. En las moléculas existen también átomos o grupos de átomos que no absorben radiación, pero hacen que se modifique alguna de las características de la absorción del cromóforo, se denomina a tales grupos auxócromos; éstos pueden modificar la intensidad de la absorción, de tal forma que cuando la intensidad de la absorción aumenta ocurre un efecto hipercrómico, y cuando disminuye se denomina efecto hipocrómico.

Los disolventes que se utilizan en esta técnica deben ser seleccionados bajo ciertos criterios. El disolvente no debe absorber en la longitud de onda de la región del espectro de interés y deben tomarse en cuenta sus posibles efectos sobre el sistema absorbente. Cuando aumenta la polaridad del disolvente ocurre un desplazamiento hipsocrómico o hacia el azul ( $\lambda$  menores), y cuando disminuye la polaridad del disolvente se da un desplazamiento batocrómico o hacia el rojo ( $\lambda$  mayores). El efecto hipsocrómico surge de una mayor solvatación del par de electrones no enlazantes que disminuye la energía del orbital  $n$  haciendo que la diferencia de energía entre el nivel  $n$  y el nivel excitado aumente, lo que hace que la energía de la radiación

absorbida para efectuar la transición sea mayor, por lo tanto la longitud de la onda se vuelve menor. Los efectos de este tipo se observan con disolventes polares próticos, como agua o alcohol, en los cuales es frecuente la formación de puentes de hidrógeno entre los protones del disolvente y el par de electrones no enlazantes. Con el efecto batocrómico, las fuerzas de polarización atractivas entre el disolvente y el absorbente tienden a disminuir los niveles de energía de ambos estados, excitado y no excitado. Sin embargo, el efecto sobre el estado excitado es mayor y, como consecuencia, las diferencias de energía entre el orbital  $n$  y el estado excitado se hacen menores cuando aumenta la polaridad del disolvente; resultando pequeños desplazamientos batocrómicos.<sup>13,14</sup>

### ESPECTROSCOPIA UV-VIS CON SEGUNDA DERIVADA

En la espectroscopia de derivación, se registra la primera o segunda derivada de la absorbancia con respecto a la longitud de onda, en función de la propia longitud de onda. En un espectro de derivación, la capacidad para detectar y medir características espectrales secundarias aumenta considerablemente. Esta ampliación de los detalles espectrales característicos puede registrar las diferencias entre espectros muy similares y monitorear cambios muy ligeros de los espectros. Además, se puede usar en análisis cuantitativos para medir la concentración de una especie cuya banda está alterada por la presencia de un contaminante en la muestra, siempre y cuando la absorbancia del compuesto por cuantificar cumpla la ley de Lambert-Beer.

Para un espectro simple de una banda la primera derivada es un trazo del gradiente  $dI/d\lambda$  de la absorción en función de la longitud de onda ( $\lambda$ ), 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 ( $\lambda_{max}$ ).

La segunda derivada de un espectro  $d^2I/d^2\lambda$  en función de  $\lambda$ , tiene dos mínimos con un máximo entre ellos en la  $\lambda_{max}$  de la banda de absorción del espectro normal. En teoría la altura del banda máxima medida de  $d^2I/d^2\lambda$  a la  $\lambda_0$  es proporcional a la concentración del analito.<sup>14</sup>

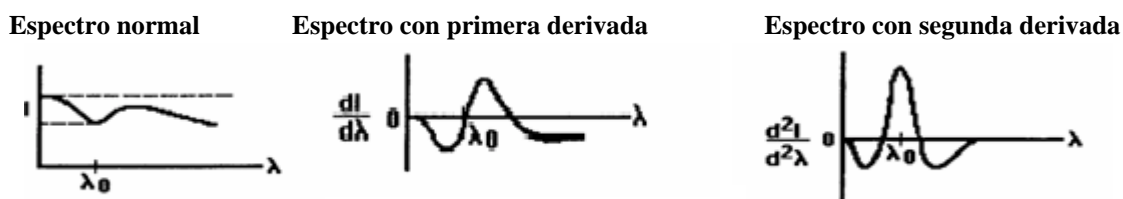


Figura 3. Espectro UV y sus derivadas.

### Componentes y funcionamiento de un espectrofotómetro UV

Espectrofotometría significa “medida del espectro de la luz” y se refiere a la medida del tipo y cantidad de luz que se obtiene de una disolución. Se les llama espectrofotómetros a todos los aparatos basados en esta técnica.

El espectrofotómetro tiene un generador de radiación lumínica (policrómica), un separador para obtener la radiación adecuada y luego mide la potencia radiante obtenida.

Los componentes fundamentales que tienen todos los espectrofotómetros son:

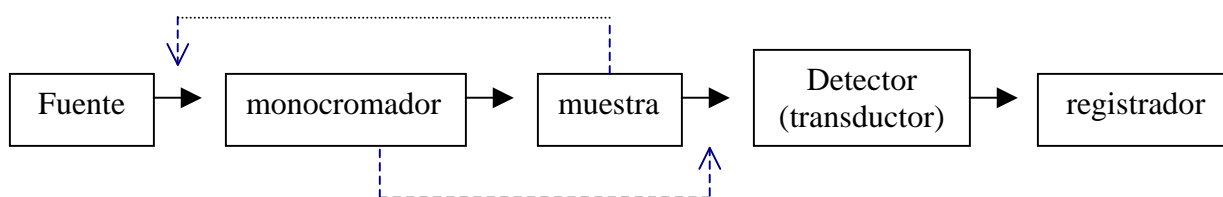


Figura 4. Componentes fundamentales de los espectrofotómetros.

**Fuente:** es el dispositivo emisor de radiación electromagnética. Generalmente emite una banda muy amplia de radiaciones continuas alrededor de la  $\lambda$  deseada. Según la zona del espectro que emita, hay tres tipos:

- Visible: lámparas de filamento de Tungsteno incandescente. Son similares a las bombillas comunes.
- Ultravioleta: Tubo de hidrógeno o de descarga de deuterio.

**Monocromador** o selector de  $\lambda$ : tiene como objetivo controlar la pureza de la radiación emitida consiguiendo el menor ancho de banda de longitud de onda posible. Consta de un conjunto de lentes, espejos, rendijas, filtros y rejillas, para dispersar y separar, enfocar y restringir la radiación no deseada.

Los componentes de los monocromadores pueden ser:

- Prismas: producen la refracción de la luz, siendo el ángulo de refracción mayor cuanto menos es la  $\lambda$  de la radiación.

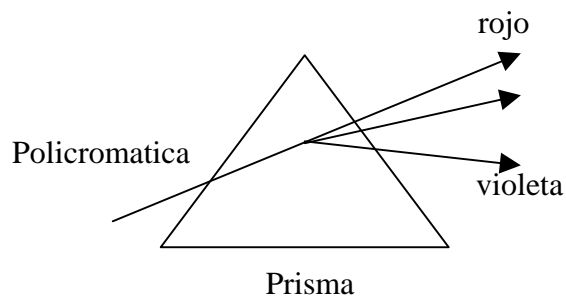


Figura 5. Efecto de la luz sobre un prisma.

Después del prisma hay una rendija por donde se hace pasar la radiación deseada.

Según el tipo de radiaciones se usan prismas de vidrio (VIS), cuarzo o sílice (UV).

- Redes de difracción: Es una lámina metálica (Al) altamente pulida sobre la que se han hecho una gran cantidad de estrías (líneas paralelas). Estas estrías actúan como centros de dispersión de todas las radiaciones incidentes. Hay una dispersión lineal de las  $\lambda$  de una determinada banda cromática, por lo tanto se puede usar en todas las regiones del espectro.

**Celdas para la muestra:** recipientes donde se coloca la muestra a analizar. Varían mucho según la técnica a utilizar, pero como característica común deben ser transparentes es decir que no absorban en la región de  $\lambda$  de que se va a medir. Para VIS y UV se utilizan cubetas de vidrio ó cuarzo, dependiendo de la región, de 1cm de lado.

**Detector (transductor):** Produce una señal eléctrica cuando recibe un fotón. Ésta señal eléctrica luego es convertida en unidades de potencia radiante transmitida o absorbida.

Los detectores también dependen de la región de  $\lambda$  en la que se trabaja:

- Fototubo: Para la zona del VIS y UV. Con el mismo principio de funcionamiento que la celda fotoeléctrica. Al interactuar un fotón en el cátodo de ésta celda, éste emite un electrón hacia el ánodo, lo cual provoca un flujo de corriente eléctrica que es medida por un voltímetro. La respuesta del material fotoemisor depende de la  $\lambda$  en que se trabaja.

Cuando se utilizan radiaciones de baja intensidad la señal eléctrica es muy débil y sujeta a gran error. En este caso se utiliza el “Tubo fotomultiplicador”, que incluye varios fototubos en serie. En este caso, el choque de un fotón forma una cascada de electrones que dan una señal más intensa.

**Registrador:** En los instrumentos más antiguos la señal se mostraba en un medidor analógico que tenía una escala en unidades de transmitancia y de absorbancia. Los instrumentos más modernos tienen un sistema digital, en el que aparece el valor numérico de transmitancia o el

valor de concentración cuando puede realizar automáticamente los cálculos de calibración. En el caso de que el equipo sea automatizado se puede obtener el espectro de absorción (en un intervalo de  $\lambda$ ) de una sustancia por medio de UV, el registrador acoplado a una computadora muestra un gráfico con el valor de  $\lambda$  en abcisas y la absorbancia en ordenadas.

### Instrumentos de doble haz

Muchos espectrofotómetros se basan en diseños de doble haz. Los instrumentos de doble haz cuentan con un divisor de haz con el que se forman dos haces, un haz pasa a través de la referencia hacia el fotodetector y el otro atraviesa la muestra hacia el mismo detector.<sup>13</sup>

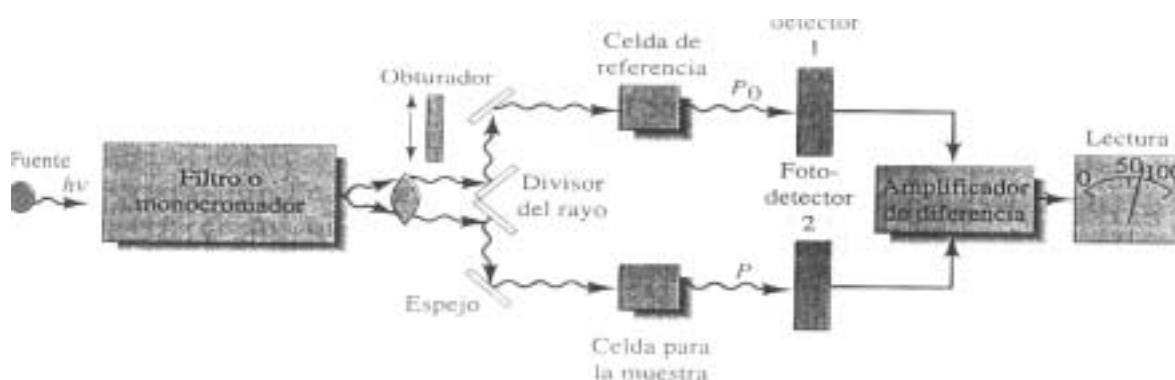


Figura 6. Espectrofotómetro UV-VIS de doble haz.

### LEY DE LAMBERT-BEER

Cada especie molecular tiene la capacidad de absorber su propia  $\lambda$  característica de la radiación electromagnética. Este proceso transfiere energía a la molécula y provoca una disminución en la potencia de la radiación electromagnética incidente. Por consiguiente, la absorción de la radiación atenúa la potencia del rayo de acuerdo con la ley de la absorción de Lambert y Beer.

Esta ley proporciona información cuantitativa de la relación que existe entre la atenuación de la radiación y la concentración de las moléculas que la absorben, así como la distancia que recorre el rayo en el medio absorbente. Cuando la luz atraviesa una solución de un analito, la intensidad de la radiación disminuye como consecuencia de la excitación del mismo.

En la figura 7 se muestra la atenuación que sufre un haz paralelo de radiación monocromática cuando pasa por una solución absorbente de espesor  $b$  en cm y concentración  $c$  en moles por litro.

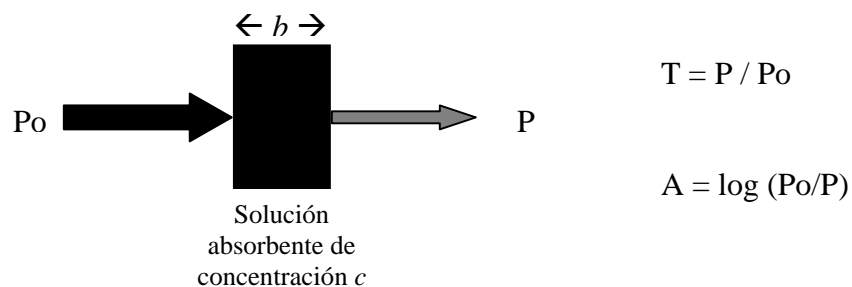


Figura 7. Atenuación de un haz de radiación por una solución absorbente, donde  $P_o$  = Radiación incidente,  $P$  = Radiación transmitida,  $A$  = Absorbancia y  $T$  = Transmitancia.

La absorbancia de una solución está relacionada con la transmitancia en forma logarítmica, siendo variables inversamente proporcionales:

$$A = -\log T = \log (P_o/P)$$

La transmitancia y la absorbancia de una muestra no pueden ser medidas directamente ya que la celda y la solución que contiene al analito absorbente pueden dispersar o reflejar el haz de luz que se hace incidir sobre la muestra causando pérdidas de potencia en la cuantificación. Por esta razón se compara la energía del haz transmitido por la solución del analito con la energía de un haz que atraviesa una celda casi idéntica que contiene sólo el disolvente del analito (blanco, es decir todo lo que tiene la muestra menos el analito).

La ley de Lambert-Beer dice que la absorbancia tiene una relación lineal con la concentración de las especies absorbentes y con la longitud de la trayectoria de la radiación en el medio absorbente. Lo anterior se expresa con la siguiente ecuación:

$$A = \log (P_o/P) = abc$$

dónde:

$A$  = absorbancia

$a$  = coeficiente de absortividad

$b$  = longitud de la trayectoria de la radiación

$c$  = concentración

El coeficiente de absortividad es una constante de proporcionalidad que elimina las unidades de  $a$  y  $b$  ya que la absorbancia es adimensional. Cuando las unidades de  $a$  y  $b$  están en moles por litro y centímetros respectivamente, la constante de proporcionalidad se denomina coeficiente de absortividad molar y se designa con la letra  $\epsilon$  (épsilon) la cual tiene unidades de  $Lmol^{-1}cm^{-1}$ .



La ley de Lambert-Beer describe el comportamiento de la absorción en soluciones diluidas, ya que en concentraciones superiores a 0.01M la distancia promedio entre los iones o moléculas de las especies absorbentes disminuyen el punto en que cada partícula afecta la distribución de carga y por lo tanto la absorción de las partículas vecinas. Cuando la concentración del analito es muy baja, la probabilidad de que el haz de luz incida sobre la partícula disminuye.

Existen dos tipos de desviaciones de la ley de Lambert-Beer que se presentan debido a factores externos, químicos e instrumentales.

Las desviaciones químicas se deben a la asociación, disociación o reacción del analito con el medio en el que se encuentra disuelto, formando productos que tienen una absorción distinta a la del analito. La magnitud de estas desviaciones puede predecirse conociendo las absorptividades molares de las especies absorbentes y las constantes de equilibrio de las reacciones. Estos procesos afectan directamente al analito, por lo que es prácticamente imposible compensarlos.

Las desviaciones debidas a los instrumentos son causadas por la calidad que tienen las fuentes de radiación policromáticas, rejilla o filtro que sirven para seleccionar una banda de longitudes de onda (semejando una fuente monocromática). El problema de utilizar este tipo de instrumentos es que existen bandas de absorción en donde los analitos varían mucho su absorbancia, y esto causa desviaciones de la ley de Lambert-Beer, por eso es necesario encontrar una banda de absorción lo más cercana a la máxima longitud de onda en donde el analito no cambie mucho su absorbancia, como se muestra en la figura siguiente:

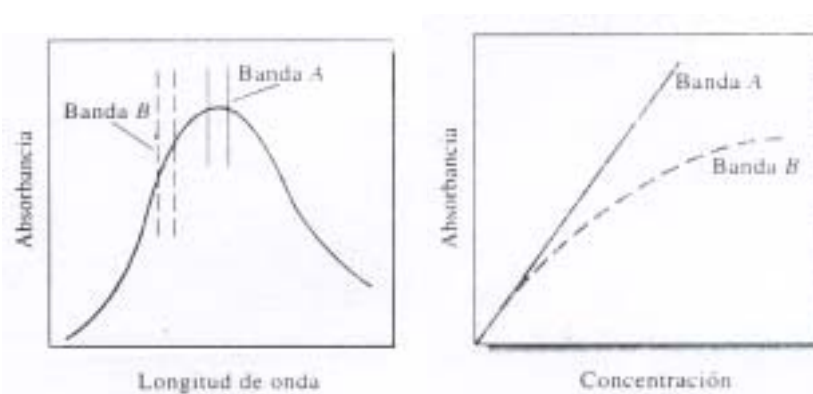


Figura 8. Efecto de la radiación policromática sobre la ley de Lambert-Beer: la banda B presenta desviaciones.

**EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA Y CARTUCHOS DE EXTRACCIÓN**

En la preparación de las muestras limpiar y concentrar son dos objetivos muy importantes. La limpieza de la muestra se requiere cuando las impurezas de la matriz de la muestra interfieren con las medidas analíticas en el método que se está utilizando. En el análisis UV una impureza que absorba en la misma región que el analito tiene que ser removida antes de hacer la determinación final.

La extracción en fase sólida es un proceso de extracción con una fase estacionaria sólida y se aplica una fase móvil líquida. La muestra en solución pasa a través del adsorbente empacado en la columna de extracción, el analito es retenido o aislado mientras que el resto de la solución pasa a través del adsorbente, seguido por la elución con un mínimo de volumen de disolvente. En la extracción de fase sólida normalmente el sorbente posee una mayor atracción por el analito que por el disolvente en el que se encuentra disuelto.

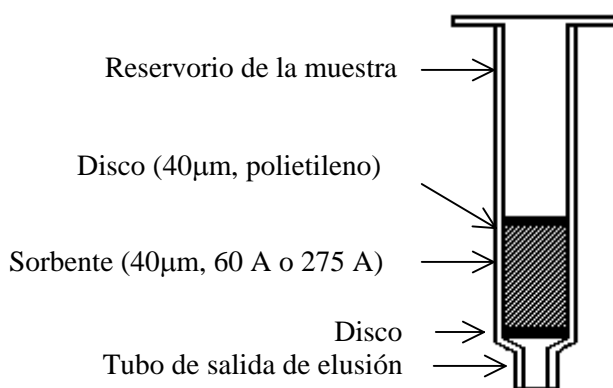


Figura 9. Cartucho de extracción en fase sólida y sus componentes.

Los mecanismos de separación ocurren por interacciones intermoleculares entre las moléculas del analito y los grupos funcionales del adsorbente, estas fuerzas son: iónicas, enlaces de hidrógeno, dipolo-dipolo, fuerzas de London y dipolo-dipolo inducido.

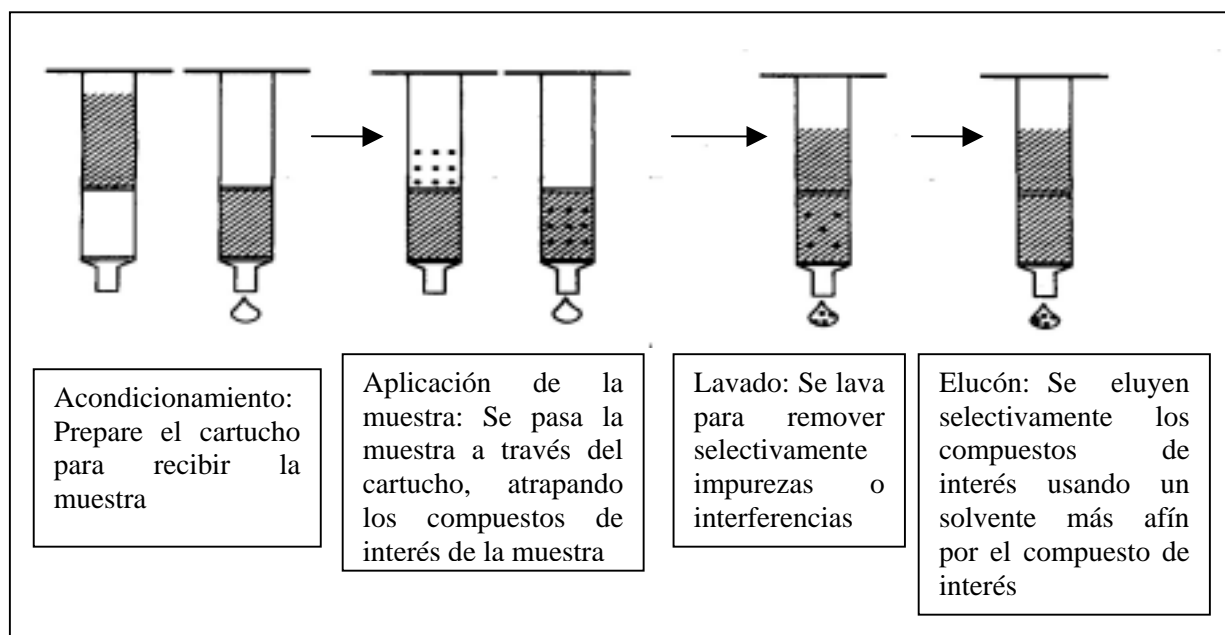


Figura 10. Proceso de extracción en un cartucho en fase sólida.

Un adsorbente muy utilizado es el Octadecil  $C_{18}$ , es el adsorbente de menor polaridad disponible y el más adecuado de todos los adsorbentes para aislar con un mecanismo no polar.

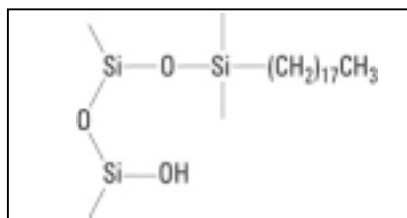


Figura 11. Estructura del sorbente octadecilsilano (octadecil  $C_{18}$ ) unido covalentemente a una superficie de partículas de sílica.

Los compuestos extremadamente no polares son difíciles de eluir de  $C_{18}$ , este adsorbente no retiene moléculas muy polares como los hidratos de carbono. Es considerado el adsorbente menos selectivo. El adsorbente  $C_{18}$  es excelente para desalinizar matrices porque las sales pasan a través del adsorbente sin ser retenidas. Las interacciones polares entre el analito por aislar y el adsorbente son menos significativas con  $C_{18}$  que con otro adsorbente por el efecto de la larga cadena de hidrocarburos que posee.

Otros adsorbentes no polares que existen en el mercado son el octil ( $C_8$ ), ciclohexil ( $C_6H_{11}$ ), fenilo ( $C_6H_6$ ), ciano (CN) y butilo ( $C_4$ ).

## VALIDACIÓN DE MÉTODOS

El término validación define la capacidad de un método o técnica para cubrir adecuadamente los objetivos que tiene una aplicación analítica.

Los parámetros que se utilizan normalmente para la validación de un método, generalmente son:

- ❖ Condiciones óptimas de trabajo
- ❖ Linealidad del sistema y del método
- ❖ Precisión del sistema y del método (repetibilidad y reproducibilidad)
- ❖ Exactitud del sistema y del método
- ❖ Límite de cuantificación del sistema y del método
- ❖ Límite de detección del sistema y del método
- ❖ Tolerancia del sistema
- ❖ Recobro
- ❖ Estabilidad de la muestra

A continuación se presenta una breve descripción de los parámetros de validación que se emplearon en este trabajo para realizar la comparación de dos metodologías analíticas:

### LINEALIDAD DEL SISTEMA

La linealidad es un parámetro que nos indica que la relación entre la respuesta que proporciona un instrumento es proporcional a una concentración determinada y tiende a una línea recta en un intervalo dado. Lo anterior se puede calcular tanto para la linealidad del sistema y la linealidad del método, en ambas se debe probar que la variable dependiente es directamente proporcional a la variable independiente, para lo cual se hace una regresión lineal, en el caso de la linealidad del sistema (que es la realizada en este trabajo) la variable dependiente es la respuesta o señal y la variable independiente es la concentración del analito.

Una vez que se ha realizado la regresión lineal a los datos de una curva de calibración de un sistema, se deben cumplir dos requisitos de aceptación internacional: debe observarse una tendencia lineal en los puntos de la gráfica y debe tener como mínimo un coeficiente de correlación ( $R^2 \geq 0.98$  ó  $r \geq 0.98$ , con lo que podemos asegurar que la relación entre la respuesta del sistema y la concentración de un analito dado, tiende a una línea recta.<sup>8</sup>

Si se cumplen dichas condiciones se realiza una prueba de hipótesis a la ordenada al origen para demostrar si la ecuación de la recta de la curva de calibración del sistema tiende al origen (cero), y posteriormente se calcula el intervalo de confianza (I.C.) para la ordenada y la

pendiente obtenidas. De esta manera conoceremos la ecuación más adecuada para la curva de calibración del sistema.

Basándonos en la ecuación:

$$Y = \gamma X + \beta$$

Se establece lo siguiente:

H<sub>0</sub>: b = β, donde β = 0 (Hipótesis nula)

H<sub>1</sub>: b ≠ β (Hipótesis alterna)

El estadístico de prueba a utilizar en este caso es la “t de student”:

$$t_{cal} = \frac{b - \beta}{Se} \sqrt{\frac{nS_{xx}}{S_{xx} + (n\bar{X})^2}}$$

dónde:

b = Ordenada al origen

β = Ordenada al origen poblacional (β=0)

Se = Error típico de estimación

S<sub>xx</sub> = Suma de cuadrados de la variable independiente

n = Número de determinaciones

$\bar{x}$  = Media experimental

Al tratarse de un ensayo de dos colas y tomando un nivel de significancia de α=0.05 (5%), que corresponde a un valor que se toma a nivel internacional para la mayoría de las metodologías analíticas al ser planteadas, y con n-2 grados de libertad del error típico de estimación, éste se calcula de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$Se = \sqrt{\frac{S_{xx}S_{yy} - (S_{xy})^2}{(n-2)nS_{xx}}}$$

dónde:

$$S_{xx} = n \sum_{l=1}^n Xl^2 - \left[ \sum_{l=1}^n Xl \right]^2$$

$$S_{yy} = n \sum_{l=1}^n Yl^2 - \left[ \sum_{l=1}^n Yl \right]^2$$

$$S_{xy} = n \sum_{l=1}^n XlYl - \left[ \sum_{l=1}^n Xl \right] \left[ \sum_{l=1}^n Yl \right]$$

El criterio que se toma para rechazar la hipótesis nula ( $H_0$ ) es:

$$t_{cal} < -t_{\alpha/2} \text{ ó } t_{cal} > t_{\alpha/2}$$

De esta prueba concluiremos si la ecuación de la recta de la curva de calibración del sistema se debe emplear como una ecuación de una recta que tiene una ordenada igual a cero, o bien, emplear la ecuación de la recta con su respectiva ordenada en el caso de que se rechazara la hipótesis nula ( $H_0: b = \beta$ , donde  $\beta = 0$ ).

Para calcular el intervalo de confianza para la ordenada y la pendiente con el mismo nivel de significancia se utilizan las siguientes ecuaciones:

Ordenada

$$I.C. = b \pm t_{\alpha/2} Se \sqrt{\frac{Sxx + (nX)^2}{nSxx}}$$

Pendiente

$$I.C. = m \pm t_{\alpha/2} Se \sqrt{\frac{n}{Sxx}}$$

## PRECISIÓN

La precisión se define como el grado de concordancia entre varias mediciones de una misma propiedad realizadas en las mismas condiciones. Se puede calcular tanto para el sistema como para el método, esta última se expresa como repetibilidad y reproducibilidad.

### PRECISIÓN DEL SISTEMA

Se define como precisión del sistema al grado de concordancia de diferentes mediciones de varias soluciones de un mismo analito a la misma concentración, y que sean provenientes todas de una misma población. Todas las soluciones y mediciones las deberá realizar el mismo analista y deberán hacerse bajo las mismas condiciones de trabajo.

Los resultados de este ensayo, por tratarse de un sistema espectrofotométrico, no deben diferir más del 3%.<sup>2</sup>

Para este ensayo se realizan pruebas de hipótesis sobre la varianza, con los datos obtenidos, con lo que se podrá concluir si la varianza de las mediciones es mayor o menor a una varianza definida, en este caso del 5%:

$$H_0: s^2 = \sigma_0^2, \text{ donde } \sigma_0^2 = \text{es la varianza contra la que se va a comparar (mínimo 5\% del C.V.)}$$

$$H_1: s^2 \neq \sigma_0^2$$

Por tratarse de muestras aleatorias que provienen de una población normal de varianza  $\sigma_0^2$  se utiliza la prueba de  $\chi^2$  con n-1 grados de libertad, y se comparará con la de tablas:

$$\chi^2_{cal} = \frac{(n-1)s^2}{\sigma_0^2}$$

dónde:

n = número de determinaciones

s = desviación estándar muestral (experimental)

$\sigma_0^2$  = desviación estándar máxima aceptada, es decir, contra la que vamos a comparar (mínimo 5% del C.V.)

El criterio para rechazar la  $H_0$  es:

$$\chi^2_{cal} > \chi^2_{\alpha}$$

y el intervalo de confianza, con un nivel de significancia de  $1-\sigma$ , para  $s^2$  es:

$$\frac{(n-1)s^2}{\chi^2_{\alpha/2}} < s^2 < \frac{(n-1)s^2}{\chi^2_{(1-\alpha/2)}}$$

Tomando la raíz cuadrada de cada miembro de la desigualdad obtenemos el intervalo de confianza para la desviación estándar “s” con el mismo nivel  $1-\sigma$

$$\sqrt{\frac{(n-1)s^2}{\chi^2_{\alpha/2}}} < s < \sqrt{\frac{(n-1)s^2}{\chi^2_{(1-\alpha/2)}}$$

### **PRECISIÓN DEL MÉTODO: REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD**

El término repetibilidad se utiliza para designar a la igualdad o diferencia que hay entre las repeticiones que se hacen de una misma medición realizadas por el mismo analista, utilizando el mismo método, instrumentos y en las mismas condiciones.

En este caso el término reproducibilidad es la igualdad o diferencia que hay entre las medición realizadas al modificar algún parámetro del mismo método (analistas o instrumentos) y en las mismas condiciones.

Los resultados de este ensayo se pueden ver afectados por algunas variables como la habilidad del analista, volúmenes medidos y la variabilidad en la composición (matriz) de cada muestra analizada.<sup>8</sup>

Para interpretar los resultados de estas pruebas se realizan las siguientes pruebas de hipótesis con los datos obtenidos, tomando los siguientes criterios:

**REPETIBILIDAD**

La hipótesis nula para el caso de repetibilidad del método es:

$H_0: s^2 = \sigma_0^2$ , donde  $\sigma_0^2 =$  se calcula con los datos obtenidos

$H_1: s^2 > \sigma_0^2$

Por tratarse de muestras aleatorias que provienen de una población normal de varianza  $\sigma_0^2$  se utiliza la prueba de  $\chi^2$  con n-1 grados de libertad:

$$\chi^2_{cal} = \frac{(n-1)s^2}{\sigma_0^2}$$

dónde:

n = número de determinaciones

s = desviación estándar muestral

$\sigma_0^2$  = desviación estándar máxima aceptada

El criterio para rechazar la  $H_0$  es:

$$\chi^2_{cal} > \chi^2_{\alpha}$$

Para calcular el intervalo de confianza, con un nivel de significancia de  $1-\sigma$ , para  $s^2$  es:

$$\frac{(n-1)s^2}{\chi^2_{\alpha/2}} < s^2 < \frac{(n-1)s^2}{\chi^2_{(1-\alpha/2)}}$$

Tomando la raíz cuadrada de cada miembro de la desigualdad obtenemos el intervalo de confianza para la desviación estándar “s” con el mismo nivel  $1-\sigma$

$$\sqrt{\frac{(n-1)s^2}{\chi^2_{\alpha/2}}} < s < \sqrt{\frac{(n-1)s^2}{\chi^2_{(1-\alpha/2)}}}$$

**REPRODUCIBILIDAD**

Esta prueba consiste en determinar si las dos muestras son provenientes de poblaciones iguales.

Para determinar la reproducibilidad del método se hace una comparación entre las varianzas y las medias obtenidas de los resultados de cada analista.

La siguiente es la prueba de hipótesis sobre las varianzas:

$H_0: s_1^2 = s_2^2$



$$H_1: s_1^2 \neq s_2^2$$

Se utiliza el estadístico F de Snedecor para la comparación de varianzas, para demostrar si los analistas tuvieron la misma precisión, que se calcula como:

$$F_{cal} = \frac{s_1^2}{s_2^2}$$

dónde

$s_1^2$  = es la varianza muestral mayor con  $n_{M-1}$  grados de libertad

$s_2^2$  = es la varianza muestral menor con  $n_{M-1}$  grados de libertad

Se rechaza la hipótesis nula  $H_0$  si:

$$F_{cal} > F_{\alpha/2}$$

con grados de libertad  $n_{M-1}$ ,  $n_{m-1}$

Dependiendo del resultado obtenido sobre las varianzas se procede a realizar la prueba de hipótesis sobre las medias y ésta se establece como:

$H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0$ , es decir  $\mu_1 = \mu_2$

$H_1: \mu_1 \neq \mu_2$

Si en la prueba anterior de las varianzas se demostró que las varianzas son semejantes, el estadístico de prueba que se utiliza es:

$$t_{cal} = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}} \sqrt{\frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 - 2)}{n_1 + n_2}}$$

con  $n_1 + n_2 - 2$  grados de libertad

Para rechazar la hipótesis nula se toma el siguiente criterio:

$$t_{cal} < -t_{\alpha/2} \text{ ó } t_{cal} > t_{\alpha/2}$$

En el caso de que las varianzas no son comparables, es decir que los analistas no tienen la misma precisión, el estadístico de prueba utilizado es:

$$t_{cal} = \frac{X_1 - X_2}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}}$$

con  $\phi$  grados de libertad, y éste se calcula con la ecuación:

$$\phi = \frac{\left( \frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2} \right)^2}{\frac{\left( \frac{s_1^2}{n_1} \right)^2}{n_1 - 1} + \frac{\left( \frac{s_2^2}{n_2} \right)^2}{n_2 - 1}}$$

La hipótesis nula se rechaza si:

$$t_{\text{cal}} < -t_{\alpha/2} \text{ ó } t_{\text{cal}} > t_{\alpha/2}$$

## RECOBRO

En el caso de muestras o matrices en los que no es simple realizar linealidad de método es común realizar cálculo de recobro para tomar a éste como un factor importante de corregir en los cálculos cuantitativos que se realicen sobre las muestras.

El recobro es el resultado expresado en porcentaje de la comparación entre la concentración del analito problema que se obtiene y la concentración que debe obtenerse después de tratar con el método una muestra a la cual se le adiciona una concentración conocida del analito. El cálculo se realiza con la siguiente ecuación:

$$R = \frac{[\text{Concentración}]_{\text{obtenida}}}{[\text{Concentración}]_{\text{teórica}}} \times 100$$

Este proceso se puede realizar ya sea fabricando una muestra sintética lo más parecida a la muestra que se va a trabajar en la que se le adicionaron cantidades conocidas y precisas del o los analito(s) a analizar y a la que se le aplicará la metodología desarrollada; o por medio de lo conocido como “adición a la muestra”, en la cual a una muestra que ya fue analizada con la metodología se le adicionan cantidades conocidas y precisas del o los analito(s) a analizar y a la que se le aplicará de nuevo la metodología desarrollada.

El % de recobro por tratarse de una metodología espectrofotométrica debe caer dentro del intervalo de 97 a 103% y tener un C.V. no mayor del 3% para ser una metodología aceptable.<sup>2</sup>

# **METODOLOGÍA**

## METODOLOGÍA

Este capítulo se encuentra dividido en cinco partes, cuyo contenido se enlista a continuación:

1) Reactivos, equipo y muestras.

Estudio espectrofotométrico al UV y UV con segunda derivada del ácido ascórbico:

Realización de la curva patrón.

Linealidad y precisión del sistema.

2) Preparación de muestras: Pruebas que se realizaron en este trabajo para optimizar la metodología de extracción de ácido ascórbico en jugos, publicada en: Ramírez Maya E. M., *Nuevo método por espectrometría UV con segunda derivada para la determinación de ácido ascórbico en jugos de fruta procesados*, Tesis de licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México, D.F., 2002, p. 29.

Proposición de la metodología de trabajo y su diagrama de flujo.

3) Determinación cuantitativa al UV con segunda derivada de ácido ascórbico en jugos y néctares con la metodología propuesta.

4) Estudio estadístico de la metodología propuesta.

5) Estudio estadístico del método Oficial.

**REACTIVOS**

- Patrón de L-Ácido ascórbico al 99% (vitamina C) Sigma Aldrich.
- Ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) concentrado al 36.5%.
- 2,6-Dicloroindofenol, hidrato de la sal sódica Aldrich Chem. Co.
- Ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) 99.999% Sigma Aldrich.
- Ácido Acético (CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H) 99.8 % Sigma Aldrich.
- Bicarbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>) 99.7% Sigma Aldrich.
- Metanol (CH<sub>3</sub>OH) 99.8% Mallinckrodt Nanogrado.
- Cloruro de sodio (NaCl) grado alimentario marca “Elefante” sal refinada-yodatada-fluorada.
- Cloruro de calcio anhidro (CaCl<sub>2</sub>) 99.9% Sigma Aldrich.
- Cloruro de aluminio anhidro (Al<sub>2</sub>Cl<sub>3</sub>) 99.9% Sigma Aldrich.

**EQUIPO**

- Espectrofotómetro UV – Visible UNICAM UV 500 THERMO SPECTRONIC acoplado a una computadora con el Software Vision 32.
- Cartuchos de extracción en fase sólida J.T. Baker modelo Bakerbond spe<sup>TM</sup> 7020-02 Octadecil C<sub>18</sub>.
- Tanque de nitrógeno grado cromatográfico marca Praxair.
- Balanza analítica Sartorius BP21057 de 210g y sensibilidad = 0.1mg.
- Potenciómetro marca Metrohm con electrodo de vidrio.
- Aparato de extracción al vacío para cartuchos de SPE J.T. Baker.

**MUESTRAS**

<b>Tabla 2. Muestras de jugos y néctares analizados con la metodología propuesta.</b>			
<b>Jugos</b>		<b>Néctares</b>	
<b>Sabor</b>	<b>Marca</b>	<b>Sabor</b>	<b>Marca</b>
Fresa	Boing	Durazno	Jumex
Manzana	Gerber	Durazno	Del Valle
Manzana	Del Valle	Frutas tropicales	Gerber
Naranja	Del Valle	Guayaba	Boing

<b>Jugos</b>		<b>Néctares</b>	
Piña	Del Valle	Guayaba	Jumex
Toronja	Sonrisa	Guayaba	Del Valle
Uva	Jumex	Mango	Del Valle
Uva	Del Valle	Manzana	Jumex
Splash naranja (zanahoria, manzana, 3 frutas tropicales y puré de mango)	Campbell's	Manzana	Del Valle
		Pera	Jumex
		8 Verduras	Campbell's
		8 Verduras	Herdez

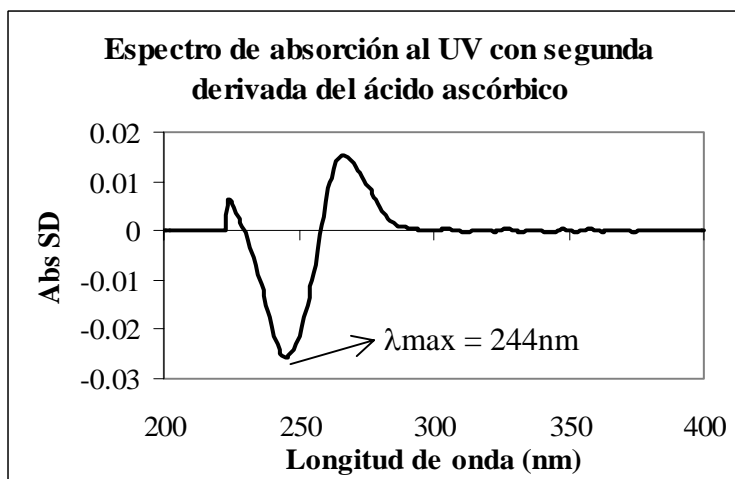
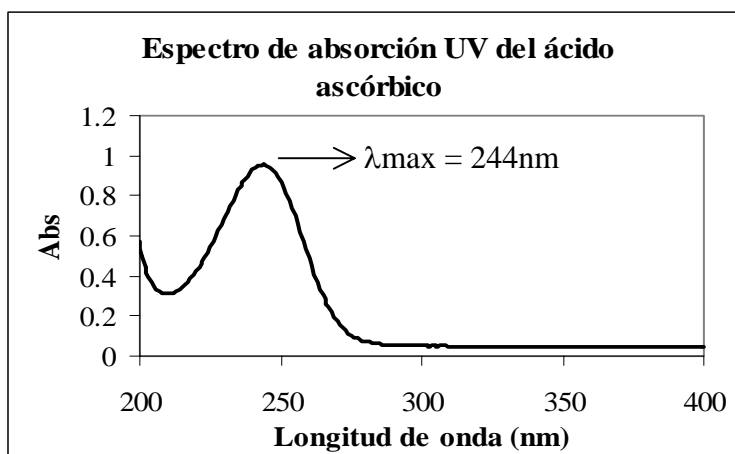
Todas las muestras fueron adquiridas en supermercados del Distrito Federal  
(Wal Mart, Carrefour y Comercial Mexicana).

## 1.- ESTUDIO ESPECTROFOTOMÉTRICO AL UV Y UV CON SEGUNDA DERIVADA DEL ÁCIDO ASCÓRBICO

### Registro de los espectros

Preparación de la solución de ácido ascórbico estándar:

1. Pesar aproximadamente 10mg de ácido ascórbico estándar
2. Llevar a 100mL con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.1M previamente burbujeado 10 min. en  $\text{N}_2$ .
3. Tomar 3mL de la solución anterior y llevarlo a 25mL con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.1M previamente burbujeado 10 min. en  $\text{N}_2$ .
4. Registrar el espectro al UV y UV con segunda derivada de esta ultima disolución.



### Realización de la curva patrón

Metodología:

- 1) Preparar una solución de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.1M y burbujear en  $\text{N}_2$  durante 10min. ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  tratado)
- 2) Preparar una solución madre de la siguiente manera: Pesar aproximadamente 10mg de ácido ascórbico estándar y disolverlo en 100mL con la solución de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.1M tratada

- 3) Tomar 1, 2, 3, 4 y 5mL de la solución madre y llevar cada uno a 25mL con solución de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.1M tratada, estas disoluciones se preparan por duplicado.
- 4) Filtrar cada solución utilizando un cartucho de extracción en fase sólida  $\text{C}_{18}$ .
- 5) Registrar por triplicado la absorbancia al UV con segunda derivada de cada solución.
- 6) Trazar una gráfica de absorbancia al UV con segunda derivada vs concentración y calcular la regresión lineal.

### **Linealidad del sistema**

Esta prueba se realiza preparando 5 soluciones estándar con un duplicado cada una de ácido ascórbico en ácido sulfúrico 0.1M previamente burbujeado en  $\text{N}_2$ , teniendo concentraciones dentro del intervalo de  $4.5 \times 10^{-3}$  a  $3.6 \times 10^{-2}$  mg/mL. Cada solución se leyó al UV con segunda derivada por triplicado obteniéndose la curva patrón, la cual se sometió a pruebas estadísticas para comprobar que tiende a ser lineal y tiende al origen.

Para la preparación de la curva patrón utilizada en este caso se pesaron 13mg de ácido ascórbico estándar y se disolvieron en 100mL con la solución de ácido sulfúrico 0.1M tratada, esta solución la llamamos solución madre. Finalmente se toman 1, 2, 3, 4 y 5mL de la solución madre y se aforan a 25mL cada uno con ácido sulfúrico 0.1M tratado, obteniendo 5 diluciones de las siguientes concentraciones:  $4.5 \times 10^{-3}$ ,  $9.0 \times 10^{-3}$ ,  $1.36 \times 10^{-2}$ ,  $1.81 \times 10^{-2}$  y  $2.26 \times 10^{-2}$  mg/mL.

### **Precisión del sistema**

La precisión del sistema se determinó preparando 8 soluciones estándar de ácido ascórbico de  $1.34 \times 10^{-2}$  mg/mL, leyendo cada una por triplicado al UV con segunda derivada. Para lo cual se preparó una solución madre de 12mg de ácido ascórbico estándar aforados a 100mL con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.1M tratado. De la solución madre se tomaron 3mL y se aforaron a 25mL con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.1M tratado, este último paso se hizo 8 veces para tener 8 soluciones de la misma concentración.



## 2.- PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Se encuentra publicada en la bibliografía ((Ramírez Maya E. M., *Nuevo método por espectrofotometría UV con segunda derivada para la determinación de ácido ascórbico en jugos de fruta procesados*, Tesis de licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México, D.F., 2002, p. 62-64) la siguiente metodología para la extracción del ácido ascórbico en jugos:

1. Agitar el jugo y abrirlo.
2. Tomar el jugo con una pipeta volumétrica de 5mL y transferirlo a un matraz aforado de 25mL.
3. Llevar al aforo con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1M tratado y mezclar.
4. Filtrar por el cartucho de C<sub>18</sub> previamente activado. Introducir aproximadamente 3mL del jugo en el cartucho de C<sub>18</sub> y con una jeringa de 5mL 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 5ml de jugo diluido y se recolecta.

Este método resulta poco eficiente para muestras con alto contenido de sólidos como lo son los néctares. Esto se debe a que el tiempo del filtrado dependiendo de la muestra puede ser hasta de 45min., lo que causa problemas en la determinación cuantitativa del ácido ascórbico, ya que éste se descompone antes de su análisis; por esta razón en este trabajo se pretende optimizar este método para aplicarlo a todo tipo de jugos y néctares para lo cual se trabajará sobre los siguientes puntos:

- Eliminar las pectinas presentes en las muestras.
- Extraer el color de las muestras con adsorbentes.
- Mejorar la extracción en fase sólida cambiando el disolvente utilizado y carga del cartucho.
- Trabajar en la estabilización de los filtrados.

### **Separación de pectinas:**

Los jugos y néctares contienen pectinas, cuándo éstas precipitan dan turbidez al jugo al mismo tiempo de arrastrar los sólidos presentes en ellos. Por este motivo se comenzaron a realizar pruebas para precipitar las pectinas y facilitar la filtración del jugo o néctar.

Las pectinas precipitan en presencia de disolventes orgánicos como el metanol, y lo hacen también con soluciones salinas. Teniendo en mente esta propiedad, se pensó en utilizar metanol, cloruro de sodio, cloruro de calcio y cloruro de aluminio para hacerlas precipitar. A estas pruebas se les llamó métodos químicos, y los resultados se muestran a continuación:

## Métodos químicos:

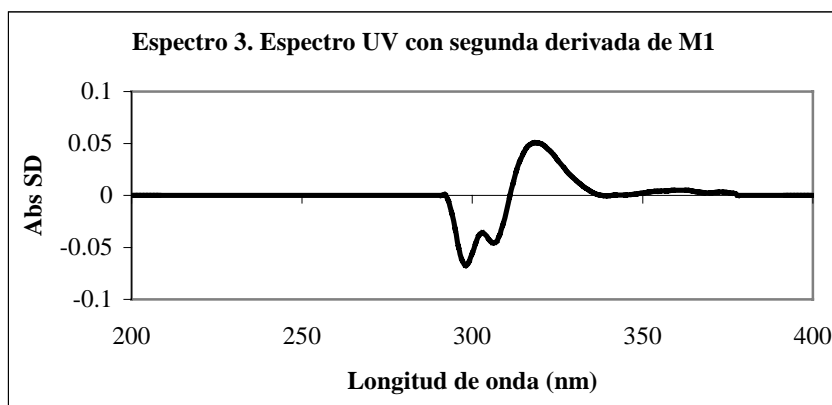
### 1. Precipitación de pectinas con metanol

Se toman aproximadamente 10mL de néctar y se agrega metanol hasta lograr la formación de un gel.

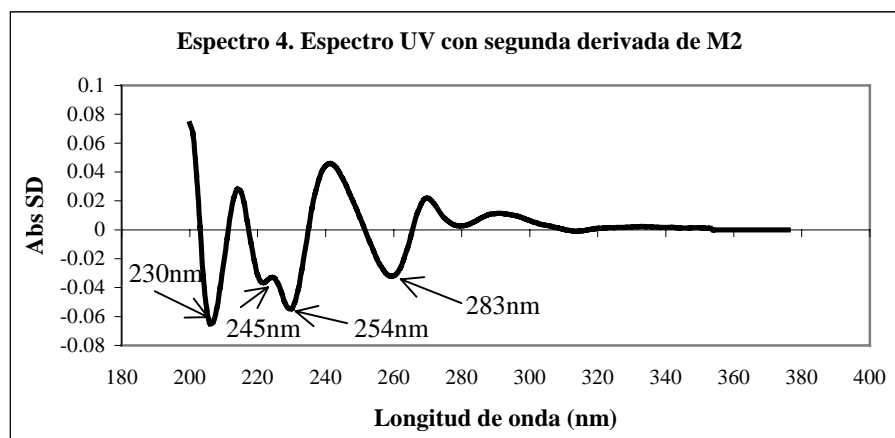
Se filtra el néctar precipitado y se obtienen dos fases:

- M1: Una fase líquida a la cual se le registra su espectro al UV con segunda derivada.
- M2: Una fase sólida o gel el cual se lava con agitación magnética M2 y se registra su espectro al UV con segunda derivada.

Espectros UV con segunda derivada obtenidos:



Con este procedimiento se logran precipitar las pectinas, mejorando con mucho la filtración del néctar (10 a 15 segundos), pero como se puede ver, no hay una banda de absorción en 244nm, longitud de onda en la que se encuentra la banda de absorción del ácido ascórbico, lo que indica la ausencia del analito, lo que se comprobó porque presentó negativa la prueba a la gota con  $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]^{+2}$  (esta prueba consiste en la formación de un precipitado blanco que se forma agregando  $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]^{+2}$  a una solución que contenga ácido ascórbico). Se concluye que la vitamina C queda retenida en las pectinas.



Después de lavar el gel se registró el espectro UV con segunda derivada del agua de lavado, y como se observa en el espectro 4, con el lavado se extrajeron varios compuestos presentes en la muestra, uno de ellos es el que se encuentra a 230nm, y el otro a 283nm. En el espectro aparece una banda de absorción del ácido ascórbico a 245nm (se comprobó que esta banda correspondía al ácido ascórbico realizando una adición, lo que provocó un aumento en el tamaño de la señal a 245nm). La banda a 245nm del espectro 4 es muy pequeña y se encuentra sobrepuesta con una banda de otra sustancia que está en mayor concentración y que absorbe a 254nm, por esto no podemos cuantificar la vitamina C de esta manera ya que se extrae en muy poca cantidad del gel y no es cuantificable bajo estas condiciones.

## 2. Precipitación de pectinas con soluciones salinas.

### Precipitación de pectinas con NaCl.

Se prepararon varias soluciones de NaCl en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1M tratado a las concentraciones siguientes: 2%, 10%, 20%, 30% y 50% (v/v).

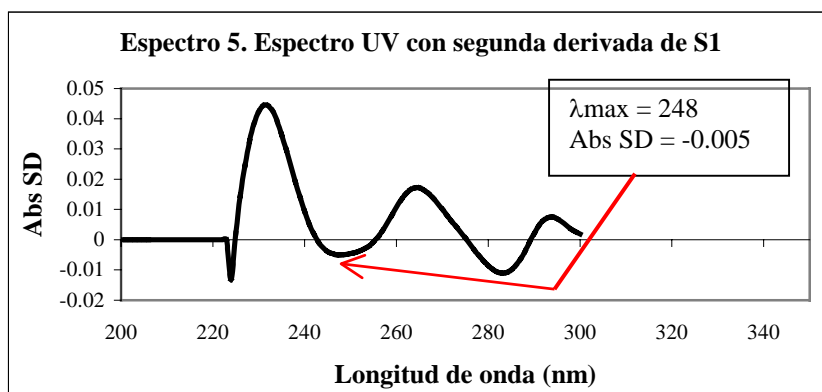
Se tomó un volumen de néctar y se agregó cada solución salina tratando de precipitar las pectinas del néctar. El resultado de lo anterior fue que las pectinas no precipitaron con soluciones de NaCl.

### Precipitación de pectinas con CaCl<sub>2</sub>.

Se prepara una solución al 2% de CaCl<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> tratado.

Se toma un volumen de néctar y se agrega esta solución hasta lograr la precipitación de las pectinas. Se separan por filtración las dos fases:

- S1: A la fase líquida se le registra su espectro al UV con segunda derivada.
- S2: La fase sólida se lava por diferentes métodos: agitación magnética S2a y ultrasonido S2b, se registra su espectro al UV con segunda derivada.



Al filtrar el precipitado se obtiene una solución en la que la cantidad de ácido ascórbico es muy pequeña, lo cual se puede observar en el espectro al UV con segunda derivada de S1, ya que tiene una banda de absorción a 248nm con una absorbancia de  $-0.005$  que es muy baja ya que la esperada era de  $-0.034$  aproximadamente.

Cálculo para obtener la concentración de ácido ascórbico esperada en la muestra:

Concentración reportada en la etiqueta:  $51\text{mg}/240\text{mL}$  de ácido ascórbico =  $0.2125\text{mg}/\text{mL}$

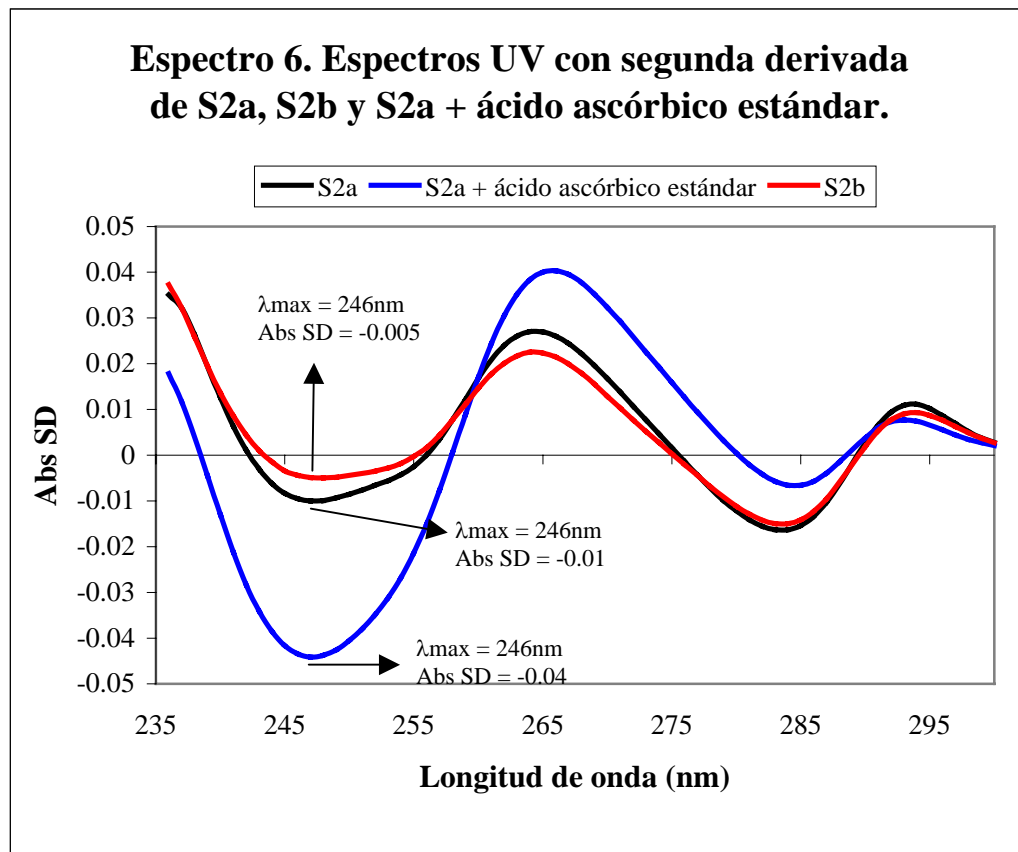
$$\frac{(5\text{mL de néctar})(0.2125\text{mg} / \text{mL})}{50\text{mL disolución}} = 0.02125\text{mg} / \text{mL}$$

Si la curva patrón dice:  $y = 1.6425 (\text{mL}/\text{mg}) x$ , (ver página 61), entonces:

$$y = (1.6425 \text{ mL}/\text{mg})(0.02125\text{mg}/\text{mL}) = 0.0349$$

La absorbancia esperada para una concentración de  $0.02125\text{mg}/\text{mL}$  es de  $0.0349$ .

Después de lavar el precipitado por agitación magnética y por ultrasonido, se logra extraer una pequeña parte de la vitamina C retenida en el precipitado de pectatos cálcicos, como se muestra en los espectros siguientes:



Observamos que se extrajo mayor cantidad de ácido ascórbico lavando por agitación magnética (S2a) que lavando por ultrasonido (S2b), pero aún así la mayor cantidad de ácido ascórbico extraída tuvo una absorbancia de  $-0.01$  que es la tercera parte de lo esperado ( $-0.0349$ ).

Por esta razón se concluye que precipitando las pectinas con cloruro de calcio no se logra determinar cuantitativamente el analito.

### Precipitación de pectinas con $\text{AlCl}_3$ .

Se realiza el mismo procedimiento que para la precipitación de pectinas con  $\text{CaCl}_2$ , pero ahora utilizando una solución salina al 2% de  $\text{AlCl}_3$ .

Los resultados obtenidos utilizando cloruro de aluminio fueron los mismos que utilizando cloruro de calcio. Con lo que se comprobó que los métodos no servían para las muestras a trabajar por lo que se procedió a eliminar las pectinas presentes en los néctares utilizando métodos físicos.

### Métodos físicos:

#### 1. Filtración por gravedad

Se toma un volumen del néctar y se hace una disolución con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  tratado.

La disolución se filtra por gravedad.

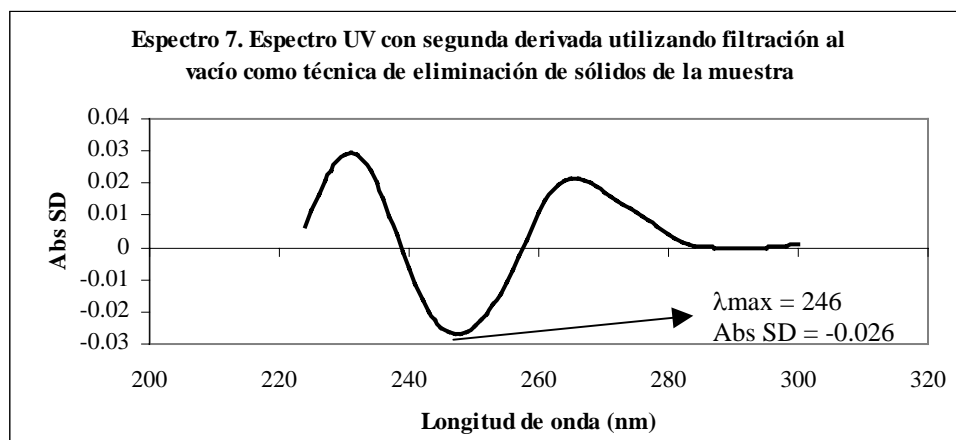
El filtrado se hace pasar por un cartucho de extracción en fase sólida  $\text{C}_{18}$ .

Se registra el espectro al UV con segunda derivada de dicha solución.

Este método si logra determinar cuantitativamente el ácido ascórbico en la muestra, pero es muy tardado ya que el filtrado lleva entre 30 y 45min. dependiendo de la muestra.

#### 2. Filtración al vacío

Se sigue la misma metodología que en la filtración por gravedad, sólo que ahora se filtra utilizando el vacío.



En este caso el resultado es el mismo que en el caso anterior, mejorando muy poco el tiempo de filtración (15 a 20min.) con lo que se procede a utilizar otro método.

### 3. Congelación

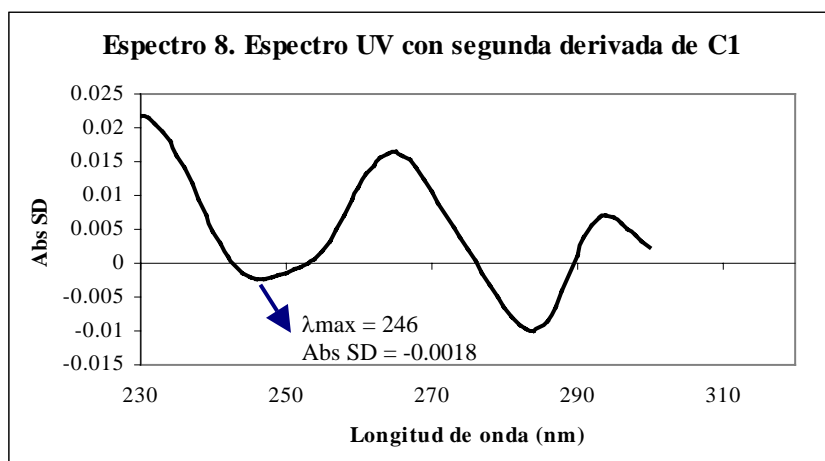
Se congela una muestra de néctar sin abrir.

Se deja descongelar el néctar a temperatura ambiente obteniéndose la separación del néctar en dos fases: una que contiene muchos sólidos de fruta y otra que no presenta sólidos de fruta.

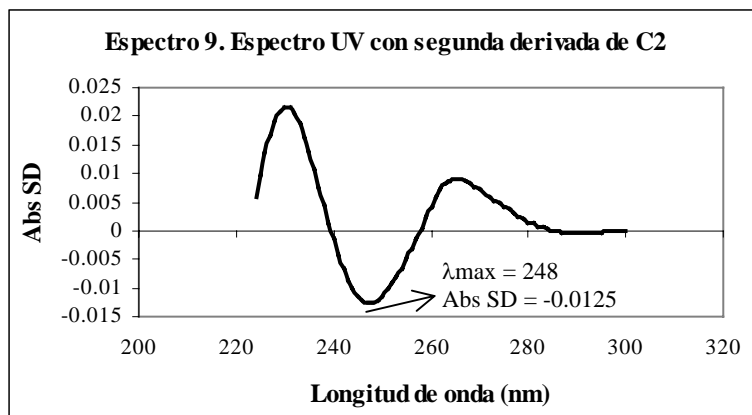
Se recolecta la fase libre de sólidos de fruta ó sobrenadante y se hace una disolución con  $H_2SO_4$  tratado.

De aquí dividiremos la disolución en 2 partes:

- C1: Se registra el espectro de absorción al UV con segunda derivada.
- C2: Se hace pasar por un cartucho de extracción en fase sólida de  $C_{18}$  y después se registra el espectro de absorción al UV con segunda derivada.



En el espectro 8 se obtuvo una banda de absorción a 246nm, pero la absorbancia de éste es muy baja (-0.0018, esperada -0.02). Este resultado nos indica que en el sobrenadante del néctar congelado está presente el ácido ascórbico, pero en menor cantidad que en el precipitado del néctar. De nuevo se realiza la prueba a la gota para formar el precipitado blanco y comprobar la presencia del analito. Realizando la prueba anterior comprobamos que esta solución sí tiene ácido ascórbico, ya que al agregar el  $[Cu(NH_3)_4]^{+2}$  se da la formación abundante del precipitado blanco.



En este caso se observa claramente una banda de absorción a 248nm, lo cual confirma la presencia del ácido ascórbico en el sobrenadante, y al comparar el espectro de C1 con el de C2, se puede ver que a pesar de ser el mismo sobrenadante, el hecho de pasar por el cartucho C<sub>18</sub> logra que se observe una banda con mayor absorción (Sin pasar por C<sub>18</sub> = -0.0018, al pasar por C<sub>18</sub> = -0.0125), con esto se observa que el sobrenadante sí tiene ácido ascórbico, pero existe alguna sustancia presente en él que impide su absorción al UV.

A este filtrado C2, se le agregó metanol antes y después de pasarlo por el cartucho C<sub>18</sub>, para saber si el cartucho retenía las pectinas. El resultado de lo anterior, fue que al agregar metanol antes de pasar por el cartucho la solución se enturbió formando un gel característico de las pectinas. Mientras que este gel no se formó cuando se agregó metanol al filtrado pasado por C<sub>18</sub>. Observado se puede concluir que el ácido ascórbico necesita estar libre de pectinas para poder absorber radiación UV.

Lo que demuestra que el uso del cartucho C<sub>18</sub> además de eliminar la presencia de color en las muestras también retiene a las pectinas, logrando dejar libre en solución al ácido ascórbico y listo para su cuantificación al UV con segunda derivada.

La congelación es una metodología de preparación de muestra que sirve para determinar la presencia de ácido ascórbico en muestras de néctares por espectrofotometría UV con segunda derivada pero no para su cuantificación.

#### 4. Centrifugación

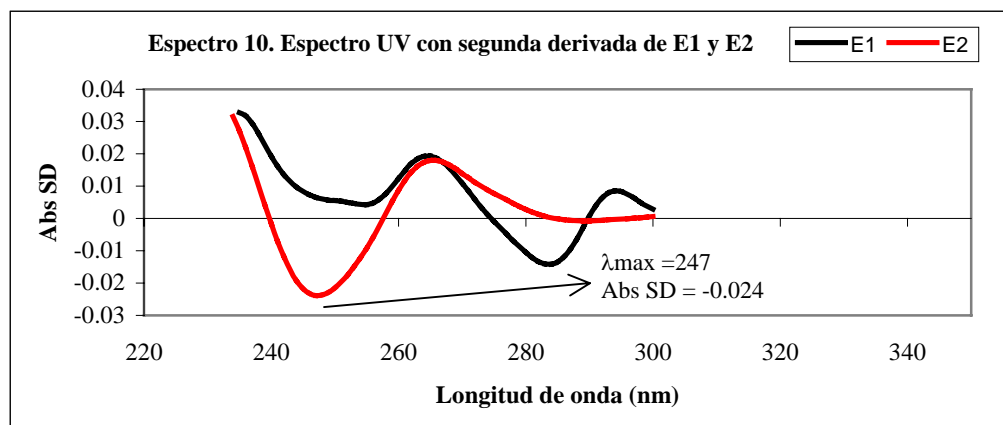
Se toma una muestra de néctar y se centrifuga durante 5 min. a 3500rpm.

Se recolecta el sobrenadante y se hace una disolución con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> tratado.

De aquí se divide la disolución en 2 partes:

- E1: Se registra el espectro de absorción al UV con segunda derivada.

- E2: Se hace pasar por un cartucho de extracción en fase sólida C<sub>18</sub> y después se registra el espectro de absorción al UV con segunda derivada.



Los espectros que se observan arriba muestran que el ácido ascórbico no absorbe radiación UV cuando está en una solución con pectinas (espectro E1). Al retirar las pectinas de la solución, utilizando el cartucho de extracción en fase sólida C<sub>18</sub>, la vitamina C puede absorber radiación UV (espectro E2).

Se prueban varios tiempos de centrifugado para saber cuál es el mejor para la extracción cuantitativa de la vitamina C.

<b>Tabla 3. Resultados de diferentes tiempos de centrifugación para la preparación de muestra</b>		
<b>Tiempo (min)</b>	<b>Abs SD</b>	<b>Ác. Ascórbico (mg/250mL néctar)</b>
1	No se separan los sólidos	-
3	El cartucho se satura muy rápidamente	-
5	-0.0239	38.13
10	-0.0239	38.13
15	-0.0239	38.13
20	-0.0240	38.29

La extracción de ácido ascórbico fue eficiente a partir de los 5 min. y fue constante hasta los 15min. Centrifugando 20min. se logra extraer un poco más de ácido ascórbico, pero la diferencia es tan pequeña que se decide hacer la centrifugación durante 5min. para separar los sólidos de las muestras y extraer cuantitativamente el analito.

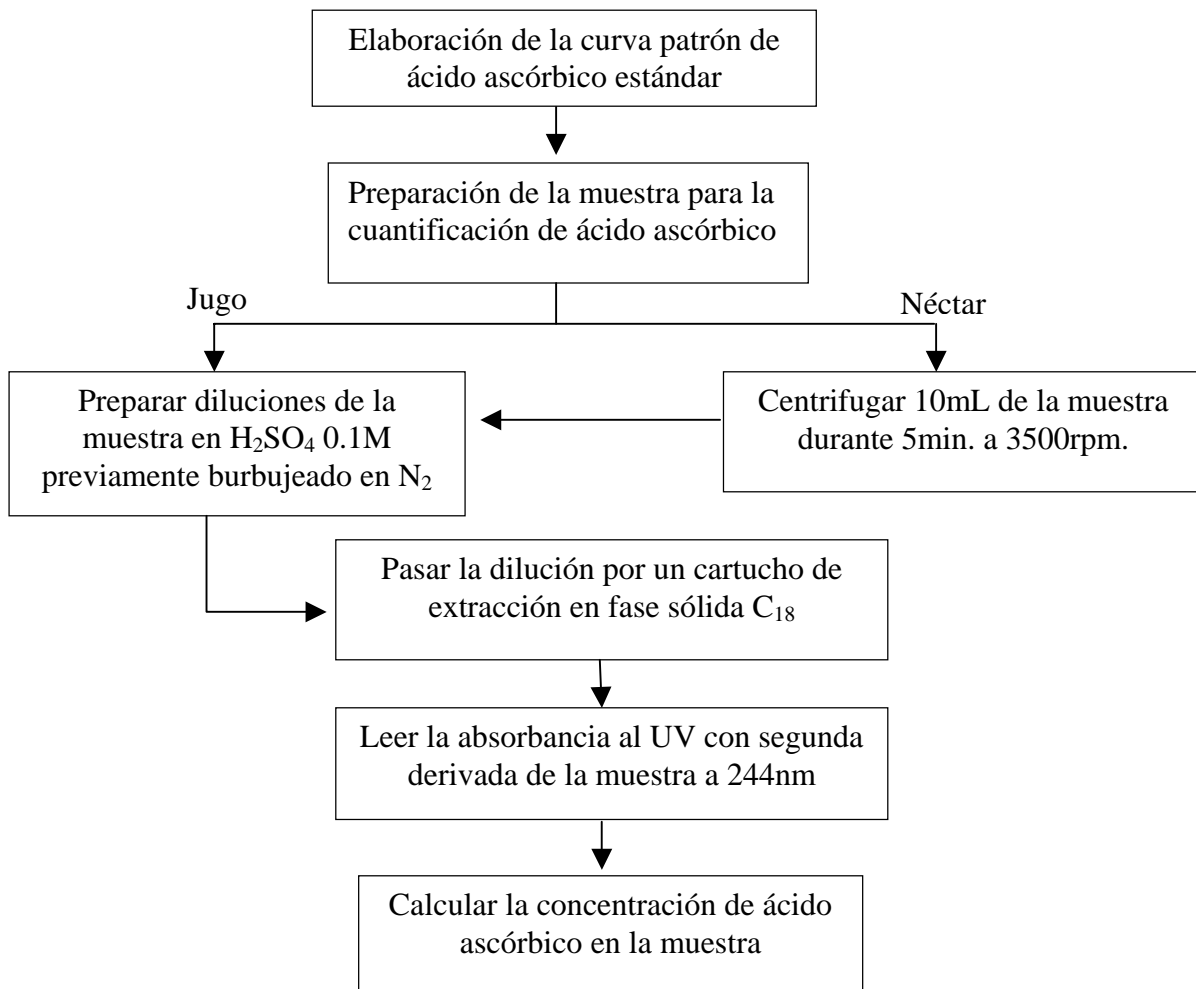


**3.- DETERMINACIÓN CUANTITATIVA AL UV CON SEGUNDA DERIVADA DE ÁCIDO ASCÓRBICO EN JUGOS Y NÉCTARES**

**Metodología de trabajo:**

- 1) Elaborar una curva patrón de ácido ascórbico estándar que vaya de  $5.68 \times 10^{-3}$  a  $3.4 \times 10^{-2}$  mg/mL.
- 2) Si la muestra es un néctar, centrifugarlo 5min. a 3500rpm.
- 3) Hacer una disolución del jugo o sobrenadante del néctar centrifugado con  $H_2SO_4$  0.1M tratado. La concentración de ácido ascórbico de esta disolución debe quedar dentro del intervalo de concentración de la curva patrón.
- 4) Hacer pasar la disolución por un cartucho de extracción en fase sólida  $C_{18}$ .
- 5) Registrar el espectro de absorción al UV con segunda derivada.
- 6) Calcular la concentración de ácido ascórbico.

**Diagrama de flujo:**



**APLICACIÓN DEL MÉTODO PROPUESTO A MUESTRAS COMERCIALES**

Se determinó la concentración de ácido ascórbico en diferentes muestras de jugos y néctares del mercado, utilizando la metodología propuesta. Las muestras analizadas fueron las que se mencionan en la parte de muestras (pag. 30).

Las muestras consideradas como jugos y néctares claros en este trabajo, engloban a los jugos y néctares de color amarillo y rosa, ya que éstas tienen una coloración fácil de eliminar al pasarlas por el cartucho C<sub>18</sub>, del cual sólo se requiere utilizar uno con capacidad de 3mL para el análisis de cada muestra.

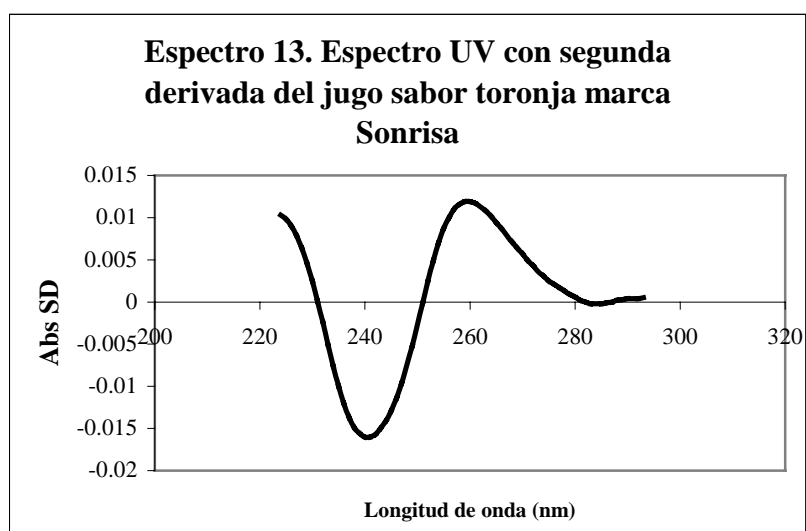
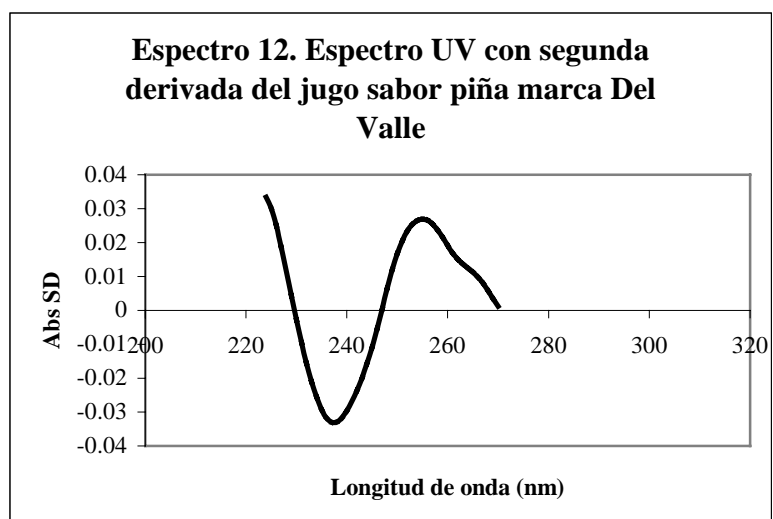
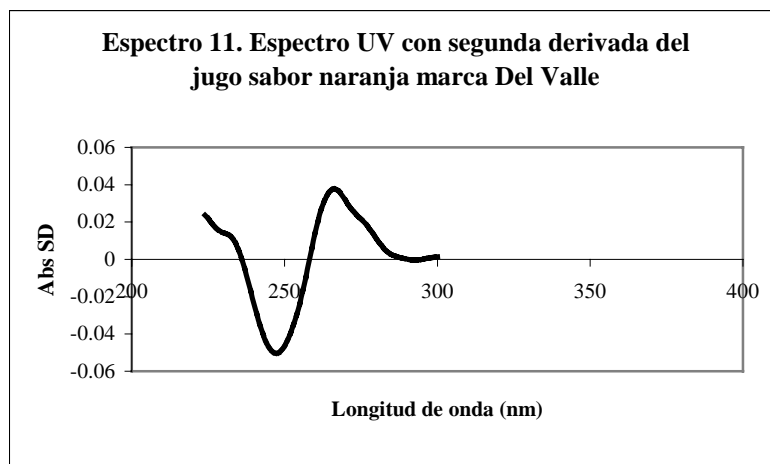
Los jugos y néctares que en este trabajo se clasifican como oscuros, son aquellos que tienen color uva, caramelo, rojo y naranja. Esto se consideró así ya que la eliminación del color en este tipo de muestras requiere el uso de más de un cartucho de extracción en fase sólida C<sub>18</sub> con capacidad de 3mL, varía de dos a 3 cartuchos según la muestra, logrando eliminar el color de las muestras satisfactoriamente.

**APLICACIÓN DEL MÉTODO POR UV CON SEGUNDA DERIVADA EN JUGOS CLAROS**

Los jugos que en este trabajo son considerados como claros y se encontraron en mayor cantidad en el mercado fueron los siguientes:

<b>Tabla 4. Muestras de jugos claros y su concentración de ácido ascórbico</b>		
<b>Sabor</b>	<b>Marca</b>	<b>Conc. Ác. Ascórbico (mg/100mL)</b>
Naranja	Del Valle	30.97
Pina	Del Valle	10.16
Toronja	Sonrisa	24.63

A continuación se muestra el espectro UV con segunda derivada de cada muestra de jugo claro analizada por el método propuesto:



En los espectros al UV con segunda derivada de estos jugos, las bandas de absorción a 244nm están bien definidos, ya que en todos se encuentra una única banda a esta longitud de

onda. Algunas  $\lambda_{max}$  se mueven un poco, en vez de estar en 244nm a veces suben hasta 246 dependiendo del pH y de la composición de la muestra analizada.

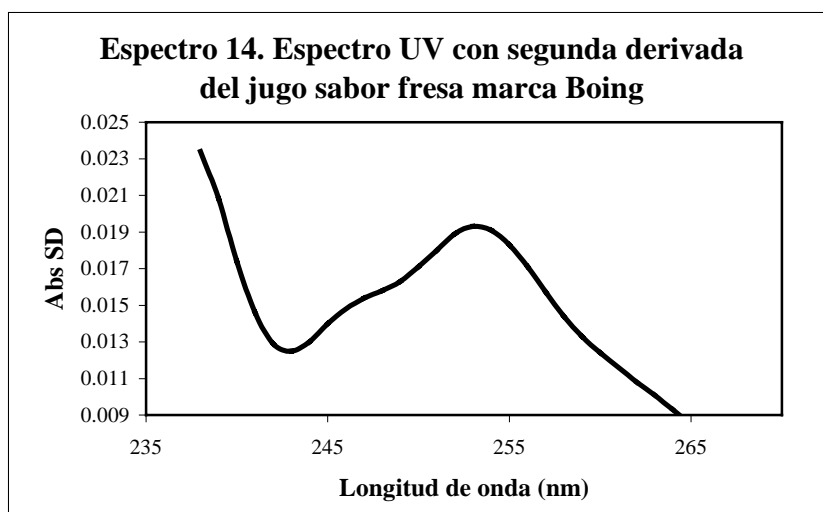
Es muy importante recalcar que este análisis se debe realizar lo más rápido posible (no dejar pasar más de 30min. desde abierto el jugo hasta introducirlo al equipo de UV para obtener el espectro correspondiente), esto es para evitar la oxidación del ácido ascórbico el cual se oxida rápidamente al abrir las muestras de jugo o néctar y entrar en contacto con el oxígeno del aire.

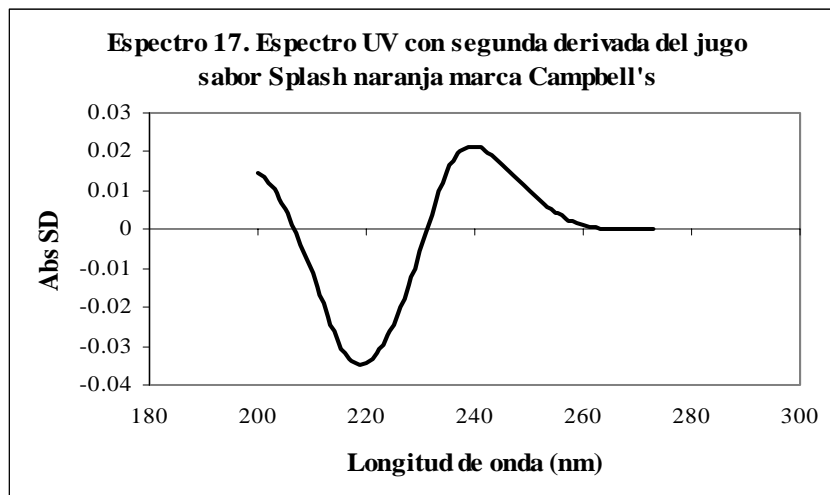
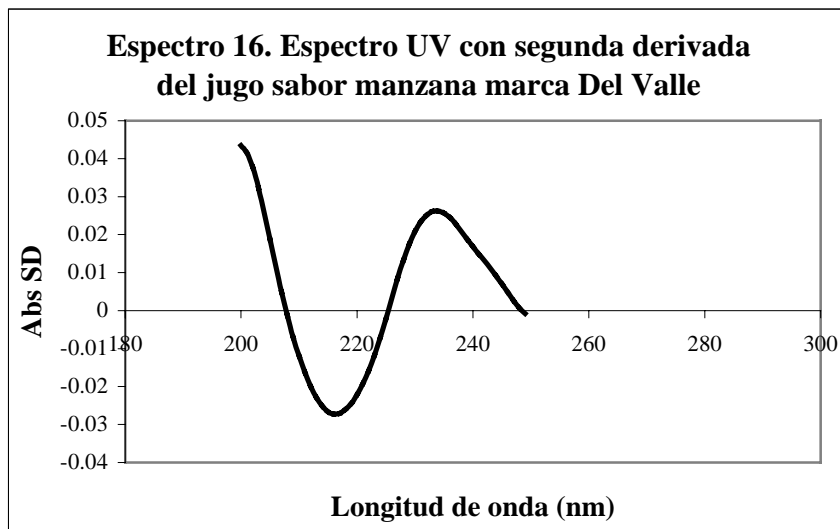
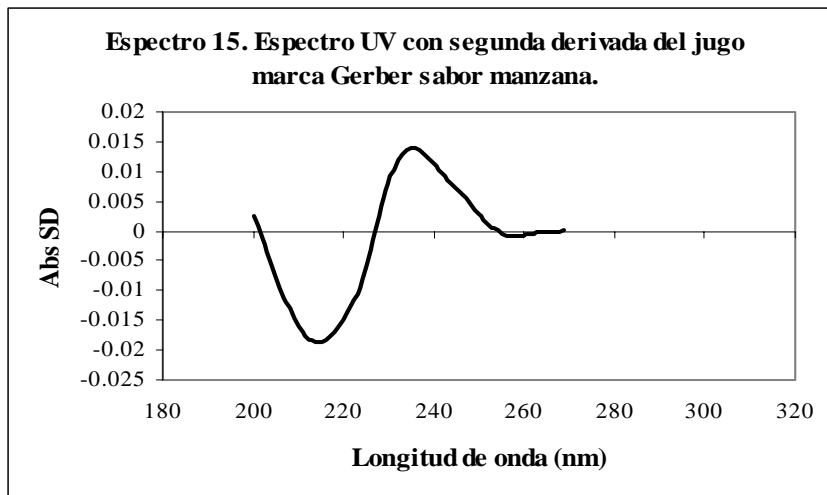
**APLICACIÓN DEL MÉTODO POR UV CON SEGUNDA DERIVADA EN JUGOS OSCUROS**

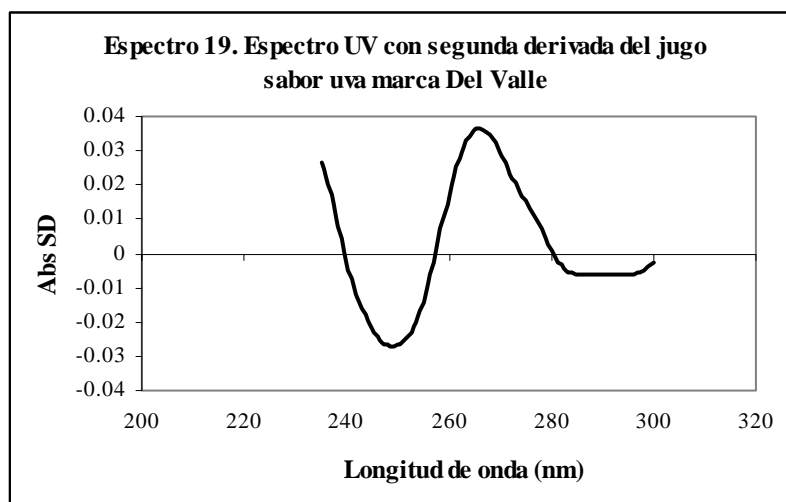
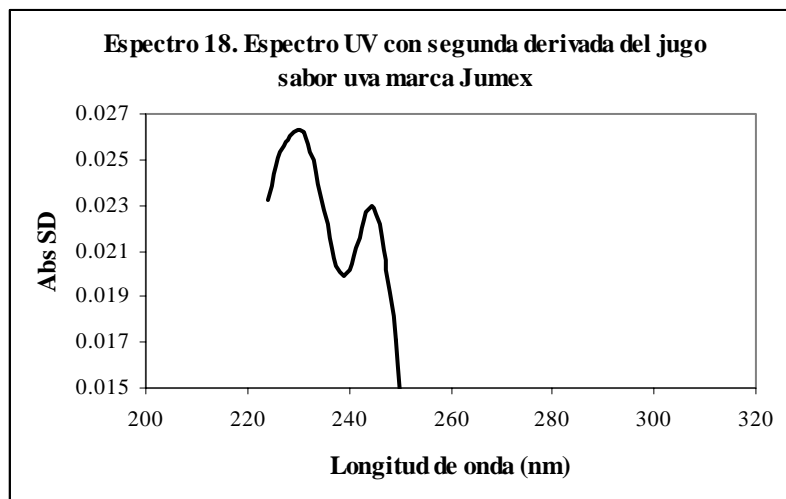
Los jugos que en este trabajo son considerados como oscuros y se encontraron en mayor cantidad en el mercado fueron los siguientes:

<b>Tabla 5. Muestras de jugos oscuros y su concentración de ácido ascórbico</b>		
<b>Sabor</b>	<b>Marca</b>	<b>Conc. Ác. Ascórbico (mg/100mL)</b>
Fresa	Boing	1.92
Manzana	Gerber	32.22
Manzana	Del Valle	4.20
Splash naranja	Campbell's	53.41
Uva	Jumex	6.13
Uva	Del Valle	4.60

A continuación se muestra el espectro UV con segunda derivada de cada muestra de jugo oscuro analizada por el método propuesto:







Los espectros UV con segunda derivada de los jugos oscuros tuvieron bandas definidas en 244-246nm, salvo el jugo de fresa marca Boing, cuya banda de absorción a 244nm es muy pequeña, pero a pesar de su tamaño la absorbancia que tiene es coherente con el valor que reportó el fabricante del jugo en la etiqueta.

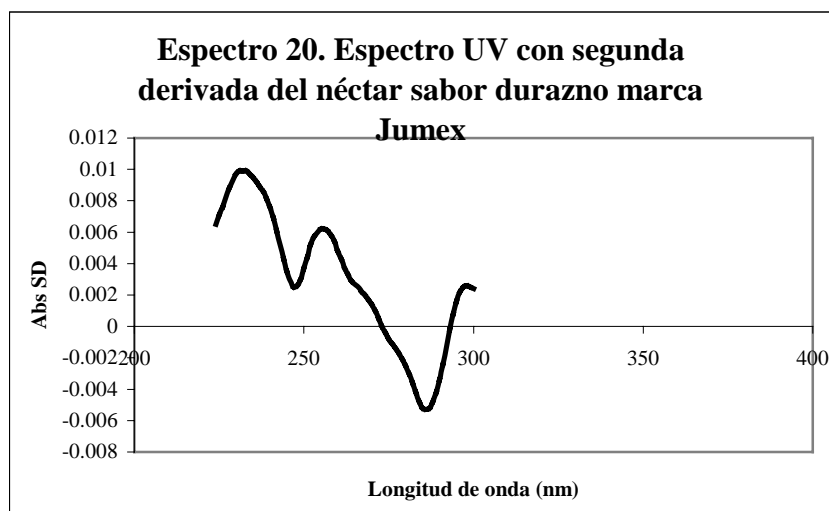
#### **APLICACIÓN DEL MÉTODO POR UV CON SEGUNDA DERIVADA EN NÉCTARES CLAROS**

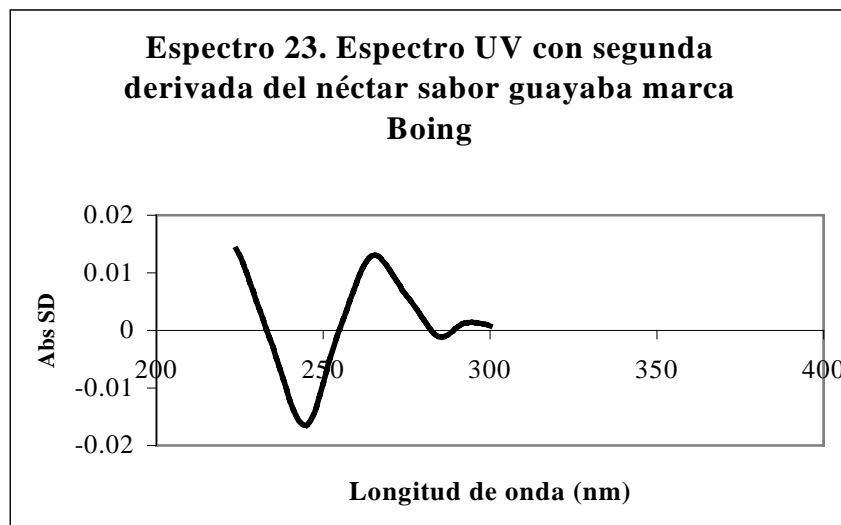
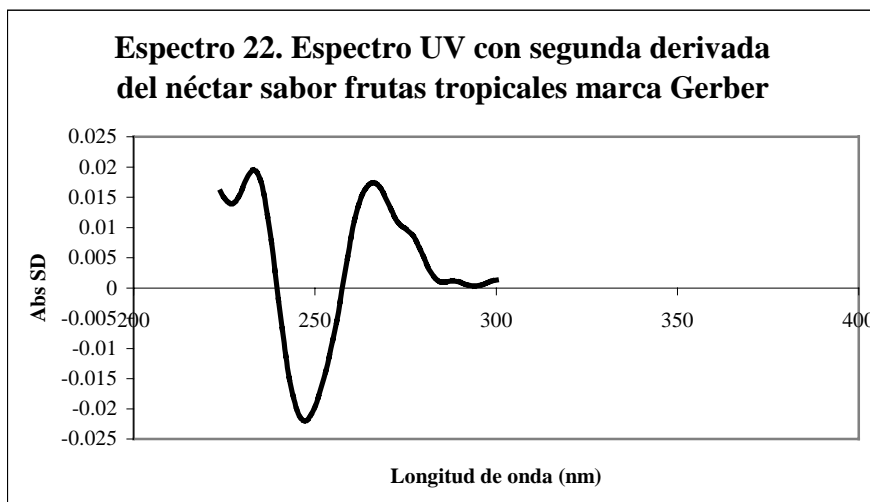
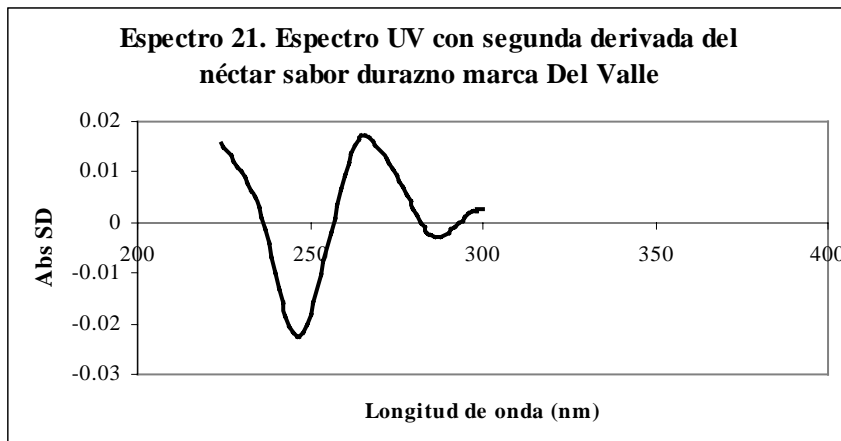
Los néctares considerados como claros en este trabajo y que se encuentran en mayor cantidad en el mercado se muestran a continuación:

**Tabla 6. Muestras de néctares claros y su concentración de ácido ascórbico**

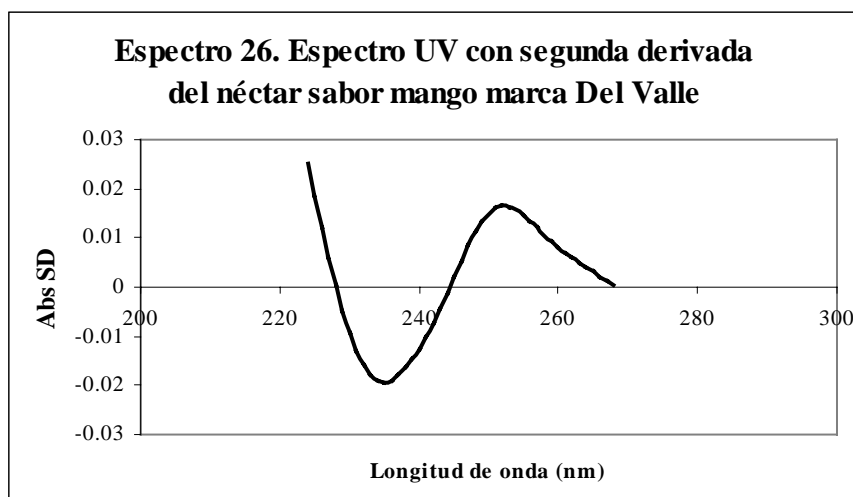
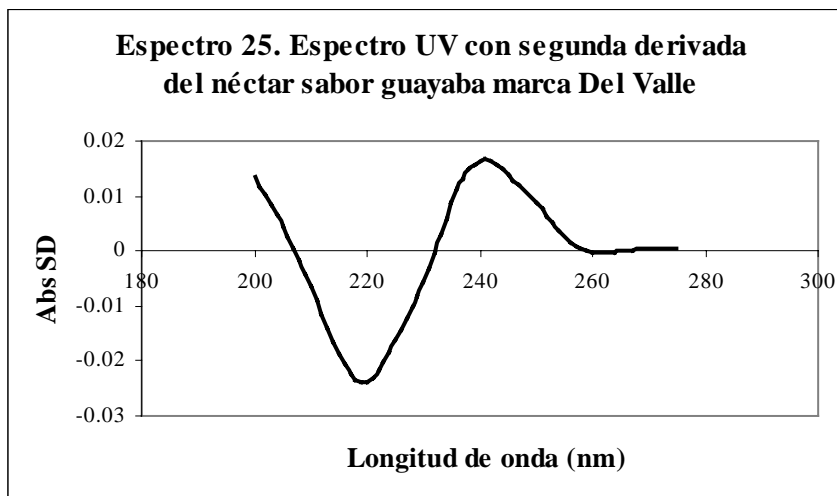
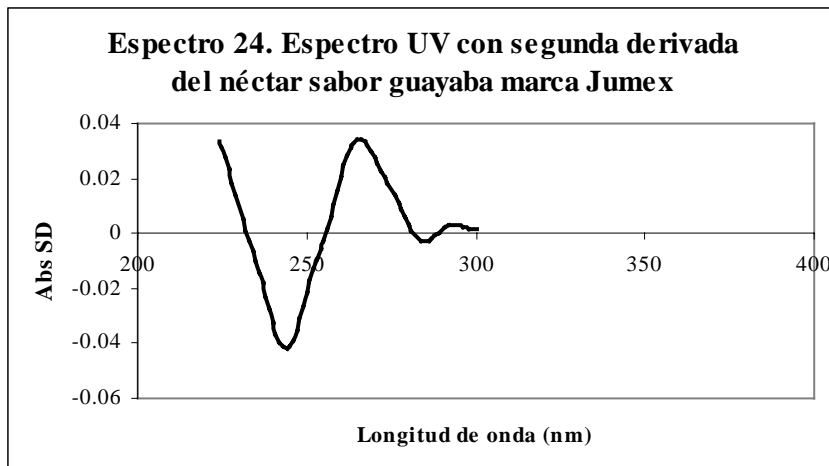
Sabor	Marca	Conc. Ác. Ascórbico (mg/100mL)
Durazno	Jumex	1.79
Durazno	Del Valle	13.91
Frutas tropicales	Gerber	22.57
Guayaba	Boing	16.93
Guayaba	Jumex	25.73
Guayaba	Del Valle	35.55
Mango	Del Valle	12.01
Manzana	Jumex	2.15
Manzana	Del Valle	16.25
Pera	Jumex	1.54

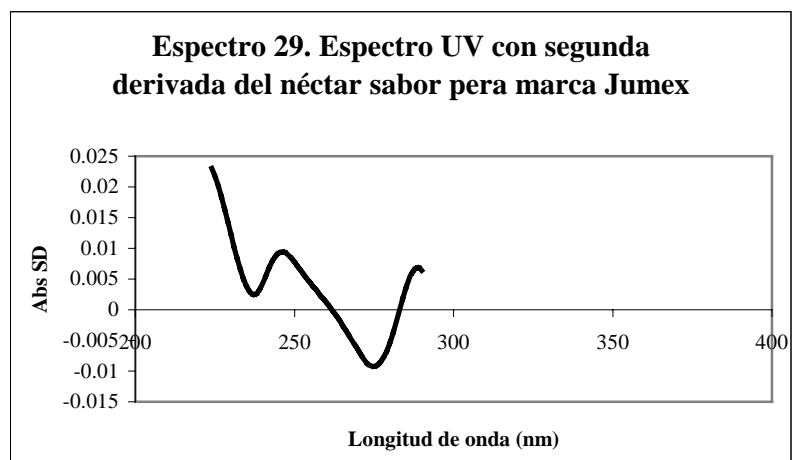
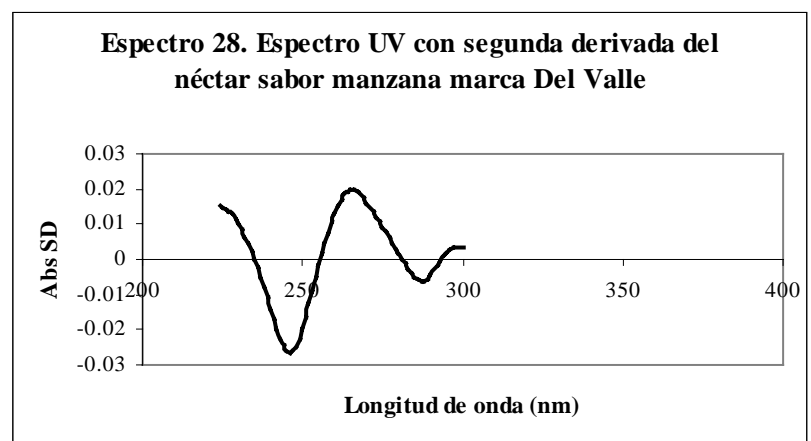
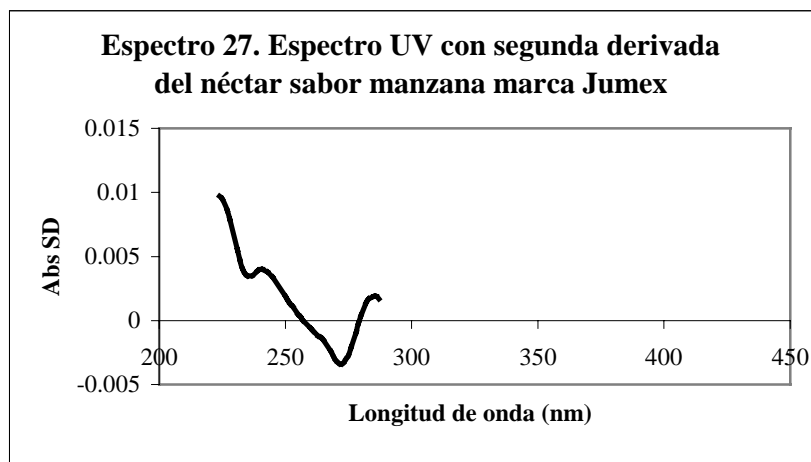
A continuación se muestra el espectro UV con segunda derivada de cada muestra de néctar claro analizada por el método propuesto:











Todos los espectros UV con segunda derivada obtenidos de estas muestras, (salvo el néctar de manzana marca Jumex), son claros y presentan bandas de absorción bien definidas de 244 a 246nm. El único inconveniente que se tuvo fue la muestra de néctar de manzana marca Jumex, ya que se observa la banda de absorción a 244nm dentro de una banda de absorción más grande a 287nm la cual opaca la banda del ácido ascórbico que aparece dentro de ésta. De

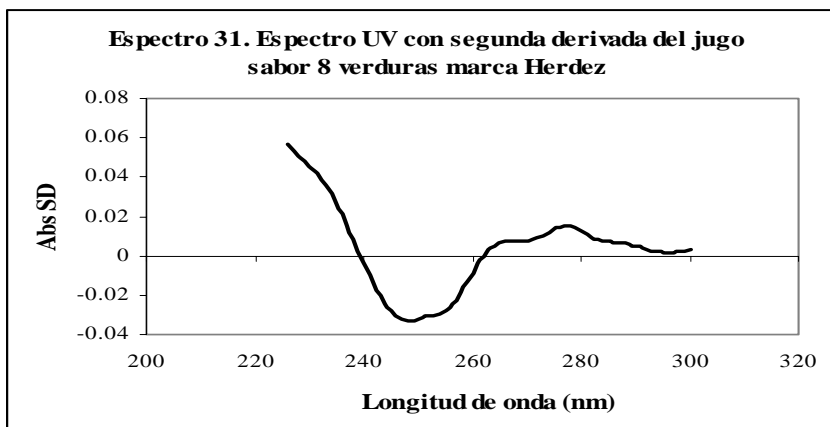
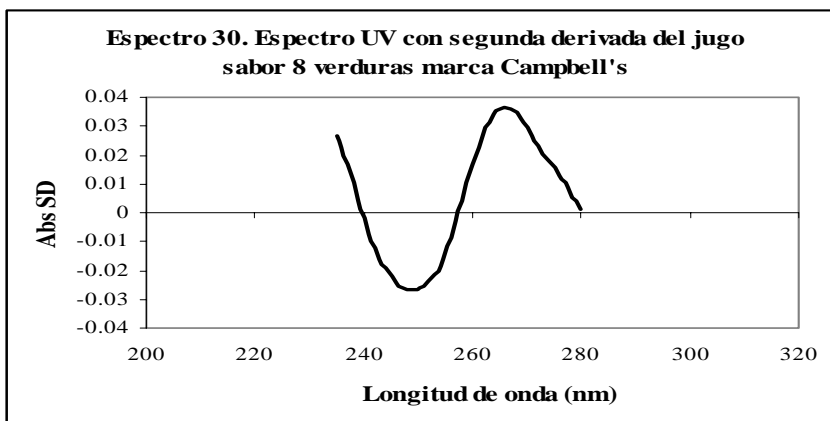
cualquier manera se tomó el valor de absorbancia a 244nm para calcular la concentración del analito en esta muestra, pero el resultado no es muy confiable por lo anteriormente mencionado.

**APLICACIÓN DEL MÉTODO POR UV CON SEGUNDA DERIVADA EN NÉCTARES OSCUROS**

Los néctares considerados como oscuros en este trabajo y que se encuentran en mayor cantidad en el mercado son los siguientes:

<b>Tabla 7. Muestras de néctares oscuros y su concentración de ácido ascórbico</b>		
<b>Sabor</b>	<b>Marca</b>	<b>Conc. Ác. Ascórbico (mg/100mL)</b>
8 Verduras	Campbell's	16.11
8 Verduras	Herdez	33.66

A continuación se muestra el espectro UV con segunda derivada de cada muestra de néctar oscuro analizada por el método propuesto:



En este tipo de muestras la eliminación del color fue muy eficiente y se obtuvieron espectros UV con segunda derivada con bandas de absorción muy bien definidas. Quizá el único detalle que presenta el néctar marca Herdez es que la banda de absorción aparece en 253nm, esto pudo deberse a la composición de la muestra, ya que existen sustancias llamadas auxócromos que pueden modificar la longitud de onda a la que aparece una banda de absorción.

#### **4.- ESTUDIO ESTADÍSTICO DE LA METODOLOGÍA PROPUESTA**

Para realizar las pruebas comparativas del método propuesto y el método Oficial, se decidió utilizar el néctar sabor durazno marca Del Valle, ya que es una muestra clara, fácil de filtrar porque ocupa un solo cartucho de extracción en fase sólida C<sub>18</sub> y tiene una concentración de ácido ascórbico que se encuentra a la mitad de las concentraciones que se manejan en la curva patrón lo cual evita tener que realizar diluciones del néctar para su cuantificación.

##### **Precisión del método:**

##### **Repetibilidad**

Para determinar la precisión del método propuesto se realizó una prueba de repetibilidad de la siguiente manera:

Se determinó la concentración de ácido ascórbico en 8 muestras de néctar de durazno marca Del Valle lote 144 5Z3 02:57, las ocho muestras se trabajaron el mismo día con los mismos reactivos, aparatos e instrumentos. Para esta determinación se empleó la siguiente metodología: Se tomaron 10mL del néctar previamente agitado, se centrifugaron 5min., se tomaron 5mL del sobrenadante del néctar centrifugado aforándose a 50mL con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1M tratado. Esta disolución se filtra utilizando un cartucho de extracción en fase sólida de C<sub>18</sub> previamente activado con metanol. Finalmente se lee la absorbancia al UV con segunda derivada del filtrado y se calcula la concentración de ácido ascórbico en el néctar.

##### **Recobro**

Se tomaron 3 muestras de néctar de durazno marca Del Valle lote 144 5Z3 02:57 dividiendo cada una en dos partes “A” y “B”. Utilizando la metodología propuesta se determinó la concentración de ácido ascórbico en las tres partes “A” de cada una de las tres muestras, leyendo por triplicado la absorbancia al UV con segunda derivada de cada muestra (muestras sin adicionar = A).

A las otras tres partes “B” de cada una de las muestras se les adicionó una cantidad de ácido ascórbico estándar que le sumará aproximadamente 8mg/250mL a la cantidad encontrada en los néctares de durazno previamente analizados; posteriormente estas muestras adicionadas fueron procesadas mediante el método propuesto para la cuantificación de ácido ascórbico leyendo por triplicado la absorbancia al UV con segunda derivada de cada muestra de néctar (muestras adicionadas = B). Finalmente se procesaron los datos obtenidos de las muestras sin adicionar y las muestras adicionadas, obteniendo el porcentaje de recobro.

## **5.- ESTUDIO ESTADÍSTICO DEL MÉTODO OFICIAL (AOAC)**

### **Precisión del método:**

#### **Repetibilidad**

En este caso se realizó una prueba de repetibilidad aplicada al método Oficial AOAC para determinar la precisión del mismo, siguiendo la metodología que se muestra a continuación:

Se determinó la concentración de ácido ascórbico en 8 muestras de néctar de durazno marca Del Valle lote 144 5Z3 02:57, se trabajaron 2 muestras un día y al día siguiente las seis muestras restantes, utilizando los mismos reactivos, aparatos e instrumentos. Para esta determinación se empleó la siguiente metodología: Se tomaron 40mL del néctar previamente agitado, se aforaron a 100mL con la solución de extracción del método Oficial (pag. 9). Esta disolución se filtra en un embudo de vidrio de filtración rápida. Finalmente se titulan por triplicado 15mL del filtrado de cada muestra de néctar.

#### **Adición (Recobro)**

Se determinó la concentración de ácido ascórbico en 3 muestras de néctar de durazno marca Del Valle lote 144 5Z3 02:57 por la metodología del método Oficial (AOAC), titulando por triplicado cada muestra (muestras sin adicionar).

A otras tres muestras de néctar de durazno marca Del Valle del mismo lote, se les adicionó una cantidad de ácido ascórbico estándar que le sumará aproximadamente 8mg/250mL a la cantidad encontrada en los néctares de durazno previamente analizados; posteriormente estas muestras adicionadas fueron analizadas mediante el método Oficial (AOAC) para la cuantificación de ácido ascórbico titulando por triplicado cada muestra de néctar (muestras adicionadas). Finalmente se procesaron los datos obtenidos de las muestras sin adicionar y las muestras adicionadas, obteniendo el porcentaje de adición (recobro).

# **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## 1.- PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

A continuación se muestra un resumen de los resultados de las pruebas realizadas para la optimización de la preparación de muestra:

<b>Tabla 8. Resumen de los resultados de los métodos probados para establecer la metodología general del tratamiento de la muestra.</b>		
Métodos		Resultado
Precipitación de pectinas	Precipitación con metanol	Se gelifican las pectinas pero se queda retenido el ácido ascórbico en el gel formado de manera que no es cuantificable por espectroscopia.
	Precipitación con NaCl	No se precipitan las pectinas.
	Precipitación con CaCl <sub>2</sub>	Se precipitan las pectinas pero en el precipitado se queda retenido el ácido ascórbico de manera que no es cuantificable por espectroscopia.
	Precipitación con AlCl <sub>3</sub>	Se precipitan las pectinas pero en el precipitado se queda retenido el ácido ascórbico de manera que no es cuantificable por espectroscopia.
Eliminación de sólidos de por métodos físicos	Filtración por gravedad	Se eliminan los sólidos y sí se cuantifica el ácido ascórbico por espectroscopia. El filtrado es muy lento.
	Filtración al vacío	Se eliminan los sólidos y sí se cuantifica el ácido ascórbico por espectroscopia. El filtrado es muy lento.
	Congelación	Se eliminan los sólidos de fruta y sólo se cuantifica el ácido ascórbico por espectroscopia cuando se utiliza el cartucho de extracción en fase sólida, pero se tienen pérdidas de ácido ascórbico por congelación.
	Centrifugación	Se eliminan los sólidos de fruta y sólo se cuantifica el ácido ascórbico por espectroscopia cuando se utiliza el cartucho de extracción en fase sólida. Es un método rápido y no se tienen pérdidas del ácido ascórbico por centrifugación.

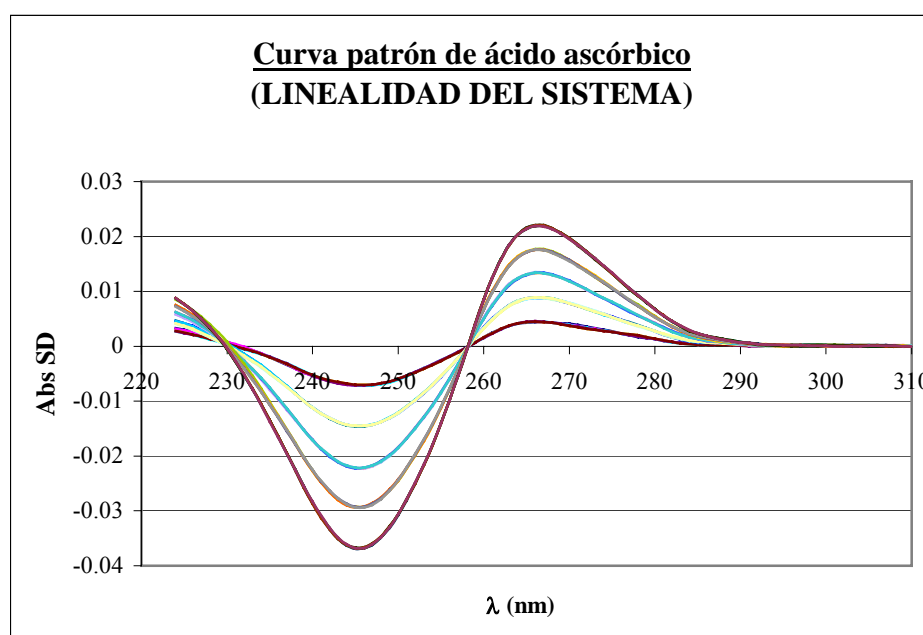


**2.- ESTUDIO ESPECTROFOTOMÉTRICO AL UV Y UV CON SEGUNDA DERIVADA DEL ÁCIDO ASCÓRBICO**

**Linealidad del sistema**

En esta prueba se pretende probar que el sistema es capaz de relacionar de una manera proporcional a la concentración de ácido ascórbico con la absorbancia al UV con segunda derivada del mismo, de manera que al graficar los valores numéricos se obtenga una línea recta con una regresión lineal mayor a 0.98.

El siguiente es el espectro UV de los datos obtenidos para la prueba linealidad del sistema, utilizados para trazar la curva patrón:

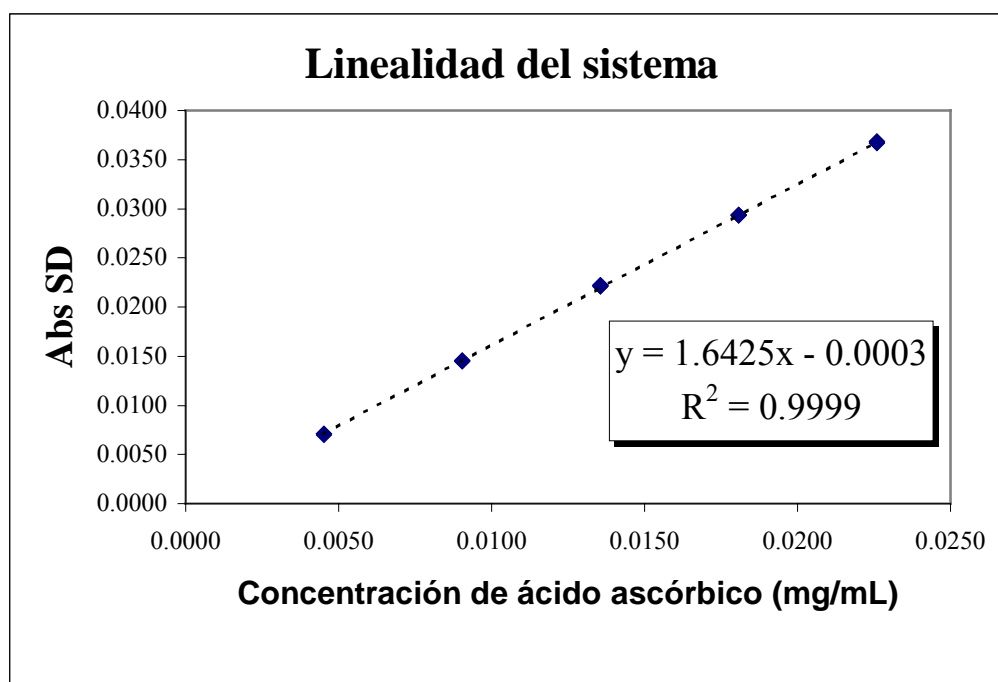


Gráfica 1. Espectros UV con segunda derivada de la curva patrón de ácido ascórbico en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1M previamente burbujeado 10min. en N<sub>2</sub>.

<b>Tabla 9. Resultados obtenidos para la prueba de linealidad del sistema</b>			
<b>mL solución madre</b>	<b>Nombre</b>	<b>Conc. (mg/mL)</b>	<b>Abs SD</b>
1	1a1	0.0045	0.0071
1	1a2	0.0045	0.0071
1	1a3	0.0045	0.0071
1	1b1	0.0045	0.0071
1	1b2	0.0045	0.0071

1	1b3	0.0045	0.0070
2	2a1	0.0090	0.0146
2	2a2	0.0090	0.0145
2	2a4	0.0090	0.0145
2	2b1	0.0090	0.0145
2	2b2	0.0090	0.0145
2	2b4	0.0090	0.0145
3	3a2	0.0136	0.0222
3	3a4	0.0136	0.0222
3	3a3	0.0136	0.0221
3	3b1	0.0136	0.0222
3	3b2	0.0136	0.0222
3	3b3	0.0136	0.0221
4	4a1	0.0181	0.0293
4	4a4	0.0181	0.0294
4	4a3	0.0181	0.0293
4	4b1	0.0181	0.0294
4	4b3	0.0181	0.0293
4	4b4	0.0181	0.0294
5	5c1	0.0226	0.0369
5	5c4	0.0226	0.0368
5	5c5	0.0226	0.0367
5	5d1	0.0226	0.0367
5	5d2	0.0226	0.0368
5	5d3	0.0226	0.0368

A continuación trazamos la gráfica de los resultados obtenidos, utilizando la concentración de ácido ascórbico y su respectiva absorbancia al UV con segunda derivada:



Gráfica 2. Curva patrón de ácido ascórbico en  $H_2SO_4$  0.1M previamente burbujeado 10min. en  $N_2$ .

De la gráfica 2, obtenemos que:

Ordenada: -0.0003

Pendiente: 1.6425 mL/mg

Coefficiente de correlación: 0.9999

El valor obtenido para la ordenada es muy pequeño y cercano a cero, por lo que se procede a realizar una prueba de hipótesis para saber si la ordenada tiende al origen:

$H_0: b = \beta$ , donde  $\beta = 0$

$H_1: b \neq \beta$

Para realizar esta prueba utilizamos el estadístico “t de student” fijando como nivel de significancia 95% ( $\alpha = 0.05$ ) y 28 grados de libertad (n-2).

$$t_{cal} = \frac{b - \beta}{Se} \sqrt{\frac{nS_{xx}}{S_{xx} + (n\bar{X})^2}}$$

dónde:

b = Ordenada al origen

$\beta$  = Ordenada al origen poblacional ( $\beta = 0$ )

Se = Error típico de estimación

$S_{xx}$  = Suma de cuadrados de la variable independiente

$n$  = Número de determinaciones

$\bar{x}$  = Media experimental

Obteniendo para estos resultados:

$$t_{\alpha/2}(0.025,28) = 2.37$$

$$b = -0.0003$$

$$n = 30$$

$$\bar{X} = 0.01356$$

$$S_{xx} = n \sum_{t=1}^n X_t^2 - \left[ \sum_{t=1}^n X_t \right]^2 = 3.677 \times 10^{-2}$$

$$S_{yy} = n \sum_{t=1}^n Y_t^2 - \left[ \sum_{t=1}^n Y_t \right]^2 = 9.922 \times 10^{-2}$$

$$S_{xy} = n \sum_{t=1}^n X_t Y_t - \left[ \sum_{t=1}^n X_t \right] \left[ \sum_{t=1}^n Y_t \right] = 6.04 \times 10^{-2}$$

$$Se = \sqrt{\frac{S_{xx}S_{yy} - (S_{xy})^2}{(n-2)nS_{xx}}} = 1.1074 \times 10^{-4}$$

$$t_{cal} = t_{cal} = \frac{b - \beta}{Se} \sqrt{\frac{nS_{xx}}{S_{xx} + (n\bar{X})^2}} = -13.8365$$

El criterio para rechazar  $H_0$ , es que  $t_{cal} > t_{\alpha/2}$  ó  $t_{cal} < -t_{\alpha/2}$ , por lo que en este caso  $t_{cal}$  es menor que  $t_{\alpha/2}$  por lo que aceptamos  $H_0$ , y decimos que la ordenada tiende al origen, quedando la siguiente ecuación para la curva patrón:

$$y = 1.6425(\text{mL/mg}) x$$

dónde:

$y$  = absorbancia al UV con segunda derivada

$x$  = concentración de ácido ascórbico (mg/mL)

Posteriormente se calcula el intervalo de confianza (I.C.) al 95% para la ordenada al origen y la pendiente, obteniéndose los siguientes resultados:

Ordenada al origen:

$$I.C. = b \pm t_{\alpha/2} Se \sqrt{\frac{Sxx + (nX)^2}{nSxx}}$$

Intervalo superior de confianza = -0.00019

Intervalo inferior de confianza = -0.00041

$$\mathbf{-0.00041 < -0.0003 < -0.00019}$$

Pendiente:

$$I.C. = m \pm t_{\alpha/2} Se \sqrt{\frac{n}{Sxx}}$$

Intervalo superior de confianza = 1.6500

Intervalo inferior de confianza = 1.6350

$$\mathbf{1.6350 < 1.6425 < 1.6500}$$

### Precisión del sistema

Esta prueba se realizó para medir la desviación que existe entre ocho mediciones realizadas con el sistema de espectrofotometría UV con segunda derivada aplicado a soluciones de ácido ascórbico estándar de una misma concentración, en este caso  $1.34 \times 10^{-2}$  mg/mL.

<b>Tabla 10. Resultados obtenidos para la prueba de precisión del sistema</b>			
<b>Conc. (mg/mL)</b>	<b>Abs SD</b>	<b>Conc. (mg/mL)</b>	<b>Abs SD</b>
0.0134	0.0204	0.0134	0.0204
0.0134	0.0203	0.0134	0.0206
0.0134	0.0204	0.0134	0.0204
0.0134	0.0204	0.0134	0.0201
0.0134	0.0204	0.0134	0.0203
0.0134	0.0204	0.0134	0.0203
0.0134	0.0205	0.0134	0.0203
0.0134	0.0204	0.0134	0.0200
0.0134	0.0204	0.0134	0.0202
0.0134	0.0204	0.0134	0.0205

0.0134	0.0204	0.0134	0.0204
0.0134	0.0203	0.0134	0.0203

Ahora se utilizará una prueba de hipótesis sobre la varianza en donde se conocerá si el coeficiente de variación de los datos de absorbancia al UV con segunda derivada es menor al 5%:

$$H_0: s^2 = \sigma_0^2, \text{ donde } \sigma_0^2 = 5\% \text{ del C.V.}$$

$$H_1: s^2 \neq \sigma_0^2$$

Por tratarse de muestras aleatorias que provienen de una población normal de varianza  $\sigma_0^2$  se utiliza la prueba de  $\chi^2$  con n-1 grados de libertad, y se comparará con la de tablas:

$$\chi^2_{cal} = \frac{(n-1)s^2}{\sigma_0^2}$$

dónde:

n = número de determinaciones

$s^2$  = varianza experimental

$\sigma_0^2$  = varianza contra la que vamos a comparar (mínimo 5% del C.V.)

Para los datos de la tabla 7, obtenemos los siguientes resultados:

n =	24
Media =	0.0204
s exp =	$1.25 \times 10^{-4}$
$s^2$ exp =	$1.56 \times 10^{-8}$
% C.V. exp =	0.614
% C.V. teórico =	5
s teórica =	$1.02 \times 10^{-3}$
$s^2$ teórica =	$1.04 \times 10^{-6}$

El valor de  $\chi^2$  de tablas es:  $\chi^2_{(\alpha, n-1)} = \chi^2_{(0.05, 23)} = 35.17$

Aplicando la ecuación:

$$\chi^2_{cal} = \frac{(n-1)s^2}{\sigma_0^2} = \frac{(24-1)1.56 \times 10^{-8}}{1.04 \times 10^{-6}} = 0.372$$

$$\chi^2_{cal} = 0.372$$

El criterio para rechazar  $H_0$  es:  $\chi^2_{cal} > \chi^2_{\alpha, n-1}$ , por lo tanto en este caso  $\chi^2_{cal} < \chi^2_{(0.05, 23)}$  con lo que aceptamos  $H_0$ , y decimos que el C.V. de los datos es menor al 5%, es decir que se tiene una precisión con un C.V. máximo del 5%.

Los mismos datos se procesaron para encontrar el menor valor de C.V., obteniéndose el 1% de C.V. para estos resultados.

Se realizó el cálculo del intervalo de confianza para la desviación estándar de los datos de la tabla 2, a un nivel de significancia del 95%:

$$\frac{(n-1)s^2}{\chi^2_{\alpha/2}} < s^2 < \frac{(n-1)s^2}{\chi^2_{(1-\alpha/2)}}$$

Tomando la raíz cuadrada de cada miembro de la desigualdad se obtiene el intervalo de confianza para la desviación estándar “s” con el mismo nivel de significancia:

$$\sqrt{\frac{(n-1)s^2}{\chi^2_{\alpha/2}}} < s < \sqrt{\frac{(n-1)s^2}{\chi^2_{(1-\alpha/2)}}$$

$$\chi^2(1 - \alpha/2) = \chi^2_{0.975, 23} = 11.69$$

$$\chi^2(\alpha/2) = \chi^2_{0.025, 23} = 38.08$$

$$\sqrt{\frac{(23)1.56 \times 10^{-8}}{38.08}} < s < \sqrt{\frac{(23)1.56 \times 10^{-8}}{11.69}}$$

$$9.7 \times 10^{-5} < s < 1.7 \times 10^{-4}$$

$$9.7 \times 10^{-5} < 1.2 \times 10^{-4} < 1.7 \times 10^{-4}$$

## 3.- RESULTADOS DEL ESTUDIO ESTADÍSTICO DE LA METODOLOGÍA PROPUESTA

**Precisión:****Repetibilidad**

Utilizando el método propuesto se determinó la concentración de ácido ascórbico en ocho muestras de néctar de durazno marca Del Valle del mismo lote para disminuir la variabilidad de la formulación en cada muestra, obteniéndose los siguientes resultados:

<b>Tabla 11. Resultados obtenidos para la prueba de precisión del método UV con segunda derivada</b>				
<b>Nombre</b>	<b>mL néctar</b>	<b>vol. aforo (mL)</b>	<b>Abs SD</b>	<b>Conc. (mg / 250mL de néctar )</b>
A1-1	5	50	0.0273	41.55
A2-1	5	50	0.0274	41.70
A3-1	5	50	0.0273	41.55
A1-2	5	50	0.0268	40.79
A2-2	5	50	0.0268	40.79
A3-2	5	50	0.0268	40.79
A1-3	5	50	0.0273	41.55
A2-3	5	50	0.0273	41.55
A3-3	5	50	0.0274	41.70
A1-4	5	50	0.0262	39.88
A2-4	5	50	0.0262	39.88
A3-4	5	50	0.0261	39.73
A1-5	5	50	0.0261	39.73
A2-5	5	50	0.0260	39.57
A3-5	5	50	0.0260	39.57
A1-6	5	50	0.0260	39.57
A2-6	5	50	0.0260	39.57
A3-6	5	50	0.0260	39.57
A1-7	5	50	0.0268	40.79
A2-7	5	50	0.0268	40.79



A3-7	5	50	0.0268	40.79
A1-8	5	50	0.0266	40.49
A2-8	5	50	0.0264	40.18
A3-8	5	50	0.0264	40.18

n =	24
Media =	40.51
s exp =	0.79
s <sup>2</sup> exp =	0.62
% C.V. exp =	1.95
% C.V. teórico =	5
s teórica =	2.03
s <sup>2</sup> teórica =	4.10

El valor de C.V. obtenido para estos resultados fue de 1.95, por lo que primero se trabajó un C.V. teórico del 5% para realizar la prueba de hipótesis sobre la varianza, donde de nuevo utilizamos el estadístico  $\chi^2$  para comprobar las siguientes hipótesis:

$$H_0: s^2 = \sigma_0^2, \text{ donde } \sigma_0^2 = 4.10$$

$$H_1: s^2 \neq \sigma_0^2$$

Por tratarse de muestras aleatorias que provienen de una población normal de varianza  $\sigma_0^2$  se utiliza la prueba de  $\chi^2$  con n-1 grados de libertad, y se comparará con la de tablas:

$$\chi^2_{cal} = \frac{(n-1)s^2}{\sigma_0^2}$$

dónde:

n = número de determinaciones = 24

s<sup>2</sup> = varianza experimental = 0.62

$\sigma_0^2$  = varianza contra la que vamos a comparar = 4.10

$$\chi^2_{cal} = \frac{(24-1)0.62}{4.10}$$

$$\chi^2_{cal} = 3.49$$

$$\chi^2_{(\alpha, n-1)} = \chi^2_{(0.05, 23)} = 35.17$$

El criterio para rechazar  $H_0$  es:  $\chi^2_{\text{cal}} > \chi^2_{\alpha, n-1}$ , por lo tanto en este caso  $3.49 < 35.17$  con lo que aceptamos  $H_0$ , y decimos que el C.V. de los datos es menor al 5%, es decir que se tiene una precisión con un C.V. máximo del 5%.

Los mismos datos se procesaron para encontrar el menor valor de C.V., obteniéndose el 2% de C.V. para estos resultados.

Se calculó el intervalo de confianza al 95% de significancia para la desviación estándar:

$$\frac{(n-1)s^2}{\chi^2_{\alpha/2}} < s^2 < \frac{(n-1)s^2}{\chi^2_{(1-\alpha/2)}}$$

Tomando la raíz cuadrada de cada miembro de la desigualdad se obtiene el intervalo de confianza para la desviación estándar “s” con el mismo nivel de significancia:

$$\sqrt{\frac{(n-1)s^2}{\chi^2_{\alpha/2}}} < s < \sqrt{\frac{(n-1)s^2}{\chi^2_{(1-\alpha/2)}}$$

$$\chi^2_{(1-\alpha/2)} = \chi^2_{0.975, 23} = 11.69$$

$$\chi^2_{(\alpha/2)} = \chi^2_{0.025, 23} = 38.08$$

$$\sqrt{\frac{(23)0.62}{38.08}} < s < \sqrt{\frac{(23)0.62}{11.69}}$$

$$0.61 < s < 1.10$$

$$0.61 < 0.79 < 1.10$$

Posteriormente se determinó el intervalo de confianza para la media, a un nivel de significancia del 95%, para el néctar de Durazno marca Del Valle:

$$I.C. = \bar{X} \pm t_{\alpha/2} \frac{s}{\sqrt{n}}$$

$$t_{(\alpha/2, n-1)} = t_{(0.025, 23)} = 2.398$$

$$I.C. = 40.51 \pm 2.398 \left( \frac{0.79}{\sqrt{24}} \right)$$

$$I.C. = 40.51 \pm 0.3943 \text{ mg/250mL}$$

**Recobro**

Se toman tres muestras de néctar de durazno marca Del Valle, las cuales se dividen en dos partes iguales cada una, “A” y “B”. A 100mL de la parte “B” de cada muestra se le adicionan aproximadamente 8mg de ácido ascórbico estándar (muestra adicionada). A continuación se determina el contenido de ácido ascórbico en cada una de las partes “A” y “B” de cada una de las muestras, utilizando la metodología propuesta, y leyendo al UV con segunda derivada cada muestra por triplicado, obteniéndose los siguientes resultados:

<b>Tabla 12. Resultados obtenidos para calcular el % de recobro para el método por espectrofotometría UV con segunda derivada.</b>							
<b>mg de ác. Ascórbico adicionados a B</b>	<b>Nombre</b>	<b>mL Néctar</b>	<b>Vol. aforo (mL)</b>	<b>Abs SD</b>	<b>Conc. Exp. (mg/mL)</b>	<b>Conc. mg/mL de néctar</b>	<b>Conc. mg/250mL de néctar</b>
3.4	A1-1	5	50	0.0279	0.0172	0.1717	42.9
	A2-1	5	50	0.0281	0.0173	0.1729	43.2
	A3-1	5	50	0.0278	0.0171	0.1711	42.8
	B1-1	5	50	0.0328	0.0202	0.2015	50.4
	B2-1	5	50	0.0329	0.0202	0.2021	50.5
	B3-1	5	50	0.0330	0.0203	0.2027	50.7
3.2	A1-2	5	50	0.0280	0.0172	0.1723	43.1
	A2-2	5	50	0.0281	0.0173	0.1729	43.2
	A3-2	5	50	0.0279	0.0172	0.1717	42.9
	B1-2	5	50	0.0331	0.0203	0.2033	50.8
	B2-2	5	50	0.0331	0.0203	0.2033	50.8
	B3-2	5	50	0.0329	0.0202	0.2021	50.5
3.3	A1-3	5	50	0.0282	0.0174	0.1735	43.4
	A2-3	5	50	0.0281	0.0173	0.1729	43.2
	A3-3	5	50	0.0282	0.0174	0.1735	43.4
	B1-3	5	50	0.0334	0.0205	0.2052	51.3
	B2-3	5	50	0.0332	0.0204	0.2040	51.0
	B3-3	5	50	0.0333	0.0205	0.2046	51.1

Se calcula la cantidad de ácido ascórbico agregado a 250mL del néctar, para poder conocer el valor de concentración de la muestra adicionada para realizar el cálculo de recobro:

$$\frac{3.4\text{mgác.ascórbico}}{100\text{mL}} \times 250\text{mL} = 8.5\text{mg ácido ascórbico en 250mL de néctar}$$

<b>Tabla 13. Cantidad de ácido ascórbico añadida a 250mL de néctar de durazno</b>	
<b>Muestra</b>	<b>mg ácido ascórbico agregados a 250mL néctar</b>
B1-1	8.5
B2-1	8.5
B3-1	8.5
B1-2	8.0
B2-2	8.0
B3-2	8.0
B1-3	8.25
B2-3	8.25
B3-3	8.25

A la cantidad de ácido ascórbico encontrada en 250mL de la fracción “A” de néctar de durazno, se le suma la cantidad agregada a 250mL de la parte “B”, quedando como sigue:

<b>Tabla 14. Contenido teórico de ácido ascórbico de las muestras adicionadas</b>	
<b>Muestra</b>	<b>Cantidad teórica de ácido ascórbico (mg/250mL de néctar)</b>
B1-1	51.42
B2-1	51.73
B3-1	51.27
B1-2	51.07
B2-2	51.23
B3-2	50.92
B1-3	51.63
B2-3	51.48
B3-3	51.63

Para terminar esta prueba, se calcula el % de recobro:

$$\text{Recobro} = \frac{[\text{Concentración}]_{\text{obtenida}}}{[\text{Concentración}]_{\text{teórica}}} \times 100$$

<b>Tabla 15. Resultados obtenidos para la prueba de recobro para la metodología propuesta</b>	
<b>Muestra</b>	<b>% Recobro</b>
1-1	97.97
2-1	97.69
3-1	98.86
1-2	99.54
2-2	99.24
3-2	99.23
1-3	99.35
2-3	99.05
3-3	99.06

n =	24
Media =	98.89
s exp =	0.632
s <sup>2</sup> exp =	0.400
% C.V. exp =	0.64

Con lo anterior se puede concluir que el método por espectroscopia UV con segunda derivada tiene 98.89% de recobro, el cual es un buen resultado para una metodología analítica.

**4.- RESULTADOS DEL ESTUDIO ESTADÍSTICO DEL MÉTODO OFICIAL (AOAC)**

**Precisión:**

**Repetibilidad**

Utilizando el método Oficial (AOAC) se determinó la concentración de ácido ascórbico en ocho muestras de néctar de durazno marca Del Valle del mismo lote para disminuir la variabilidad de la formulación en cada muestra, obteniéndose los siguientes resultados:

<b>Tabla 16. Resultados obtenidos para la prueba de precisión del método Oficial (AOAC)</b>						
<b>Nombre</b>	<b>mL Néctar</b>	<b>vol. Aforo (mL)</b>	<b>vol. Titulado (mL)</b>	<b>vol. titulante gastado (mL)</b>	<b>Gastado menos blanco (mL)</b>	<b>Conc. (mg/250mL de néctar)</b>
A1-1	40	100	15	10.8	10.7	54.52
A2-1	40	100	15	10.7	10.6	54.01
A3-1	40	100	15	10.6	10.5	53.50
A1-2	40	100	15	10.8	10.7	54.52
A2-2	40	100	15	10.7	10.6	54.01
A3-3	40	100	15	10.7	10.6	54.01
A1-3	40	100	15	10.9	10.8	55.03
A2-3	40	100	15	10.7	10.6	54.01
A3-3	40	100	15	10.7	10.6	54.01
A1-4	40	100	15	10.9	10.8	55.03
A2-4	40	100	15	10.8	10.7	54.52
A3-4	40	100	15	10.8	10.7	54.52
A1-5	40	100	15	10.8	10.7	54.52
A2-5	40	100	15	10.8	10.7	54.52
A3-5	40	100	15	10.7	10.6	54.01
A1-6	40	100	15	11.0	10.9	55.54
A2-6	40	100	15	10.9	10.8	55.03
A3-6	40	100	15	10.9	10.8	55.03

A1-7	40	100	15	10.8	10.7	54.52
A2-7	40	100	15	10.8	10.7	54.52
A3-7	40	100	15	10.8	10.7	54.52
A1-8	40	100	15	11.0	10.9	55.54
A2-8	40	100	15	10.9	10.8	55.03
A3-8	40	100	15	10.9	10.8	55.03

n =	24
Media =	54.48
s exp =	0.64
s <sup>2</sup> exp =	0.41
% C.V. exp =	1.17
% C.V. teórico =	5
s teórica =	2.72
s <sup>2</sup> teórica =	7.42

El valor de C.V. obtenido para estos resultados fue de 1.17, por lo que primero se trabajó un C.V. teórico del 5% para realizar la prueba de hipótesis sobre la varianza, donde de nuevo se utiliza el estadístico  $\chi^2$  para comprobar las siguientes hipótesis:

$$H_0: s^2 = \sigma_0^2, \text{ donde } \sigma_0^2 = 7.42$$

$$H_1: s^2 \neq \sigma_0^2$$

Por tratarse de muestras aleatorias que provienen de una población normal de varianza  $\sigma_0^2$  se utiliza la prueba de  $\chi^2$  con n-1 grados de libertad, y se comparará con la de tablas:

$$\chi^2_{cal} = \frac{(n-1)s^2}{\sigma_0^2}$$

dónde:

n = número de determinaciones = 24

s<sup>2</sup> = varianza experimental = 0.41

$\sigma_0^2$  = varianza contra la que vamos a comparar = 7.42

$$\chi^2_{\text{cal}} = \frac{(24-1)0.41}{7.42}$$

$$\chi^2_{\text{cal}} = 1.26$$

$$\chi^2_{(\alpha, n-1)} = \chi^2_{(0.05, 23)} = 35.17$$

El criterio para rechazar  $H_0$  es:  $\chi^2_{\text{cal}} > \chi^2_{\alpha, n-1}$ , por lo tanto en este caso  $1.26 < 35.17$  con lo que aceptamos  $H_0$ , y decimos que el C.V. de los datos es menor al 5%, es decir que se tiene una precisión con un C.V. máximo del 5%.

Los mismos datos se procesaron para encontrar el menor valor de C.V., obteniéndose el 2% de C.V. para estos resultados.

Se calculó el intervalo de confianza al 95% de significancia para la desviación estándar:

$$\frac{(n-1)s^2}{\chi^2_{\alpha/2}} < s^2 < \frac{(n-1)s^2}{\chi^2_{(1-\alpha/2)}}$$

Tomando la raíz cuadrada de cada miembro de la desigualdad obtenemos el intervalo de confianza para la desviación estándar “s” con el mismo nivel de significancia:

$$\sqrt{\frac{(n-1)s^2}{\chi^2_{\alpha/2}}} < s < \sqrt{\frac{(n-1)s^2}{\chi^2_{(1-\alpha/2)}}$$

$$\chi^2_{(1-\alpha/2)} = \chi^2_{0.975, 23} = 11.69$$

$$\chi^2_{(\alpha/2)} = \chi^2_{0.025, 23} = 38.08$$

$$\sqrt{\frac{(23)0.41}{38.08}} < s < \sqrt{\frac{(23)0.41}{11.69}}$$

$$0.50 < s < 0.90$$

$$0.50 < 0.64 < 0.90$$

Posteriormente se determinó el intervalo de confianza para la media, a un nivel de significancia del 95%, para el néctar de Durazno marca Del Valle:

$$I.C. = \bar{X} \pm t_{\alpha/2} \frac{s}{\sqrt{n}}$$

$$t_{(\alpha/2, n-1)} = t_{(0.025, 23)} = 2.398$$



$$I.C. = 54.48 \pm 2.398 \left( \frac{0.64}{\sqrt{24}} \right)$$

$$I.C. = 54.48 \pm 0.3188 \text{ mg/250mL}$$

**Adición: (Recobro)**

Se toman tres muestras de néctar de durazno marca Del Valle, las cuales se dividen en dos partes iguales cada una, “A” y “B”. A 100mL de la parte “B” de cada muestra se le adicionan aproximadamente 8mg de ácido ascórbico estándar (muestra adicionada). A continuación se determina el contenido de ácido ascórbico en cada una de las partes “A” y “B” de cada una de las muestras, utilizando la metodología Oficial (AOAC), y titulando por triplicado cada muestra, obteniéndose los siguientes resultados:

<b>Tabla 17.1 Resultados obtenidos para calcular el % de recobro para el método Oficial (AOAC)</b>								
<b>g ascórbico adicionados a 100mL de néctar</b>	<b>Nombre</b>	<b>mL néctar tomados</b>	<b>Vol. Aforo (mL)</b>	<b>Vol. titulado (mL)</b>	<b>Vol. titulante gastado (mL)</b>	<b>Vol. titulante gastado para el blanco (mL)</b>	<b>mg ascórbico pesados para valorar el titulante</b>	<b>Vol. titulante gastado para valorar el titulante</b>
3.8	A1-1	40	100	20	14.2	0.1	0.0500	16.3
	A2-1	40	100	20	14.2	0.1	0.0500	16.3
	A3-1	40	100	20	14.3	0.1	0.0500	16.3
	B1-1	40	100	20	16.3	0.1	0.0500	16.3
	B2-1	40	100	20	16.4	0.1	0.0500	16.3
	B3-1	40	100	20	16.5	0.1	0.0500	16.3
3.3	A1-2	40	100	15	10.8	0.1	0.0500	16.6
	A2-2	40	100	15	10.7	0.1	0.0500	16.6
	A3-2	40	100	15	10.7	0.1	0.0500	16.6
	B1-2	40	100	15	11.9	0.1	0.0500	16.6
	B2-2	40	100	15	11.9	0.1	0.0500	16.6
	B3-2	40	100	15	11.8	0.1	0.0502	16.6

3.4	A1-3	40	100	15	10.9	0.1	0.0502	8.35
	A2-3	40	100	15	10.7	0.1	0.0502	8.35
	A3-3	40	100	15	10.7	0.1	0.0502	8.35
	B1-3	40	100	15	12.3	0.1	0.0502	8.35
	B2-3	40	100	15	12.1	0.1	0.0502	8.35
	B3-3	40	100	15	12.1	0.1	0.0502	8.35

**Tabla 17.2** Continuación de los resultados obtenidos para calcular el % de adición (recobro) para el método Oficial (AOAC)

<b>Vol. blanco</b>	<b>mg ascórbico titulados en la valoración del titulante</b>	<b>mg soln. De néctar titulada</b>	<b>Conc. De ascórbico en la alícuota titulada (mg/mL)</b>	<b>Conc. Ascórbico en el néctar (mg/mL)</b>	<b>mg ascórbico en 250mL de néctar</b>
0.1	2	1.7407	0.0870	0.2176	54.40
0.1	2	1.7407	0.0870	0.2176	54.40
0.1	2	1.7531	0.0877	0.2191	54.78
0.1	2	2.0000	0.1000	0.2500	62.50
0.1	2	2.0123	0.1006	0.2515	62.89
0.1	2	2.0247	0.1012	0.2531	63.27
0.1	2	1.2970	0.0865	0.2162	54.04
0.1	2	1.2848	0.0857	0.2141	53.54
0.1	2	1.2848	0.0857	0.2141	53.54
0.1	2	1.4303	0.0954	0.2384	59.60
0.1	2	1.4303	0.0954	0.2384	59.60
0.1	2	1.4182	0.0945	0.2364	59.09
0.1	1	1.3091	0.0873	0.2182	54.55
0.1	1	1.2848	0.0857	0.2141	53.54
0.1	1	1.2848	0.0857	0.2141	53.54

0.1	1	1.4788	0.0986	0.2465	61.62
0.1	1	1.4545	0.0970	0.2424	60.61
0.1	1	1.4545	0.0970	0.2424	60.61

Calculamos la cantidad de ácido ascórbico agregado a 250mL del néctar, para poder conocer el valor de concentración de la muestra adicionada para realizar el cálculo de adición (recobro):

$$\frac{3.4\text{mgác.ascórbico}}{100\text{mL}} \times 250\text{mL} = 8.5\text{mg ácido ascórbico en 250mL de néctar}$$

<b>Tabla 18. Cantidad de ácido ascórbico añadida a 250mL de néctar de durazno (método AOAC)</b>	
<b>Muestra</b>	<b>mg ácido ascórbico agregados a 250mL néctar</b>
B1-1	9.5
B2-1	9.5
B3-1	9.5
B1-2	8.25
B2-2	8.25
B3-2	8.25
B1-3	8.5
B2-3	8.5
B3-3	8.5

A la cantidad de ácido ascórbico encontrada en 250mL de la fracción “A” de néctar de durazno, se le suma la cantidad agregada a 250mL de la parte “B”, quedando como sigue:

<b>Tabla 19. Contenido teórico de ácido ascórbico de las muestras adicionadas (método AOAC)</b>	
<b>Muestra</b>	<b>Cantidad teórica de ácido ascórbico (mg/250mL de néctar)</b>
B1-1	63.90
B2-1	63.90
B3-1	64.28

B1-2	62.29
B2-2	61.79
B3-2	61.79
B1-3	63.05
B2-3	62.04
B3-3	62.04

Para terminar esta prueba, se calcula el % de adición (recobro):

$$\text{Adición(Recobro)} = \frac{[\text{Concentración}]_{\text{obtenida}}}{[\text{Concentración}]_{\text{teórica}}} \times 100$$

<b>Tabla 20. Resultados obtenidos para la prueba de adición (recobro) para el método AOAC</b>	
<b>Muestra</b>	<b>% Adición (Recobro)</b>
1-1	97.81
2-1	98.42
3-1	98.43
1-2	95.67
2-2	96.46
3-2	95.64
1-3	97.73
2-3	97.70
3-3	97.70

n =	9
Media =	97.29
s exp =	1.08
s <sup>2</sup> exp =	1.17
% C.V. exp =	1.11

Con lo anterior podemos concluir que el método Oficial (AOAC) tiene 97.29% de adición (recobro), el cual es un buen resultado para una metodología analítica.

## **5.- COMPARACIÓN DE RESULTADOS OBTENIDOS CON LA METODOLOGÍA PROPUESTA Y EL MÉTODO OFICIAL AOAC**

### **Repetibilidad**

La repetibilidad del método Oficial fue de %C.V. = 1.17 y la del método propuesto de %C.V. = 1.95, esto nos dice que el método AOAC y la metodología propuesta tienen una precisión adecuada para una metodología analítica ya que ninguna de las dos metodologías tiene un %C.V. mayor a 2. No obstante la sensibilidad del método Oficial es menor que la de la metodología propuesta, ya que con la metodología propuesta se pueden cuantificar concentraciones de ácido ascórbico del orden de  $5 \times 10^{-3}$  mg/mL, mientras que en el Oficial se necesitan tener presentes mínimo 0.5mg de ácido ascórbico para realizar la titulación.

### **Recobro**

La metodología propuesta tuvo un recobro de % R = 98.89% y el método Oficial de %R = 97.29%, cuyos respectivos %C.V. fueron menores al 3%, por lo que se concluye que las dos metodologías tienen un recobro adecuado para un método analítico.

Sin embargo el método Oficial no se puede aplicar directamente para medir la concentración de ácido ascórbico en muestras coloridas ya que no se puede apreciar el vire del indicador, mientras que el método propuesto no tiene ningún inconveniente con este tipo de jugos y néctares.

El tiempo de análisis de la metodología propuesta (10-15min) es menor al del método Oficial (20-30min) y se necesita menor cantidad de muestra y menos reactivos con el método propuesto que con el Oficial.

# **CONCLUSIONES**

CONCLUSIONES

- ✓ De acuerdo a lo reportado en la bibliografía el ácido ascórbico es estable disolviéndolo en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.1M previamente burbujeado con  $\text{N}_2$  durante 10 minutos.
- ✓ La  $\lambda$ . de absorción del ácido ascórbico elegida para la cuantificación es de 244 nm.
- ✓ Utilizar la espectrofotometría UV con segunda derivada elimina interferencias que pudieran estar presentes en los jugos y néctares y absorbieran al UV en  $\lambda$  máximas cercanas a la del ácido ascórbico.
- ✓ El intervalo de concentraciones del ácido ascórbico que se pueden analizar por el método espectrofotométrico al UV con segunda derivada es de  $5 \times 10^{-3}$  a  $3.5 \times 10^{-2}$  mg/mL.
- ✓ Utilizar el cartucho de extracción en fase sólida de  $\text{C}_{18}$  elimina el color y las pectinas presentes en los jugos filtrados, permitiendo la cuantificación del ácido ascórbico con el método aquí propuesto.
- ✓ La metodología propuesta se puede utilizar para la determinación cuantitativa de ácido ascórbico en jugos y néctares de fruta de cualquier color.
- ✓ El método Oficial (AOAC) no puede utilizarse directamente para la determinación de ácido ascórbico en muestras coloridas.
- ✓ El método de trabajo propuesto es más fácil de realizar que el método Oficial, ya que en éste último es difícil encontrar el final de la titulación debido a los colores de las muestras.
- ✓ El método de trabajo propuesto es más sensible que el método Oficial.
- ✓ El %C.V. de la metodología propuesta es de 1.95%.
- ✓ El %C.V. del método Oficial AOAC es de 1.17%.
- ✓ La precisión de ambos métodos es adecuada para una metodología analítica.
- ✓ El %R de la metodología propuesta es de 98.89%.
- ✓ El % de adición (recobro) del método Oficial AOAC es de 97.29%.
- ✓ Los %R de ambos métodos son adecuados para una metodología analítica.
- ✓ Las pectinas presentes en una muestra impiden que el ácido ascórbico absorba radiación UV.
- ✓ Las pectinas de un néctar se logran eliminar precipitándolas con metanol,  $\text{CaCl}_2$  y  $\text{AlCl}_3$  pero retienen al ácido ascórbico, lo cual impide su cuantificación por espectrofotometría UV.
- ✓ Las pectinas de un néctar precipitan con soluciones de  $\text{CaCl}_2$  y  $\text{AlCl}_3$ , y no lo hacen con soluciones de  $\text{NaCl}$ . El precipitado blanco formado es llamado pectinato de calcio.

- ✓ Utilizando lavado por agitación magnética y lavado por ultrasonido, el ácido ascórbico no se puede liberar completamente del gel o precipitado que se forma al precipitar las pectinas del néctar con metanol,  $\text{CaCl}_2$  y  $\text{AlCl}_3$ .
- ✓ La técnica de filtración por gravedad requiere de 30 a 45min.
- ✓ La técnica de filtración al vacío requiere de 15 a 20min.
- ✓ La técnica de filtración al vacío es más rápida que la técnica de filtración por gravedad, pero las dos siguen necesitando más de 15min. para llevarse a cabo.
- ✓ Ambas técnicas de filtración nos permiten hacer la determinación cuantitativa de ácido ascórbico en néctares de fruta.
- ✓ El método de congelación y paso por cartucho de extracción en fase sólida sirve para la determinación cualitativa de ácido ascórbico en néctares y jugos de fruta; mientras que no sirve para la determinación cuantitativa ya que se detectan pérdidas del analito debidas a la congelación.
- ✓ Al centrifugar el néctar se sedimentan los componentes sólidos de éste, quedando una fase líquida o sobrenadante en la que se encuentra presente el ácido ascórbico y las pectinas. Pasando el sobrenadante por un cartucho de extracción en fase sólida de  $\text{C}_{18}$ , se retienen las pectinas en el cartucho, dejando libre en solución al ácido ascórbico.
- ✓ La centrifugación a 3500rpm durante 5min, es la mejor metodología de preparación de la muestra para eliminar los sólidos presentes en el néctar, logrando la determinación cuantitativa de ácido ascórbico en las muestras en tiempos de análisis de 10-15min.



**ANEXO**

## ANEXO

## LINEALIDAD DEL SISTEMA

Datos:

Conc. (mg/mL)	Abs SD	Xi = Conc. (mg/mL)	Yi = Abs SD	Xi <sup>2</sup>	Yi <sup>2</sup>	Xi*Yi
0.0045	0.0071	0.0045	0.0071	2.0430E-05	5.0410E-05	3.2092E-05
0.0045	0.0071	0.0045	0.0071	2.0430E-05	5.0410E-05	3.2092E-05
0.0045	0.0071	0.0045	0.0071	2.0430E-05	5.0410E-05	3.2092E-05
0.0045	0.0071	0.0045	0.0071	2.0430E-05	5.0410E-05	3.2092E-05
0.0045	0.0071	0.0045	0.0071	2.0430E-05	5.0410E-05	3.2092E-05
0.0045	0.0070	0.0045	0.0070	2.0430E-05	4.9000E-05	3.1640E-05
0.0090	0.0146	0.0090	0.0146	8.1722E-05	2.1316E-04	1.3198E-04
0.0090	0.0145	0.0090	0.0145	8.1722E-05	2.0880E-04	1.3063E-04
0.0090	0.0145	0.0090	0.0145	8.1722E-05	2.1025E-04	1.3108E-04
0.0090	0.0145	0.0090	0.0145	8.1722E-05	2.1025E-04	1.3108E-04
0.0090	0.0145	0.0090	0.0145	8.1722E-05	2.1025E-04	1.3108E-04
0.0090	0.0145	0.0090	0.0145	8.1722E-05	2.1025E-04	1.3108E-04
0.0136	0.0222	0.0136	0.0222	1.8387E-04	4.9284E-04	3.0103E-04
0.0136	0.0222	0.0136	0.0222	1.8387E-04	4.9284E-04	3.0103E-04
0.0136	0.0221	0.0136	0.0221	1.8387E-04	4.8841E-04	2.9968E-04
0.0136	0.0222	0.0136	0.0222	1.8387E-04	4.9284E-04	3.0103E-04
0.0136	0.0222	0.0136	0.0222	1.8387E-04	4.9284E-04	3.0103E-04
0.0136	0.0221	0.0136	0.0221	1.8387E-04	4.8841E-04	2.9968E-04
0.0181	0.0293	0.0181	0.0293	3.2689E-04	8.5849E-04	5.2974E-04
0.0181	0.0294	0.0181	0.0294	3.2689E-04	8.6436E-04	5.3155E-04
0.0181	0.0293	0.0181	0.0293	3.2689E-04	8.5849E-04	5.2974E-04
0.0181	0.0294	0.0181	0.0294	3.2689E-04	8.6436E-04	5.3155E-04
0.0181	0.0293	0.0181	0.0293	3.2689E-04	8.5849E-04	5.2974E-04
0.0181	0.0294	0.0181	0.0294	3.2689E-04	8.6436E-04	5.3155E-04
0.0226	0.0369	0.0226	0.0369	5.1076E-04	1.3616E-03	8.3394E-04
0.0226	0.0368	0.0226	0.0368	5.1076E-04	1.3542E-03	8.3168E-04
0.0226	0.0367	0.0226	0.0367	5.1076E-04	1.3469E-03	8.2942E-04
0.0226	0.0367	0.0226	0.0367	5.1076E-04	1.3469E-03	8.2942E-04
0.0226	0.0368	0.0226	0.0368	5.1076E-04	1.3542E-03	8.3168E-04
0.0226	0.0368	0.0226	0.0368	5.1076E-04	1.3542E-03	8.3168E-04

## LINEALIDAD DEL SISTEMA

Pruebas estadísticas para los datos de linealidad del sistema:

	$b =$	-0.0003
$H_0 \rightarrow$	$b = \beta,$	donde $\beta = 0$
$H_1 \rightarrow$	$b$ diferente $\beta$	

Suma $X_i$	=	0.40680
Suma $Y_i$	=	0.65935
Suma $(X_i^2)$	=	0.00674
Suma $(Y_i^2)$	=	0.01780
Suma $(X_i * Y_i)$	=	0.01095
$(\text{Suma } X_i)^2$	=	0.16549
$(\text{Suma } Y_i)^2$	=	0.43474
media $X_i$	=	0.01356
$n$	=	30
g.l.	=	28
$(n-2)*n$	=	840
$n * \text{media}$	=	0.40680
$(n * \text{media})^2$	=	0.1655
t tablas	=	2.36845
$S_{xx}$	=	0.03677
$S_{yy}$	=	0.09922
$S_{xy}$	=	0.06040
Se	=	1.1074E-04
$Se^2$	=	1.2263E-08
t calculada	=	-6.3270
Ordenada	=	-0.0003
Pendiente	=	1.6425

Conclusión =	1
0 =	Rechazar $H_0$
1 =	Aceptar $H_0$

I.C. para b al 95% significancia	
I. Superior de confianza =	-0.00019
I. Inferior de confianza =	-0.00041

I.C. para la pendiente al 95% significancia	
I. Superior de confianza =	1.6500
I. Inferior de confianza =	1.6350

## PRECISIÓN DEL SISTEMA

Datos:

Soln. Madre:	0.0112	g/100mL H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.1M burbujeado 10min. en N <sub>2</sub>	
<b>mL Soln. Madre</b>	<b>Nombre (Repetición)</b>	<b>Conc. (mg/mL)</b>	<b>Abs SD</b>
3	3a4	0.0134	0.0204
3	3a2	0.0134	0.0203
3	3a3	0.0134	0.0204
3	3b1	0.0134	0.0204
3	3b2	0.0134	0.0204
3	3b3	0.0134	0.0204
3	3c1	0.0134	0.0205
3	3c2	0.0134	0.0204
3	3c3	0.0134	0.0204
3	3d1	0.0134	0.0204
3	3d2	0.0134	0.0204
3	3d3	0.0134	0.0203
3	3e1	0.0134	0.0204
3	3e2	0.0134	0.0206
3	3e3	0.0134	0.0204
3	3f1	0.0134	0.0201
3	3f2	0.0134	0.0203
3	3f3	0.0134	0.0203
3	3g1	0.0134	0.0203
3	3g2	0.0134	0.0200
3	3g3	0.0134	0.0202
3	3i1	0.0134	0.0205
3	3i2	0.0134	0.0204
3	3i3	0.0134	0.0203

## PRECISIÓN DEL SISTEMA

Pruebas estadísticas para los datos de precisión del sistema:

n =	24			$H_0 \rightarrow s^2 = \sigma^2$
Media =	0.0204			$H_1 \rightarrow s^2 \text{ diferente de } \sigma^2$
s exp =	0.000125036			
$s^2 \text{ exp} =$	1.56341E-08			$\chi^2 (0.05, n-1) =$ 35.17246022
% CV exp =	0.614302853			$\chi^2 \text{ exp} =$ 0.347178556
% CV teórico =	5			
s teórica =	0.001017708			Conclusión = 1
$s^2 \text{ teórica} =$	1.03573E-06			1 = Aceptar $H_0$
				0 = Rechazar $H_0$
$\chi^2 (0.025, n-1) =$	38.07560946			
$\chi^2 (0.975, n-1) =$	11.68853434			
I. Inferior de confianza	0.00009718			
I. Superior de confianza	0.00017540			
		< s <		
I.C. de s =	0.00009718	0.00012504	0.000175396	
tstudent (0.025, n-1) =	2.397873686			
I.C. sobre la media =	6.2517E-05			

<b>Tabla 21. Contenido experimental de ácido ascórbico en las muestras de jugos y néctares analizadas por la metodología propuesta</b>									
<b>Jugos</b>	<b>Marca</b>	<b>Porción (mL)</b>	<b>Volumen de muestra (mL)</b>	<b>Volumen de aforo (mL)</b>	<b>Abs SD</b>	<b>Ác. Ascórbico (mg/porción)</b>	<b>Corrección por %R (mg /porción)</b>	<b>Ác. Ascórbico (mg/100mL)</b>	<b>Corrección por %R (mg /100mL)</b>
Fresa	Boing	240	10	25	0.0125	4.57	4.62	1.90	1.92
Manzana	Gerber	118	3	50	0.0314	37.60	32.22	31.86	32.22
Manzana	Del Valle	250	10	25	0.0273	10.39	4.20	4.16	4.20
Naranja	Del Valle	250	5	50	0.0503	76.56	30.97	30.62	30.97
Piña	Del Valle	240	5	25	0.0330	24.11	10.16	10.05	10.16
Splash naranja	Campbell's	200	2	50	0.0347	105.63	53.41	52.82	53.41
Toronja	Sonrisa	240	2	50	0.0160	58.45	24.63	24.35	24.63
Uva	Jumex	200	5	25	0.0199	12.12	6.13	6.06	6.13
Uva	Del Valle	240	9	25	0.0269	10.92	4.60	4.55	4.60
<b>Néctares</b>	<b>Marca</b>	<b>Porción (mL)</b>	<b>Volumen de muestra (mL)</b>	<b>Volumen de aforo (mL)</b>	<b>Abs SD</b>	<b>Ác. Ascórbico (mg/porción)</b>	<b>Corrección por %R (mg/porción)</b>	<b>Ác. Ascórbico (mg/100mL)</b>	<b>Corrección por %R (mg /100mL)</b>
8 Verduras	Campbell's	240	3	50	0.0157	38.23	16.11	15.93	16.11
8 Verduras	Herdez	240	3	50	0.0328	79.88	33.66	33.28	33.66
Durazno	Jumex	250	5	50	0.0029	4.41	1.79	1.77	1.79
Durazno	Del Valle	250	5	50	0.0226	34.40	13.91	13.76	13.91
Frutas	Gerber	118	3	50	0.0220	26.34	22.57	22.32	22.57
Guayaba	Boing	240	3	50	0.0165	40.18	16.93	16.74	16.93
Guayaba	Jumex	250	5	50	0.0418	63.62	25.73	25.45	25.73
Guayaba	Del Valle	250	2	50	0.0231	87.90	35.55	35.16	35.55
Mango	Del Valle	250	5	50	0.0195	29.68	12.01	11.87	12.01
Manzana	Jumex	250	5	50	0.0035	5.33	2.15	2.13	2.15
Manzana	Del Valle	250	5	50	0.0264	40.18	16.25	16.07	16.25
Pera	Jumex	250	5	50	0.0025	3.81	1.54	1.52	1.54

## PRECISIÓN DEL MÉTODO PROPUESTO

Datos:

Nombre	mL néctar	vol. aforo (mL)	Abs SD	Conc. en néctar (mg/mL)
A1-1	5	50	0.0273	41.55
A2-1	5	50	0.0274	41.70
A3-1	5	50	0.0273	41.55
A1-2	5	50	0.0268	40.79
A2-2	5	50	0.0268	40.79
A3-2	5	50	0.0268	40.79
A1-3	5	50	0.0273	41.55
A2-3	5	50	0.0273	41.55
A3-3	5	50	0.0274	41.70
A1-4	5	50	0.0262	39.88
A2-4	5	50	0.0262	39.88
A3-4	5	50	0.0261	39.73
A1-5	5	50	0.0261	39.73
A2-5	5	50	0.0260	39.57
A3-5	5	50	0.0260	39.57
A1-6	5	50	0.0260	39.57
A2-6	5	50	0.0260	39.57
A3-6	5	50	0.0260	39.57
A1-7	5	50	0.0268	40.79
A2-7	5	50	0.0268	40.79
A3-7	5	50	0.0268	40.79
A1-8	5	50	0.0266	40.49
A2-8	5	50	0.0264	40.18
A3-8	5	50	0.0264	40.18

Pruebas estadísticas realizadas a los datos del método propuesto:

Para 5% de C.V.			
n =	24		$H_0 \rightarrow s^2 = \sigma^2$
Media =	40.51		$H_1 \rightarrow s^2 \text{ diferente de } \sigma^2$
s exp =	0.78855		
$s^2 \text{ exp} =$	0.62		$\chi^2 (0.05, n-1) = 35.17246022$
% CV exp =	1.94645		$\chi^2 \text{ exp} = 3.485558591$
% CV teórico =	5		
s teórica =	2.02562		Conclusión = 1
$s^2 \text{ teórica} =$	4.10314		1 = Aceptar $H_0$
$\chi^2 (0.025, n-1) =$	38.0756		0 = Rechazar $H_0$
$\chi^2 (0.975, n-1) =$	11.6885		

Para 5% de C.V. (continuación)			
I. Inferior de confianza =	0.61287		
I. Superior de confianza =	1.10615		
		<s<	
I.C. de s =	0.61287	0.788552433	1.106151126
tstudent (0.025,n-1) =	2.39787		
I.C. =	0.3943		
Conc. en néctar =	40.96 ± 0.3943		

Para 2% de C.V.			
n =	24	H <sub>0</sub> -->	s <sup>2</sup> = σ <sup>2</sup>
Media =	40.51	H <sub>1</sub> -->	s <sup>2</sup> diferente de σ <sup>2</sup>
s exp =	0.7886		
s <sup>2</sup> exp =	0.6218	χ <sup>2</sup> (0.05,n-1) =	35.1725
% CV exp =	1.9464	χ <sup>2</sup> exp =	21.7847
% CV teórico =	2.00		
s teórica =	0.8102	Conclusión =	1
s <sup>2</sup> teórica =	0.6565	1 =	Aceptar Ho
		0 =	Rechazar Ho



## PRECISIÓN DEL MÉTODO OFICIAL AOAC

Datos:

Nombre	mL néctar	Vol. Aforo (mL)	Vol. Titulado (mL)	Vol. Titulante gastado (mL)	Gastado - blanco (mL)	Conc. en néctar (mg/mL)
A1-1	40	100	15	10.8	10.7	54.57
A2-1	40	100	15	10.7	10.6	54.06
A3-1	40	100	15	10.6	10.5	53.55
A1-2	40	100	15	10.8	10.7	54.04
A2-2	40	100	15	10.7	10.6	53.54
A3-2	40	100	15	10.7	10.6	53.54
A1-3	40	100	15	10.9	10.8	54.55
A2-3	40	100	15	10.7	10.6	53.54
A3-3	40	100	15	10.7	10.6	53.54
A1-4	40	100	15	10.9	10.8	55.08
A2-4	40	100	15	10.8	10.7	54.57
A3-4	40	100	15	10.8	10.7	54.57
A1-5	40	100	15	10.8	10.7	54.57
A2-5	40	100	15	10.8	10.7	54.57
A3-5	40	100	15	10.7	10.6	54.06
A1-6	40	100	15	11	10.9	55.59
A2-6	40	100	15	10.9	10.8	55.08
A3-6	40	100	15	10.9	10.8	55.08
A1-7	40	100	15	10.8	10.7	54.57
A2-7	40	100	15	10.8	10.7	54.57
A3-7	40	100	15	10.8	10.7	54.57
A1-8	40	100	15	11	10.9	55.59
A2-8	40	100	15	10.9	10.8	55.08
A3-8	40	100	15	10.9	10.8	55.08

Pruebas estadísticas para los datos de la precisión del Método Oficial:

Para 5% de C.V.			
n =	24	$H_0 \rightarrow s^2 = s^2$	
Media =	54.483951	$H_1 \rightarrow s^2 \text{ diferente de } \sigma^2$	
s exp =	0.6375998		
$s^2 \text{ exp} =$	0.4065334	$\chi^2 (0.05, n-1) =$	35.17246022
% CV exp =	1.1702524	$\chi^2 \text{ exp} =$	1.259931456
% CV teórico =	5		
s teórica =	2.7241975	Conclusión =	1
$s^2 \text{ teórica} =$	7.4212523	1 =	Aceptar $H_0$
		0 =	Rechazar $H_0$

Para 5% de C.V. (Continuación)			
$\chi^2 (0.025, n-1) =$	38.075609		
$\chi^2 (0.975, n-1) =$	11.688534		
I. Inferior de confianza =	0.4955513		
I. Superior de confianza =	0.8944005		
		<s<	
I.C. De S =	0.4955513	0.63759975	0.89440049

tstudent (0.025, n-1) =	2.397873686
-------------------------	-------------

I.C. =	0.318794282
--------	-------------

Conc. En néctar =	54.48 ± 0.3188
-------------------	----------------

Para 2% de C.V.			
n =	24	$H_0 \rightarrow s^2 = \sigma^2$	
Media =	54.48	$H_1 \rightarrow s^2 \text{ diferente de } \sigma^2$	
s exp =	0.6376		
$s^2 \text{ exp} =$	0.4065	$\chi^2 (0.05, n-1) =$	35.1725
% CV exp =	1.1703	$\chi^2 \text{ exp} =$	7.8746
% CV teórico =	2.00		
s teórica =	1.0897	Conclusión =	1
$s^2 \text{ teórica} =$	1.1874	1 =	Aceptar Ho
		0 =	Rechazar Ho

# **BIBLIOGRAFÍA**

## BIBLIOGRAFÍA.

1. Belitz, H.D., Grosch, W., *Química de alimentos*, Edit. ACRIBIA, 2ª edición, Zaragoza España, 1997, p. 915
2. Colegio Nacional de Químicos farmacéuticos biólogos, México A.C., *Guía de validación de Métodos Analíticos*, 2002, p.26 y 29
3. Cunniff P., *Oficial Methods of Análisis of AOAC Internacional*, AOAC Internacional, 16<sup>th</sup> ed., Arlington Virginia U.S.A., 1995, Charper 45, p. 16-18
4. Elaine B. Feldman, *Principios de Nutrición Clínica*, Edit. Manual Moderno, Mexico, D.F., 1990, p. 377-379 y 382.
5. Fennema O., *Química de los alimentos*, Edit. ACRIBIA, Zaragoza España, 1993, p. 550-557.
6. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, *Tablas de composición de los Alimentos, Ingestión diaria recomendada (IDR) de proteínas, vitaminas y nutrimentos inorgánicos para la población mexicana*, 2001.
7. Kirk R, *Composición y Análisis de los Alimentos de Pearson*, Edit. CECSA, México, 2002, p. 759-760.
8. Martínez Sámano S.I., *Validación de un método de análisis de vitamina A en hígado de res por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE)*, Tesis de licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México, D.F., 2005, p. 31-40
9. Miller J. N. y col, *Estadística y Quimiometría para química analítica*, Prentice Hall, España, 2002, 4ª edición.
10. Norma Oficial Mexicana NMX-F-463-1984. Alimentos – Alimentos Para infantes y niños de corta edad - Jugos
11. Osborne D. R. y Voogt P, *Análisis de los nutrientes de los alimentos*, Edit. ACRIBIA S.A., Zaragoza España, 1986, p. 71-73.
12. Ramírez Maya E. M., *Nuevo método por espectrometría UV con segunda derivada para la determinación de ácido ascórbico en jugos de fruta procesados*, Tesis de licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México, D.F., 2002, p. 29.
13. Skoog D.A., *Química analítica*, 7ª edición, Edit. Mc Graw-Hill, México, 2001, p. 575 – 577, 580-583, 608 y 609.
14. Willard H.H., *Métodos Instrumentales de Análisis*, Edit. Compañía Editorial Continental S.A., México, 1991, p. 34-37, 111, 112, 174-176, 504 –509.
15. Wong D. W. S., *Química de los alimentos: Mecanismos y teoría*, Edit. ACRIBIA S.A., Zaragoza, España, 1995, p. 147-150