



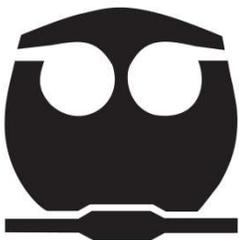
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

---

FACULTAD DE QUÍMICA

Estudio electroquímico del Ácido Ascórbico  
y desarrollo y validación de un método  
electroquímico para su determinación en  
matrices alimentarias

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO DE ALIMENTOS  
P R E S E N T A:  
ALAN RODRIGO GARCÍA CICOUREL



MÉXICO, DF.

2011



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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**

**Presidente:** Prof. José Luz González Chávez  
**Vocal:** Profra. Bertha Julieta Sandoval Guillén  
**Secretario:** Prof. Luis Gerardo Martínez Jardines  
**1er. Suplente:** Profra. Olivia Zamora Martínez  
**2° Suplente:** Profra. Argelia Sánchez Chinchillas

Sitio en donde se desarrolló el tema:

Departamento de Química Analítica  
Laboratorio 104, División de Estudios de Posgrado  
Edificio B, Facultad de Química, UNAM.

Asesor del tema:

---

**Dr. José Luz González Chávez**

Sustentante:

---

**Alan Rodrigo García Cicourel**

*A mi mamá:*

*Gracias por todo lo que has hecho por mí, por ser una madre y un padre, por tu cariño, por todo tu esfuerzo para educarme y salir adelante, por tu confianza y por darme el ejemplo para lograr todo lo que me proponga. Eres la mejor mamá del mundo. Te quiero mucho.*

*A Víctor, Pepis, Jaime y todos mis tíos:*

*Gracias por todo el apoyo y cariño que me dieron, y por la confiar en mí en todo momento. Por sus recomendaciones y por ser un ejemplo para mí. Los quiero.*

*A Ale:*

*Gracias por formar parte de mi vida, por todo tu cariño y apoyo en los momentos difíciles, porque gran parte de mis logros te lo debo a ti. Por ser una persona tan inteligente, cariñosa, alegre y sincera. Por todos los momentos que hemos pasado y pasaremos juntos. Por todo. TE AMO.*

*Al Dr, José Luz:*

*Gracias por todas las enseñanzas y el conocimiento que me ha brindado. Por hacer que descubriera lo que más me gusta. Por todo el apoyo y el tiempo que me ha brindado. Muchas gracias Profesor.*

*A mi abuelita Lydia:*

*Estés donde estés quiero agradecerte por todo el cariño y todos los cuidados que me diste, por que junto con mi mamá, fuiste un pilar para mi formación, por todas las historias que vivimos. Este es tu logro. Te quiero mucho.*

*A Dany, Ale, Mel, Pame y todos mis primos:*

*Por todas las vivencias que pasamos, por su cariño y por ser como los hermanos que no tuve. Los quiero.*

*A Hugo, Víctor y Sara:*

*Por todo su apoyo y cariño. Porque han estado cuando los necesito. Por su sincera amistad. Por todo lo que pasamos y pasaremos. Los quiero. A mis amigos de la universidad por todo lo que compartimos juntos.*

*A la UNAM y a la Facultad de Química:*

*Por todo lo que me dieron para poder salir adelante, por haber sido mi segunda casa, por ser la mejor universidad y la mejor facultad, por tener a los mejores maestros de los que he aprendido mucho. Gracias.*



## ÍNDICE

	PÁGINA
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>4</b>
<b>3. ANTECEDENTES</b>	<b>5</b>
3.1. VITAMINAS	5
3.2. ÁCIDO ASCÓRBICO (VITAMINA C)	7
3.2.1. Características generales	7
3.2.2. Estabilidad y degradación	11
3.2.3. Funciones en el organismo	12
3.2.4. Funciones en los alimentos	15
3.2.5. Principales fuentes de ácido ascórbico	16
3.2.6. Métodos de análisis para el ácido ascórbico	17
3.3. MÉTODOS INSTRUMENTALES DE ANÁLISIS	18
3.3.1. Métodos electroquímicos	18
3.3.1.1. Polarografía	19
3.3.1.1.1. Celdas electroquímicas	20
3.3.1.1.1.1. Celda polarográfica	21
3.3.1.1.2. Corrientes faradáticas y no faradáticas	22
3.3.1.1.3. Electrodo de gota de mercurio	23
3.3.1.1.4. Polarograma	24
3.3.1.1.4.1. Corriente residual	26
3.3.1.1.4.2. Factores que influyen en la forma de los polarogramas	27
3.3.1.1.5. Aplicaciones de la polarografía	29
3.4. VALIDACIÓN DE MÉTODOS DE ANÁLISIS	31
3.4.1. ¿Por qué es necesaria la validación de un método de análisis?	32



3.4.2. ¿Cuándo se deben de validar los métodos de análisis?	33
3.4.3. Grado de validación	34
3.4.4. Parámetros de desempeño a evaluar en un método de análisis	37
<b>4. METODOLOGÍA</b>	<b>40</b>
4.1. MÉTODOS DE ANÁLISIS	40
4.1.1. MÉTODOS VOLUMÉTRICOS	40
4.1.1.1. Determinación de ácido ascórbico con 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP)	40
4.1.1.2. Determinación de ácido ascórbico con yodo (yodometría)	41
4.1.1.3. Determinación de ácido ascórbico con hipoclorito ( $\text{ClO}^-$ )	41
4.1.1.4. Determinación de ácido ascórbico con azul de metileno	42
4.1.2. MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS	42
4.1.2.1. Determinación de ácido ascórbico con azul de metileno	42
4.1.3. MÉTODOS ELECTROQUÍMICOS	43
4.1.3.1. Polarografía	43
4.2. VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS SELECCIONADOS	45
4.2.1. Validación de la determinación de ácido ascórbico con 2,6-diclorofenol indofenol	45
4.2.1.1. Recuperación (linealidad)	45
4.2.1.2. Precisión del sistema	45
4.2.1.2.1. Repetibilidad	45
4.2.1.2.2. Reproducibilidad	45



4.2.2. Validación de la determinación de ácido ascórbico por polarografía clásica	46
4.2.2.1. Linealidad del sistema	46
4.2.2.2. Límite de detección	47
4.2.2.2.1. Estimación del límite de detección	47
4.2.2.2.2. Corroboración del límite de detección	47
4.2.2.3. Precisión del sistema	48
4.2.2.3.1. Repetibilidad	48
4.2.2.3.2. Reproducibilidad	48
4.3. DETERMINACIÓN DE ÁCIDO ASCÓRBICO EN DISTINTAS MATRICES ALIMENTARIAS	49
4.3.1. Determinación por valoración de 2,6-diclorofenol indofenol	49
4.3.2. Determinación por polarografía	50
4.4. NORMALIZACIÓN DE LOS REACTIVOS UTILIZADOS	52
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>53</b>
5.1. MÉTODOS DE ANÁLISIS	53
5.1.1. MÉTODOS VOLUMÉTRICOS	53
5.1.1.1. Determinación de ácido ascórbico con 2,6-diclorofenol indofenol	53
5.1.1.2. Determinación de ácido ascórbico con yodo (yodometría)	58
5.1.1.3. Determinación de ácido ascórbico con hipoclorito ( $\text{ClO}^-$ )	62
5.1.1.4. Determinación de ácido ascórbico con azul de metileno	65
5.1.2. MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS	66



5.1.2.1. Determinación de ácido ascórbico con azul de metileno	66
5.1.3. MÉTODOS ELECTROQUÍMICOS	69
5.1.3.1. Polarografía	69
5.2. VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS SELECCIONADOS	75
5.2.1. Validación de la determinación de ácido ascórbico con 2,6-diclorofenol indofenol	76
5.2.1.1. Recuperación (linealidad)	76
5.2.1.2. Precisión del sistema	77
5.2.1.2.1. Repetibilidad	77
5.2.1.2.2. Reproducibilidad	79
5.2.2. Validación de la determinación de ácido ascórbico por polarografía clásica	81
5.2.2.1. Linealidad del sistema	81
5.2.2.2. Límite de detección	83
5.2.2.2.1. Estimación del límite de detección	83
5.2.2.2.2. Corroboración del límite de detección	85
5.2.2.3. Precisión del sistema	87
5.2.2.3.1. Repetibilidad	87
5.2.2.3.2. Reproducibilidad	89
5.2.3. COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS VALIDADOS	91
5.3. DETERMINACIÓN DE ÁCIDO ASCÓRBICO EN DISTINTAS MATRICES ALIMENTARIAS	92
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>102</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>104</b>



---

<b>8. ANEXOS</b>	<b>107</b>
8.1. ANEXO A: NORMALIZACIÓN DE LOS REACTIVOS UTILIZADOS	107
8.2. ANEXO B: CÁLCULOS PARA DETERMINAR LA CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO ASCÓRBICO	111
8.3. ANEXO C: CÁLCULOS DE INCERTIDUMBRE DEL MÉTODO POLAROGRÁFICO	113



## 1. INTRODUCCIÓN.

Las vitaminas conforman un grupo de compuestos orgánicos considerados como micronutrientes indispensables para el organismo, debido a que los requerimientos del hombre son mínimos. Su importancia se descubrió cuando se observó que la carencia de estos compuestos provocaba cuadros clínicos dramáticos.

Las vitaminas desempeñan diversas funciones como: a) coenzimas o precursores de coenzimas (niacina, tiamina, riboflavina, etc.), b) componentes del sistema de defensa antioxidante (ácido ascórbico, ciertos carotenoides y vitamina E), c) factores involucrados en la regulación genética (Vitaminas A, D, etc.) y d) en funciones especializadas, como la vitamina A en la visión, el ascorbato en diversas reacciones de hidroxilación y la vitamina K en reacciones de carboxilación específicas.

Las principales fuentes de vitaminas son los alimentos. Los alimentos de origen vegetal contienen una mayor proporción de vitaminas hidrosolubles que de liposolubles, situación que se invierte en los alimentos de origen animal.

La adecuación de los métodos analíticos es un serio problema respecto a la determinación de diversas vitaminas. Los factores que la limitan pueden ser de diversa naturaleza, como una falta de especificidad de los métodos químicos tradicionales, interferencias en los ensayos microbiológicos, extracción parcial del compuesto a analizar de la matriz alimentaria y la medida incompleta de las formas de una determinada vitamina. La mejora de los datos analíticos existentes para las vitaminas requiere el apoyo para la investigación de nuevos métodos, una mejora del entrenamiento de los analistas, el desarrollo de protocolos de control de calidad (es decir, validación y normalización de los métodos) y el desarrollo de materiales de referencia normalizados para el análisis de vitaminas.



El ácido ascórbico (vitamina C) juega un papel como agente redox y catalizador en una gran cantidad de reacciones y procesos bioquímicos. La propiedad química más importante del ácido ascórbico es su capacidad de oxidarse de manera reversible formando el ácido L-deshidroascórbico (DHAA), cediendo dos electrones y liberando protones.

El ácido ascórbico existe naturalmente en frutas y hortalizas, y en menor concentración en los tejidos animales y en los productos derivados de los mismos.

Además de su función como nutrimento indispensable, el ácido ascórbico se utiliza ampliamente como un ingrediente o aditivo alimentario debido a sus propiedades antioxidantes y reductoras.

De todas las vitaminas, el ácido ascórbico es la más inestable y lábil, por lo que algunos investigadores han propuesto usar su contenido residual en los alimentos como un índice de retención de nutrimentos, se considera que si resiste el procesamiento, el almacenamiento, etc., quiere decir que todos los demás nutrimentos se verán poco afectados.

Existen muchos métodos para la determinación del ácido ascórbico en los alimentos. El ácido ascórbico presenta absorbancia a una  $\lambda_{\text{máx}} = 245 \text{ nm}$ , lo cual es la base para la determinación espectrofotométrica directa del ácido ascórbico.

Existe un método tradicional para la determinación del ácido ascórbico, de hecho este método es el aprobado por la Association of Analytical Communities (AOAC), el cual consiste en una titulación redox de la muestra con un oxidante, el 2,6-diclorofenol indofenol, que a su vez funciona como indicador de fin de la reacción, durante la cual, la oxidación del ácido ascórbico va acompañada de la reducción del indicador redox a su forma incolora; sin embargo, este método presenta ciertas limitaciones como la interferencia de otros agentes reductores y el no poderse



determinar al ácido deshidroascórbico, el cual también presenta actividad vitamínica.

También se puede determinar al ácido ascórbico mediante métodos electroquímicos, gracias a las propiedades óxido-reductoras de éste. La ventaja de estos métodos es que permiten hacer una determinación simultánea del ácido ascórbico, el deshidroascórbico, isómeros y derivados.

La validación de métodos de análisis es un requisito importante en la práctica de análisis químico; sin embargo, la importancia del porqué y el cuándo debe hacerse, así como saber exactamente qué es lo que se hace, no es un tema cotidiano entre los químicos analíticos.

Validar es hacer una confirmación, mediante un examen y suministro de evidencia objetiva, de que los requisitos particulares para un uso específico de interés son satisfechos.

La validación de un método de análisis, que es una adaptación específica de una técnica analítica para un propósito de medición seleccionado, es un procedimiento para establecer por medio de estudios de laboratorio una base de datos que demuestren científicamente que un método analítico tiene las características de desempeño que son adecuadas para cumplir los requerimientos de las aplicaciones analíticas pretendidas. El objetivo de la validación es demostrar que el método de análisis es conveniente para los fines previstos.



## **2. OBJETIVOS.**

### **Objetivo general.**

- Desarrollar un método electroquímico para la determinación del ácido ascórbico en diferentes matrices alimentarias.

### **Objetivos particulares.**

- Estudiar diferentes métodos de análisis para el ácido ascórbico para comparar sus características.
- Realizar una validación parcial de los métodos de análisis que presenten mejores características.
- Aplicar los métodos de análisis validados en matrices alimentarias para conocer las ventajas y desventajas que presentan al determinar ácido ascórbico.
- Proponer el método que se considere más adecuado y factible, de acuerdo con los parámetros de validación, para la determinación del ácido ascórbico.



### 3. ANTECEDENTES.

#### 3.1. VITAMINAS.

Las vitaminas conforman un grupo de compuestos orgánicos considerados como micronutrientes indispensables para el organismo, no porque sean moléculas pequeñas, sino porque los requerimientos del hombre son mínimos, es decir, que se necesita menos de un gramo al día. Su importancia se descubrió cuando se observó que la carencia de estos compuestos provocaba cuadros clínicos dramáticos. Al principio estos compuestos fueron denominados *vitamine* que deriva del inglés *vital amine*, ya que el primer compuesto que se descubrió fue una amina; sin embargo, se encontró que no todos los compuestos eran aminas, por lo que se designó el nombre de *vitamin* que fue traducido al español como vitamina.

De acuerdo con su solubilidad, éstas se clasifican en: a) vitaminas hidrosolubles (que como su nombre lo indica presentan una gran solubilidad en agua): ácido ascórbico, tiamina, riboflavina, niacina, vitamina B<sub>6</sub>, folato, biotina, ácido pantoténico y vitamina B<sub>12</sub>; y, b) vitaminas liposolubles (las cuales presentan una muy baja solubilidad en agua, y una alta solubilidad en disolventes no polares): vitamina A, vitamina D, vitamina E y vitamina K.

Las vitaminas desempeñan diversas funciones como: a) coenzimas o precursores de coenzimas (niacina, tiamina, riboflavina, etc.); b) componentes del sistema de defensa antioxidante (ácido ascórbico, ciertos carotenoides y vitamina E); c) factores involucrados en la regulación genética (vitaminas A, D, etc.) y d) en funciones especializadas, como la vitamina A en la visión, el ascorbato en diversas reacciones de hidroxilación y la vitamina K en reacciones de carboxilación específicas (Fennema, 2000).

Las principales fuentes de vitaminas son los alimentos, y se sabe que éstas son cuantitativamente los componentes minoritarios. Aunque existen grandes variaciones en las diferentes fuentes de información, se ha determinado que en



general, los alimentos de origen vegetal contienen una mayor proporción de vitaminas hidrosolubles que de liposolubles, situación que se invierte en los alimentos de origen animal; sin embargo hay varias excepciones, como es el caso de las espinacas y de las coles, ricas en vitamina K, o de las oleaginosas que tienen un porcentaje elevado de vitamina E (Badui, 1993).

A pesar de que los alimentos naturales, ya sean de origen animal o vegetal, son una vasta fuente de vitaminas, existe una gran pérdida de éstas debido a los procesos industriales de transformación a los que son sometidos los alimentos para su comercialización, la manera de almacenarlos y la preparación en el hogar. Debido a esto se ha presentado un grave problema de deficiencia de éstas en la población humana, ocasionando un gran número de enfermedades, como el escorbuto. Para ello se ha optado por agregar vitaminas a los alimentos, principalmente a los procesados, con base en los siguientes conceptos:

- Restitución: Adición para reponer la concentración original de las vitaminas importantes.
- Fortificación o enriquecimiento: Adición de vitaminas en cantidades lo suficientemente importantes como para conseguir que el alimento sea más rico que el producto original en cuanto a las vitaminas añadidas. Esta operación puede realizarse añadiendo vitaminas normalmente ausentes en el alimento o, algunas de las que ya contiene, en cantidades superiores a las existentes en el alimento original.

En cuanto al contenido de vitaminas en los alimentos, las principales fuentes de información son el Banco Nacional de Datos sobre Nutrientes, del Departamento de Agricultura y las series No. 8 del Agricultural Handbook, en Estados Unidos, mientras que para México está la Tabla de Composición de los Alimentos del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán (INNSZ); sin embargo, una limitante muy importante de estos datos y de otras bases de datos, es la incierta adecuación de los métodos analíticos utilizados. Con frecuencia no está claro



cómo se obtuvieron los datos, qué métodos se utilizaron y si los resultados procedían de muestras significativas.

La adecuación de los métodos analíticos es un serio problema respecto a la determinación de diversas vitaminas. Los factores que limitan la adecuación de los métodos analíticos pueden ser de diversa naturaleza, como una falta de especificidad de los métodos químicos tradicionales, interferencias en los ensayos microbiológicos, extracción incompleta del compuesto a analizar de la matriz alimentaria y la medida incompleta de las formas complejadas de una determinada vitamina. La mejora de los datos analíticos existentes para las vitaminas requiere el apoyo para la investigación de nuevos métodos, una mejora del entrenamiento de los analistas, el desarrollo de protocolos de control de calidad (es decir, validación y normalización de los métodos) y el desarrollo de materiales de referencia normalizados para el análisis de vitaminas (Fennema, 2000).

### 3.2. ÁCIDO ASCÓRBICO (VITAMINA C).

#### 3.2.1. Características generales.

El ácido ascórbico (vitamina C) juega un papel como agente redox y catalizador en una gran cantidad de reacciones y procesos bioquímicos. Se ha designado, y se utiliza con mucha frecuencia, el nombre de ácido ascórbico para hacer referencia a la vitamina C, ya que ésta presenta una capacidad de curar y prevenir la enfermedad llamada escorbuto, palabra que se deriva del término escandinavo “skjoerberg” y del inglés “scorby”, dando así origen al término ácido ascórbico. De hecho el descubrimiento del ácido ascórbico como vitamina, se debe a la aparición del escorbuto como enfermedad común entre los marineros, la cual se relaciona con la deficiencia de ácido ascórbico en el organismo.

Existen varias sustancias que presentan una actividad biológica de vitamina C; sin embargo, a excepción del ácido L-ascórbico y el ácido deshidroascórbico



(producto de la oxidación del anterior), las demás tienen una importancia nutricional insignificante. Cabe mencionar que sólo los isómeros L son los que tienen una acción vitamínica, y que el ácido deshidroascórbico presenta aproximadamente 80 % de la actividad vitamínica del ácido ascórbico (Fennema, 2000; Badui, 1993).

El ácido L-ascórbico (denominado como AA) es una cetona cíclica (presenta un anillo plano de 5 átomos) que corresponde a la forma enólica de la 3-ceto-1-gulofuranolactona (lo que hace que tenga una estructura muy parecida a la de un carbohidrato), contiene dos centros quirales (Figura 3.1) y posee propiedades ácido-base y óxido reductoras debido al 2,3-enodiol. Es un compuesto muy polar, por lo que es muy soluble en disoluciones acuosas e insoluble en disolventes apolares. El carácter ácido que presenta el ácido ascórbico se debe principalmente a la ionización del grupo hidroxilo en el carbono C-3, aunque también presenta una segunda ionización, la disociación del hidroxilo en el carbono C-2, la cual es mucho menos favorable, (su pka es mucho mayor que el de la primera ionización).

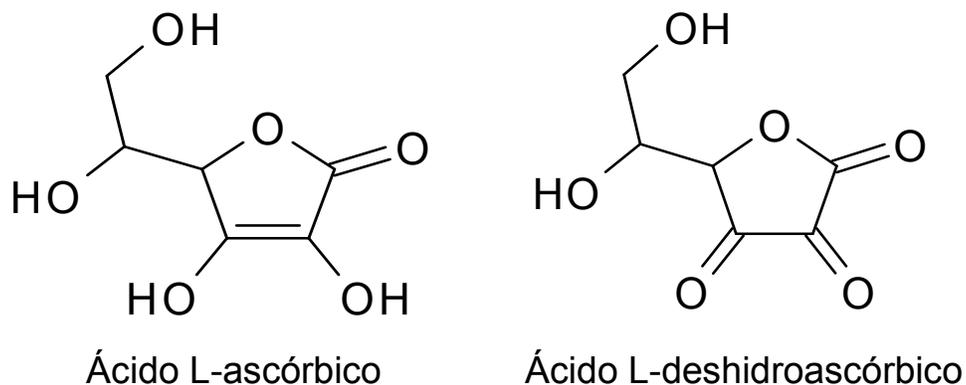


Figura 3.1. Estructura química del ácido L-ascórbico y del ácido L-deshidroascórbico.

Algunas de las propiedades físicas y químicas del ácido ascórbico se presentan en la Tabla 3.1 (Fennema, 2000; Combs, 2008).



Tabla 3.1. Propiedades físicas y químicas del ácido L-ascórbico.

Propiedad	Características
Apariencia	Sólido cristalino, color blanco, inodoro con un cierto sabor ácido
Fórmula	$C_6H_8O_6$
Peso molecular	176,13 g/mol
Punto de fusión	190-192 °C
Densidad	1,65 g/cm <sup>3</sup>
pH	
5 mg/L	3
50 mg/L	2
pka <sub>2</sub>	4,17
pka <sub>1</sub>	11,57
Potencial Normal Estándar	0,166 V (pH 4)
Solubilidad (g/mL)	
Agua	0,33
Etanol 95 %	0,033
Éter	Insoluble
Cloroformo	Insoluble
Longitud de onda de máxima absorbancia (1 %, 1 cm)	
pH 2	245 nm
pH 6,4	265 nm

(Kirk-Othmer, 1978-1984)

La propiedad química más importante del ácido ascórbico es su capacidad de oxidarse de manera reversible formando el ácido L-deshidroascórbico (DHAA), cediendo dos electrones y liberando protones. Esta oxidación puede ocurrir en dos procesos de transferencia de un electrón o como una reacción única de dos electrones. Si la reacción de oxidación se lleva a cabo en dos pasos, se forma un radical libre (compuesto intermediario) llamado ácido semideshidroascórbico, que también posee actividad vitamínica, el cual se oxida, en un segundo paso, perdiendo un electrón para formar el ácido L-deshidroascórbico. Este último es un compuesto muy inestable, debido a la sensibilidad a la hidrólisis del puente de lactona. Dicha hidrólisis, que irreversiblemente forma el ácido 2,3-dicetogulónico (Figura 3.2), es responsable de la pérdida de la actividad vitamínica (Fennema, 2000).

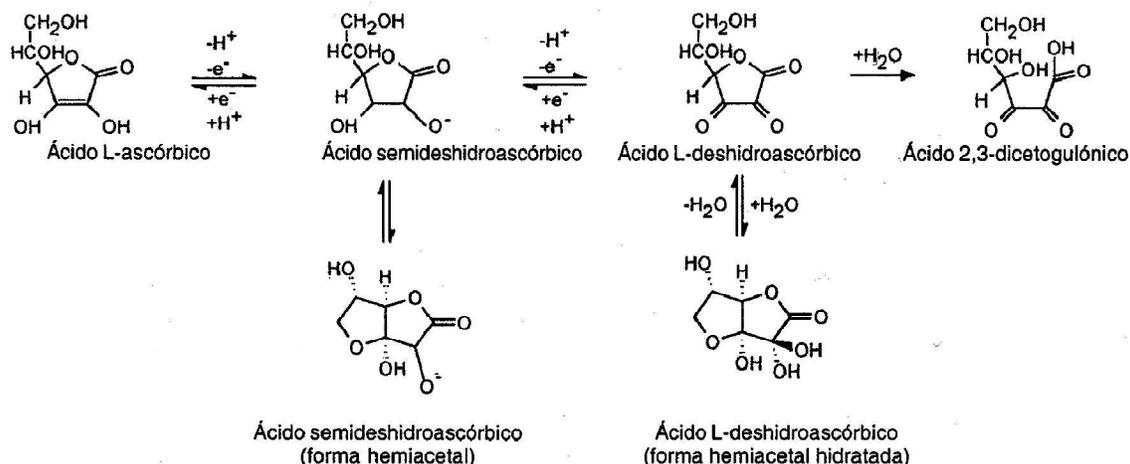


Figura 3.2. Oxidaciones secuenciales de un electrón del ácido L-ascórbico. Todos los compuestos poseen actividad vitamínica excepto el ácido 2,3-dicetogulónico (Fennema, 2000).

La estabilidad del ácido ascórbico en disolución acuosa depende de un gran número de factores, como el pH, la temperatura, la presencia de oxígeno y de metales como el  $\text{Cu}^{2+}$  y el  $\text{Fe}^{3+}$ , que catalizan la reacción de oxidación del ácido ascórbico. De manera general el ácido ascórbico no es muy estable a temperatura ambiente. Alrededor de un pH de 7 la degradación del ácido ascórbico se ve catalizada, dando como resultado más de 50 compuestos, predominando los ácidos mono, di y tricarbónicos. El ácido ascórbico puede ser estabilizado en disoluciones de ácido tricloroacético o ácido metafosfórico (Combs, 2008).

El ácido ascórbico existe naturalmente en frutas y hortalizas, y en menor concentración en los tejidos animales y en los productos derivados de los mismos. En la naturaleza está presente casi exclusivamente en la forma reducida de ácido L-ascórbico. La concentración de DHAA en los alimentos es, casi siempre, sustancialmente más baja que la de AA y depende de las velocidades de oxidación del ascorbato y de la hidrólisis del DHHA a ácido 2,3-dicetogulónico. En ciertos tejidos animales existen enzimas deshidroascorbato reductasa y ascorbato radical libre reductasa, las cuales se cree que protegen al ácido ascórbico mediante un reciclado de éste, y contribuyen a que existan bajas concentraciones de DHAA.



Una propiedad del AA que frecuentemente no se tiene presente es su facultad de actuar, a bajas concentraciones y a alta presión parcial de oxígeno, como prooxidante. Probablemente esto se deba a la formación, mediada por el ascorbato, de radicales hidroxilo u otras especies reactivas (Fennema, 2000).

### 3.2.2. Estabilidad y degradación.

Debido a la gran solubilidad del ácido ascórbico en disoluciones acuosas, siempre existe la posibilidad de que se produzcan importantes pérdidas durante el corte o daños físicos de las superficies de las frutas y hortalizas frescas (Fennema, 2000). Para que el ácido ascórbico se degrade deben de ocurrir tres etapas, la primera es la oxidación de éste formando el ácido deshidroascórbico, la segunda es la hidrólisis del compuesto formado dando el ácido 2,3-dicetogulónico, y por último la oxidación, deshidratación y polimerización de este último compuesto para formar productos nutritivamente inactivos (Badui, 1993).

Los procesos de oxidación y deshidratación del ácido ascórbico siguen un curso paralelo a las reacciones de deshidratación de los azúcares que conducen a la aparición de muchos productos insaturados y polímeros. Los factores primarios que influyen en la velocidad, mecanismo y naturaleza cualitativa de la generación de productos a partir del ácido ascórbico son: el pH, la concentración de oxígeno y la presencia de trazas de catalizadores metálicos (Fennema, 2000).

Para la degradación del ácido ascórbico se ha postulado que ésta se ve catalizada por metales y se da la formación de un complejo ternario del monoaniónascorbato,  $O_2$  y un ion metálico. Este complejo ternario da lugar directamente al ácido deshidroascórbico, sin la aparición del radical intermediario semideshidroascorbato. La pérdida de la actividad vitamínica durante la degradación oxidativa del ácido ascórbico se produce con la hidrólisis de la lactona del ácido deshidroascórbico. Esta hidrólisis se ve favorecida en



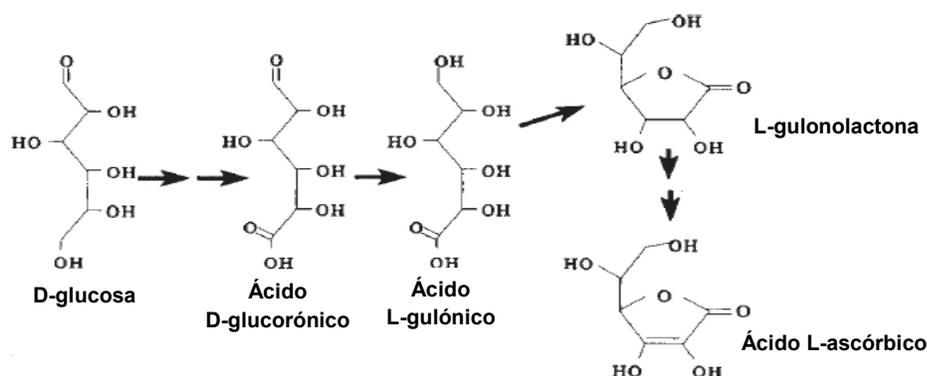
condiciones alcalinas y se sabe que el ácido deshidroascórbico es más estable en un intervalo de pH de 2,5 – 5,5 (Fennema, 2000; Combs, 2008).

De todas las vitaminas, el ácido ascórbico es la más inestable y lábil, por lo que algunos investigadores han propuesto usar su contenido residual en los alimentos como un índice de retención de nutrimentos, se considera que si resiste el procesamiento, el almacenamiento, etc., quiere decir que todos los demás nutrimentos se verán poco afectados.

Por otra parte esta vitamina es más estable a pH ácidos y en actividades acuosas bajas; en ausencia de oxígeno resiste temperaturas de esterilización, aunque se llega a destruir térmicamente por vía no oxidativa de poca importancia que alcanza su máximo a pH 4 (Badui, 1993).

### 3.2.3. Funciones en el organismo.

La mayoría de los seres vertebrados, desde reptiles hasta mamíferos, pueden sintetizar el ácido ascórbico mediante el siguiente camino:



Sin embargo, los seres humanos y otros primates no pueden sintetizar al ácido L-ascórbico, debido a que no expresa el gen (si es que está presente) para la síntesis de la última enzima involucrada en el proceso, la L-gulono- $\gamma$ -lactona oxidasa, debido a esto es indispensable que los seres humanos consuman ácido L-ascórbico proveniente de los alimentos (England, 1986; Rumsey, 1999).



El ácido ascórbico tiene un gran número de funciones bioquímicas que son consecuencia de su habilidad de donar dos electrones. Es requerido para la óptima actividad de una gran cantidad de enzimas envueltas en reacciones de hidroxilación, y en el metabolismo de muchos nutrimentos y fármacos en el organismo. Además, estudios recientes demuestran que el ácido ascórbico es esencial para la amidación enzimática de neuropéptidos, lo cual es importante para la formación de compuestos bioactivos en el cerebro y en el sistema nervioso periférico (Assard, 2004; Machlin, 1991).

Debido a que puede donar electrones y protones, el ácido ascórbico es utilizado en la respiración celular, específicamente en la cadena transportadora de electrones, cuando el NADPH, que es la molécula más utilizada como donador de electrones, está siendo ocupada para alguna otra reacción celular (Zempleni, 2007; Sies, 1992).

Como se mencionó, el ácido ascórbico es requerido para el óptimo funcionamiento de muchas enzimas relacionadas con reacciones de hidroxilación, tales como, la formación del colágeno, la síntesis de la carnitina y norepinefrina, el metabolismo del triptófano, entre otras. Además el ácido ascórbico es capaz de donar electrones a enzimas que participan en el metabolismo de la tirosina, histamina y colesterol (Machlin, 1991).

La función del ácido ascórbico como antioxidante es muy importante y útil en el organismo, ya que es capaz de inactivar radicales libres altamente reactivos, los cuales pueden dañar la célula, mediante la oxidación de la membrana celular. Además se sabe que en esta función el ácido ascórbico sólo dona un electrón, lo que hace que la oxidación de éste puede ser reversible mediante una reacción catalizada por una enzima llamada deshidroascorbato reductasa, la cual utiliza glutatión reducido como cosustrato, dando ascorbato y glutatión oxidado como productos (Sies, 1992).



Desde que la actividad de los radicales libres en el organismo ha sido asociada con efectos dañinos en estructuras extracelulares e intracelulares, se han hecho estudios remarcando que la función antioxidante del ácido ascórbico es muy importante en la protección de las funciones celulares (Machlin, 1991). El daño que provocan los radicales libres en el organismo ha sido asociado principalmente con la oxidación de los lípidos, ADN y proteínas, por lo que la función antioxidante del ácido ascórbico, se basa principalmente en la protección de estas tres moléculas (Zempleni, 2007), de la siguiente manera:

En los lípidos se ha descubierto que el ácido ascórbico posee la habilidad de revertir la peroxidación lipídica. Cuando son generados radicales peroxilo en el citoplasma, el ácido ascórbico es consumido de manera muy rápida por la célula, debido a que éste presenta una gran reactividad con estos radicales, mayor que la reactividad que presentan los lípidos poliinsaturados, lo que detiene la formación y propagación de los radicales libres en el organismo.

El daño oxidativo en el ADN es de particular importancia en las células somáticas, debido al riesgo de mutaciones, lo cual puede conducir a la formación de cáncer o defectos de nacimiento. Al igual que con la oxidación de los lípidos, se ha demostrado que el ácido ascórbico provee un grado de protección con respecto a la oxidación del ADN, aunque actualmente no se conoce el mecanismo de protección.

Para las proteínas el daño se da principalmente en aminoácidos como la tirosina, los aminoácidos N-terminales y la cisteína, los cuales son el principal objetivo de las reacciones de oxidación. Al igual que en las otras dos moléculas, se sabe que el ácido ascórbico presenta una función protectora en la oxidación de las proteínas (Zempleni, 2007).

Además de su función como antioxidante, se sabe que el ácido ascórbico es importante para la óptima actividad de ciertos sistemas para metabolizar



medicamentos, y afecta la absorción intestinal de una gran cantidad de minerales indispensables para el organismo (Machlin, 1991, Englard, 1986).

La deficiencia de ácido ascórbico impide la correcta hidroxilación de la lisina y la prolina, lo cual es necesario para la síntesis normal del colágeno, obteniendo cadenas de procolágeno defectuosas, e impidiendo la síntesis del colágeno, lo cual se conoce como escorbuto.

La primera señal que presenta el escorbuto ocurre aproximadamente 132 después de no haber ingerido ácido ascórbico, en donde se presentan pápulas perifoliculares hiperqueratósicas, el pelo se fragmenta y cae, además de una resequedad marcada en la piel. El siguiente síntoma es la presencia de hemorragias perifoliculares.

Los siguientes síntomas que se presentan son formación de equimosis, que inicia en la parte posterior de las extremidades inferiores, hemorragias en los músculos de los brazos y piernas, hemorragias intraarticulares, afectación en las encías (hinchazón, friabilidad, hemorragias, infecciones secundarias y aflojamiento de los dientes), mala cicatrización de las heridas y reapertura de las recientemente cicatrizadas, hemorragias petequiales en las vísceras y alteraciones emocionales. En estados terminales son frecuentes la ictericia, edemas y fiebre, además de producirse convulsiones, shock y en el peor de los casos la muerte (Englard, 1986, Fennema, 2000, Zemleni, 2007).

#### 3.2.4. Funciones en los alimentos.

Además de su función como nutrimento indispensable, el ácido ascórbico se utiliza ampliamente como un ingrediente o aditivo alimentario debido a sus propiedades antioxidantes y reductoras.



Algunas de las funciones del ácido ascórbico en los alimentos son: inhibir el pardeamiento enzimático al reducir los productos o-quinona, acción reductora en los acondicionadores de la masa para hacer pan, protección de compuestos oxidables como los folatos, secuestrador de radicales libres y de oxígeno, inhibición de la formación de nitrosaminas en carnes curadas y reducción de iones metálicos (Fennema, 2000).

Debido a las propiedades óxidoreductoras del ácido ascórbico, éste presenta una acción antioxidante en los alimentos, inhibiendo la oxidación lipídica, como lo hace en el organismo, mediante varios mecanismos, tales como: secuestrando al oxígeno singulete, reducción de los radicales libres de oxígeno y carbono formando un radical menos reactivo, el semideshidroascorbato, la oxidación preferente del ascorbato agotando al oxígeno presente, y regeneración de otros antioxidantes como el tocoferol (Sies, 1992).

El ácido ascórbico es un compuesto muy polar y por tanto es insoluble en aceites. Sin embargo, el ácido ascórbico es, sorprendentemente, un antioxidante eficaz cuando se dispersa en aceites y también en emulsiones. Las combinaciones de ácido ascórbico y tocoferol son especialmente activas en sistemas oleosos (Fennema, 2000).

### 3.2.5. Principales fuentes de ácido ascórbico.

El ácido ascórbico se encuentra en cantidades significativas en vegetales, frutas y algunos órganos animales como el hígado, riñón y cerebro. Sin embargo, parte del ácido ascórbico contenido en los alimentos se pierde en el proceso de cocción (Zempleni, 2007).

En la tabla 3.2 se presentan algunos alimentos y su contenido de ácido ascórbico.



Tabla 3.2. Contenido de ácido ascórbico en algunos alimentos.

Frutas y carnes	Ácido ascórbico (mg/100 g)	Vegetales	Ácido ascórbico (mg/100 g)
Frutos del árbol <i>Terminaliafernandiana</i> (gubinge)	3000	Chile	125 – 200
Acerola	1300	Col	120 – 180
Escaramujo	1000	Perejil	170
Guayaba	300	Rábano	120
Limón	50 – 80	Brócoli	70 – 160
Fresa	40 – 90	Espinaca	50 – 90
Naranja	40 – 60	Coliflor	60 – 80
Uva	35 – 45	Papa	10 – 30
Mandarina	30	Frijol	10 – 30
Pescado	0 – 3	Chícharo	10 – 30
Carne (res, cerdo)	0-2	Jitomate	10 – 30
Leche		Zanahoria	5 – 10
Humano	3 – 6		
Vaca	1 – 2		

(Lide, 1993-1994; Machlin, 1991; Nagy, 1980)

### 3.2.6. Métodos de análisis para el ácido ascórbico.

Existen muchos métodos para la determinación del ácido ascórbico en los alimentos. El ácido ascórbico presenta absorbancia a una  $\lambda_{\text{máx}} = 245 \text{ nm}$ , lo cual es la base para la determinación espectrofotométrica directa del ácido ascórbico. No obstante, existen otros métodos espectrofotométricos para determinar al ácido ascórbico, ya sea en su forma reducida, por medio de una reacción con fenilhidracina para formar un derivado detectable espectrofotométricamente, el ascorbil-bis-fenilhidracina (Augustin, 1985; Fennema, 2000); o en su forma oxidada como ácido deshidroascórbico, mediante la reacción de éste con o-fenilendiamina, formando un producto de condensación tricíclico muy fluorescente (Worsfold, 2005).

Existe un método tradicional para la determinación del ácido ascórbico (método aprobado por la Association of Analytical Communities (AOAC)), el cual consiste en una titulación redox de la muestra con un oxidante, que a su vez funciona como indicador de fin de la reacción, el 2,3-diclorofenol indofenol, durante la cual, la



oxidación del ácido ascórbico va acompañada de la reducción del indicador redox a su forma incolora. Sin embargo, este método presenta ciertas limitaciones, como la interferencia de otros agentes reductores y el no poderse determinar al ácido deshidroascórbico, el cual también presenta actividad vitamínica (Worsfold, 2005; Chen, 2001).

También se puede determinar al ácido ascórbico mediante métodos electroquímicos, gracias a sus propiedades óxido-reductoras. La ventaja de estos métodos es que permiten hacer una determinación simultánea del ácido ascórbico, el deshidroascórbico, isómeros y derivados (Ensafi, 2010; Zare, 2010).

Muchos métodos basados en la de terminación por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (HPLC por sus siglas en inglés) permiten la determinación precisa del total de ácido ascórbico y con algunos de ellos se puede medir directamente el ácido ascórbico y el deshidroascórbico. La conjunción de una separación cromatográfica con la detección espectrofotométrica, fluorométrica o electroquímica, hace que los análisis por HPLC sean mucho más específicos que los tradicionales métodos de titulación redox (Deutsch, 1993; VanderJagt, 1986; Fennema, 2000).

### 3.3. MÉTODOS INSTRUMENTALES DE ANÁLISIS.

#### 3.3.1. Métodos electroquímicos.

Los métodos electroquímicos incluyen algunas de las técnicas instrumentales más exactas y sensibles. En estos métodos un analito se oxida o se reduce en un electrodo apropiado dentro de una celda electrolítica gracias a la aplicación de un voltaje, y la cantidad de electricidad o corriente usada en la electrólisis se relaciona con la cantidad de éste. Como el potencial al que se oxida o se reduce un analito dado depende de la sustancia específica, se puede lograr selectividad en los métodos electrolíticos si se elige adecuadamente el potencial de electrólisis.



Debido a la especificidad de los métodos, a menudo son innecesarias las separaciones previas, por tanto éstos pueden ser rápidos (Christian, 2009).

Las técnicas electroquímicas son capaces de proporcionar límites de detección excepcionalmente bajos y una abundante información de caracterización que describe los sistemas tratables electrolíticamente. Tal información incluye la estequiometría y la velocidad de transferencia de carga interfacial, la velocidad de transferencia de masa, la extensión de la adsorción o de la quimisorción y las constantes de velocidad y de equilibrio de reacciones químicas (Skoog et al., 2001).

#### 3.3.1.1. Polarografía.

La polarografía pertenece a una serie de métodos llamados voltamperométricos, que son técnicas electroanalíticas que dependen de la medida de corrientes en función del potencial aplicado. En los métodos voltamperométricos se usan condiciones que facilitan la polarización del electrodo de trabajo o indicador. De manera general para favorecer la polarización, los electrodos de trabajo que se utilizan son relativamente pequeños, por lo que los métodos voltamperométricos son esencialmente una electrólisis a microescala usando un microelectrodo de trabajo (Harris, 2007).

La polarografía de barrido lineal fue el primer tipo de voltamperometría desarrollado y utilizado. Difiere de los otros métodos voltamperométricos en dos aspectos: en primer lugar no hay ni migración ni convección, por lo que únicamente la difusión controla las corrientes polarográficas; y en segundo lugar, se utiliza un electrodo de gota de mercurio (EGM) como electrodo de trabajo (Skoog, 2005).

En la polarografía, al ser un método voltamperométrico, se mide la corriente que circula en la celda electrolítica, en donde se oxida o se reduce el analito, en



función del potencial del electrodo de trabajo, la cual suele ser proporcional a la concentración del analito. Las técnicas polarográficas más sensibles tienen un límite de detección próximo a  $10^{-9}$  M y precisión cercana al 5 %. Los métodos polarográficos menos sensibles, que se aplican cuando la concentración del analito es de  $10^{-3}$  M, pueden tener precisión de algunos décimos de unidad porcentual, aunque lo común es que sea de 2 a 3 % (Harris, 2007).

#### 3.3.1.1.1. Celdas electroquímicas.

Muchas reacciones de óxido-reducción se pueden llevar a cabo en cualquiera de dos formas que son físicamente muy diferentes. En una, la reacción se desarrolla colocando el oxidante y el reductor en contacto directo en un recipiente adecuado. En la segunda, la reacción se lleva a cabo en una celda electroquímica, en la cual los reactivos no se ponen en contacto directo uno con el otro (Skoog, 2005).

Una celda electroquímica de corriente continua consta de dos conductores eléctricos llamados electrodos, cada uno sumergido en una disolución adecuada de electrolito. Para que circule una corriente en una celda es necesario que los electrodos se conecten externamente mediante un conductor metálico, que las dos disoluciones de electrolito estén en contacto para permitir el movimiento de los iones de una a otra, y que pueda tener lugar una reacción de transferencia de electrones en cada uno de los electrodos (Skoog et al., 2001).

Hay dos clases de celdas electroquímicas, la voltaica (galvánica) y la electrolítica. En las celdas voltaicas ocurre espontáneamente una reacción química para producir energía eléctrica. Por otro lado, en las celdas electrolíticas se usa energía eléctrica para forzar a que ocurra una reacción química no espontánea, es decir, ir en el sentido opuesto al que iría en una celda voltaica. En ambos tipos de celdas, el electrodo en que ocurre la oxidación se llama ánodo y en el que ocurre la reducción se llama cátodo. Las celdas voltaicas son importantes en métodos electroquímicos como la voltamperimetría, en la que sustancias electroactivas

como los iones metálicos se reducen en un electrodo para producir una cantidad medible de corriente aplicando un potencial adecuado para hacer que ocurra la reacción no espontánea. La corriente que resulta de la electrólisis forzada es proporcional a la concentración de la sustancia electroactiva (Christian, 2009).

### 3.3.1.1.1. Celda polarográfica.

Una celda polarográfica consiste en un electrodo de gota de mercurio (electrodo de trabajo), un electrodo auxiliar o contraelectrodo y un electrodo de referencia, que por lo general es un electrodo saturado de calomel (SCE). En la celda se emplea un potencióstato para controlar el potencial. La corriente del electrodo de trabajo se registra en función de su potencial medido contra el electrodo de referencia, pero el voltaje se aplica entre el electrodo de trabajo y el de referencia, y la corriente pasa también entre estos dos últimos, como se muestra en la Figura 3.3.

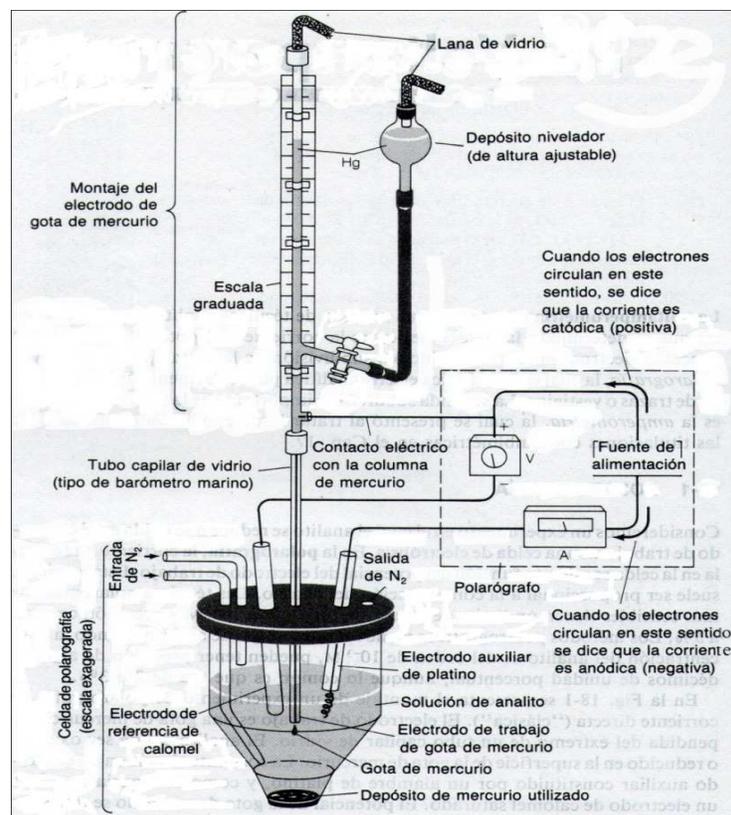


Figura 3.3. Montaje de una celda polarográfica. Electrodo de gota de mercurio (Harris, 2007).



De esta manera, la curva de corriente-voltaje no se ve perturbada por una resistencia apreciable por parte de la disolución, lo cual crea una caída  $iR$  (caída de voltaje) entre el electrodo de trabajo y el contraelectrodo. La ley de Ohm establece que el voltaje es igual al producto de la corriente por la resistencia:  $E = iR$ , donde  $i$  es la corriente en amperios y  $R$  es la resistencia en ohmios. Cuando la corriente fluye, el potencial registrado se distorsiona (se desplaza) en una cantidad igual a  $i \times R$ , donde  $R$  es la resistencia de la disolución. Si es apreciable, esto origina que la curva de corriente potencial se distorsione y se prolongue sobre un intervalo de potencial más grande. Con un sistema de tres electrodos, el potencial registrado es el que se establece entre el electrodo de trabajo y el de referencia, esencialmente sin flujo de corriente y sin caída de  $iR$  distorsionante (Harris, 2007).

#### 3.3.1.1.2. Corrientes faradáticas y no faradáticas.

Dos tipos de procesos pueden dar lugar a corrientes a través de una interfase electrodo/disolución. Una de ellas implica una transferencia directa de electrones vía una reacción de oxidación en un electrodo y una reacción de reducción en otro. A los procesos de este tipo se les llama procesos faradáticos porque están gobernados por la ley de Faraday, que establece que la extensión de una reacción química en un electrodo es proporcional a la intensidad de corriente.

En ciertas condiciones las celdas presentan un intervalo de potenciales donde los procesos faradáticos están excluidos en uno o en ambos electrodos por razones termodinámicas o cinéticas. En estos casos, todavía puede tener lugar la conducción permanente de corriente alterna. Con tales corrientes, tiene lugar una inversión de las relaciones de carga en cada medio ciclo, ya que primero los iones negativos y luego los positivos son atraídos alternativamente a la superficie del electrodo. La energía eléctrica se consume y se convierte en calor debido a la fricción asociada con este movimiento iónico. Así, cada superficie del electrodo se comporta como una placa de un condensador, cuya capacidad puede ser elevada. La corriente capacitiva aumenta con la frecuencia y con el área del electrodo;



controlando estas variables, es posible establecer condiciones en las que esencialmente toda la corriente alterna en una celda sea transportada a través de la interfase del electrodo por este proceso no faradáico (Skoog et al., 2001).

#### 3.3.1.1.3. Electrodo de gota de mercurio.

El electrodo de gota de mercurio (Figura 3.3) consiste en un tubo capilar con diámetro extremadamente pequeño a través del cual sale el mercurio gota a gota, procedente de un depósito cuya altura puede ajustarse. La altura de la columna de mercurio, que se mide a partir del extremo del tubo capilar, típicamente es de 30 cm. La frecuencia de caída de las gotas se controla subiendo o bajando el depósito de mercurio o electrónicamente (Harris, 2007).

El motivo por el que se utiliza un electrodo de gota de mercurio es porque permite obtener corrientes reproducibles en función del potencial. Esta reproducibilidad puede atribuirse a la renovación continua de la superficie de la gota durante su crecimiento. Con cualquier otro electrodo (como el del platino en sus diferentes formas), el potencial depende del estado de la superficie y, por tanto, del tratamiento que haya sufrido previamente (Skoog, 2005).

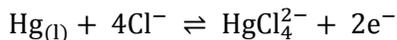
La gran mayoría de las reacciones estudiadas con el electrodo de mercurio son de reducción. En una superficie de platino, se espera que la reducción del disolvente compita con la de muchos analitos, particularmente en disoluciones ácidas, en donde el potencial normal estándar de reducción del  $H^+$  es de 0,0 V. Sin embargo, en la superficie de mercurio existe un importante sobrepotencial de reducción del  $H^+$ , por lo tanto pueden realizarse reacciones termodinámicamente muy difíciles sin la reducción simultánea (y competitiva) del  $H^+$ .

En disoluciones neutras o básicas, aún los cationes de metales alcalinos pueden reducirse más fácilmente que el  $H^+$ , a pesar de que su potencial de reducción es



más bajo. Esto se debe en parte a que el potencial de reducción de un metal que forma amalgamas es más positivo que su potencial de reducción en estado sólido.

Un electrodo de mercurio no es muy satisfactorio para realizar oxidaciones, debido a que el Hg se oxida muy fácilmente. Para la mayoría de las reacciones de oxidación deben emplearse otros electrodos. En medio no complejante, el Hg se oxida hacia los +0,25 V (respecto al ESC). Si la concentración del ion complejante,  $\text{Cl}^-$  es 1 M, el potencial de oxidación del Hg se sitúa cerca de 0,0 V, presentándose a este valor de potencial una onda anódica debido a que la oxidación ocurre más fácilmente, a causa de la estabilidad del compuesto de Hg(II):



No obstante, dicha onda anódica se puede usar para la determinación de iones cloruro (Harris, 2007).

Otra desventaja importante del electrodo de gota de mercurio es la corriente de carga o residual no faradéica, que limita la sensibilidad del método clásico a concentraciones de aproximadamente  $10^{-5}$  M. A concentraciones bajas la corriente residual puede ser mayor que la de difusión, lo cual impide la medida exacta de esta última (Skoog et al., 2001).

#### 3.3.1.1.4. Polarograma.

Un polarograma es una gráfica de la intensidad de corriente en función del potencial. Por ejemplo, en la Figura 3.4 se presenta el resultado de la reducción polarográfica de  $\text{Cd}^{2+}$  en una disolución con HCl, se pueden apreciar dos polarogramas: para una disolución 1,0 M de HCl y  $5,0 \times 10^{-4}$  M de iones cadmio (curva A), y para una disolución 1,0 M de HCl (curva B).

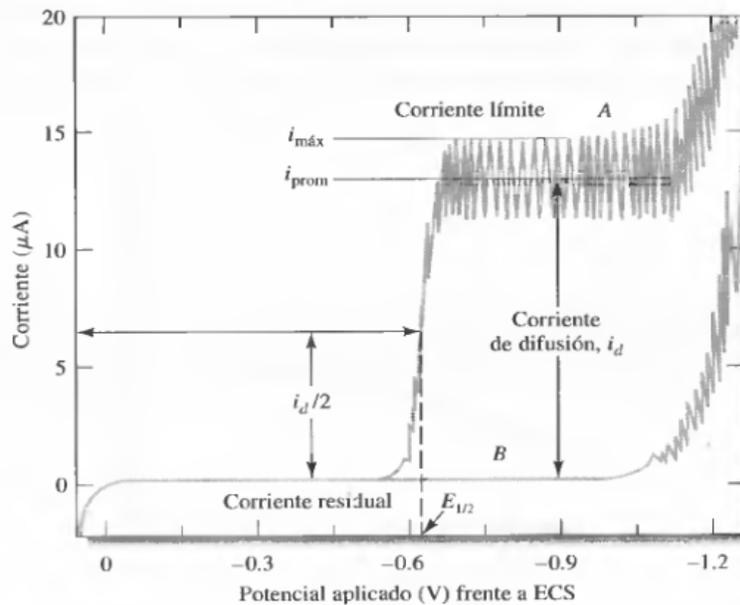
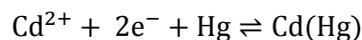


Figura 3.4. Polarogramas de A) disolución 1 M de HCl y  $\text{Cd}^{2+}$   $5 \times 10^{-4}$  M, y B) disolución 1 M de HCl (Skoog, 2005).

La onda polarográfica en la curva A surge de la reducción del cadmio:



donde  $\text{Cd}(\text{Hg})$  indica el cadmio elemental formando una amalgama con mercurio.

Cuando el potencial aplicado sólo es ligeramente negativo con respecto al electrodo de calomel, no hay reducción apreciable del  $\text{Cd}^{2+}$ , sólo circula una pequeña corriente residual. Para un valor de potencial suficientemente negativo, empieza la reducción de  $\text{Cd}^{2+}$  y la corriente aumenta. Después de un incremento brusco de la corriente, se produce una polarización de concentración: el régimen de transferencia electrónica empieza a ser limitado por la velocidad con que el  $\text{Cd}^{2+}$  puede ser transportado por difusión desde el seno de la disolución hasta la superficie del electrodo. La magnitud de esta corriente de difusión ( $i_d$ ) es proporcional a la concentración de  $\text{Cd}^{2+}$  y se aprovecha para el análisis cuantitativo (Skoog, 2005).

### 3.3.1.1.4.1. Corriente residual.

La corriente residual (Figura 3.5) es la señal que se obtiene en un polarograma, cuando se hace un barrido de potencial a una disolución blanco que no contiene muestra, pero que contiene al electrolito soporte. Esta corriente tiene dos fuentes: la primera es la reducción u oxidación de trazas de impurezas que son casi inevitables en la disolución blanco (aunque también contribuyen pequeñas cantidades de oxígeno disuelto, iones de metales pesados del agua destilada e impurezas de la sal empleada).

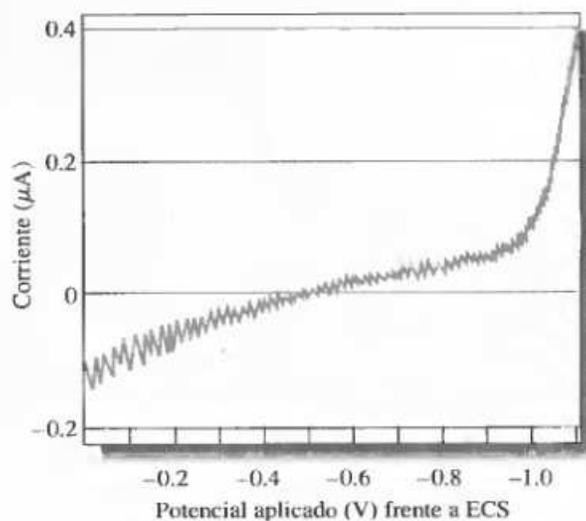


Figura 3.5. Corriente residual de una disolución 0,1 M de HCl (Skoog, 2005).

La segunda fuente es la llamada corriente de carga o de condensador, resultante del flujo de electrones que cargan a las gotas de mercurio; esta corriente puede ser negativa o positiva. A potenciales más negativos que -0,4 V aproximadamente, un exceso de electrones de la fuente de corriente continua proporciona carga negativa a la superficie de cada gota. Estos electrones en exceso acompañan a la gota cuando cae y, como cada nueva gota adquiere carga al formarse, resulta una corriente pequeña pero continua. Si los potenciales aplicados son menos negativos que -0,4 V, el mercurio tiende a ser positivo. Así, al formarse cada gota, los electrones son repelidos de la superficie hacia el interior del mercurio y se

produce una corriente negativa. La superficie del mercurio no tiene carga a  $-0,4$  V y la corriente es igual a 0. Este potencial se denomina potencial de carga cero. La corriente de carga es de tipo no faradámica, en el sentido de que la carga es transportada por la interfase electrodo-disolución sin que tenga lugar ningún proceso de oxidación-reducción.

En última instancia, la exactitud y sensibilidad del método polarográfico dependen de la magnitud de la corriente residual no faradámica y de la exactitud con la que se puede determinar la corrección de este efecto (Skoog, 2005).

#### 3.3.1.1.4.2. Factores que influyen en la forma de los polarogramas.

##### a) Máximos polarográficos de corriente.

Son máximos de corriente que se pueden presentar en las curvas de oxidación o reducción de ciertas sustancias (como se muestra en la Figura 3.6), los cuales son comunes y se atribuyen a corrientes de convección cerca de la superficie del electrodo.

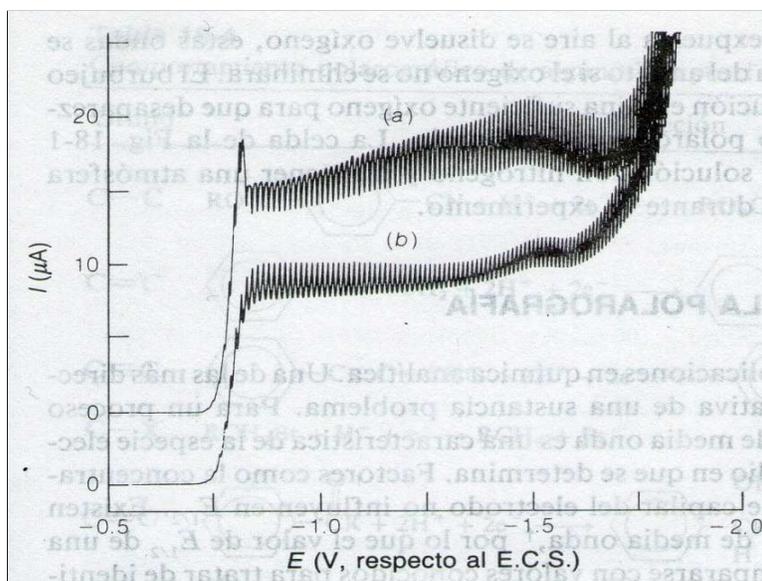


Figura 3.6. Polarogramas de Pb(II) 3 mM y Zn(II) 0,25 mM en NaOH 2 M. a) En ausencia de supresor (máximo polarográfico). b) En presencia de Tritón X-100 (Harris, 2007).

La adición de trazas de ciertos agentes tensoactivos como gelatina, Triton X-100 o rojo de metilo, suele eliminar estas anomalías. Estos agentes se denominan supresores de máximos polarográficos, y es evidente que influyen en el comportamiento convectivo de la disolución. Un exceso de supresor distorsiona el polarograma (Harris, 2007).

b) Oxígeno.

El oxígeno produce dos ondas polarográficas intensas (Figura 3.7). La primera onda se debe a la reducción del oxígeno hasta  $H_2O_2$ , y la segunda corresponde a la reducción a  $H_2O$ .

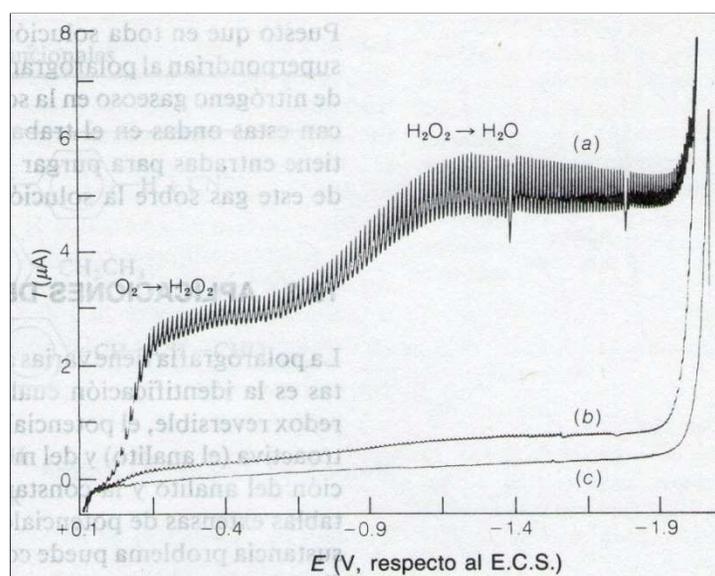
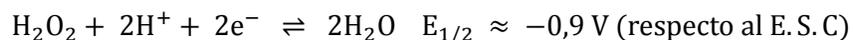
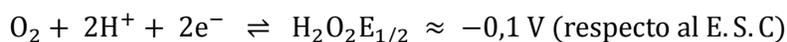


Figura 3.7. Polarograma de una disolución de KCl 0,1 M. a) Disolución saturada con aire. b) Después de burbujear un tiempo con  $N_2$ . c) Después de eliminar el aire por completo (Harris, 2007).

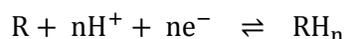


Puesto que en toda disolución expuesta al aire se disuelve oxígeno, estas ondas se superpondrían al polarograma del analito si el oxígeno no se eliminara. El burbujeo de nitrógeno gaseoso en la disolución elimina suficiente oxígeno para que desaparezcan estas ondas en el trabajo polarográfico ordinario (Figura 3.7) (Harris, 2007).



c) Efecto del pH en los polarogramas.

Muchos procesos de oxidación-reducción de compuestos orgánicos y algunos de compuestos inorgánicos implican la participación de iones hidrógeno. Es posible representar la reacción típica como:



donde R y  $RH_n$  son las formas oxidada y reducida, respectivamente, de la especie reactiva. Los potenciales de media onda para compuestos de este tipo son, por tanto, muy dependientes del pH. Por otra parte, modificar el pH podría originar un producto de reacción distinto.

Frecuentemente, y a menos que se amortigüe bien la disolución, un proceso de oxidación-reducción que consume o produce iones hidrógeno modifica el pH de la disolución en la superficie del electrodo de manera considerable. Estos cambios afectan al potencial de reducción de la reacción y causan la deformación e indefinición de las ondas obtenidas. Además, cuando el proceso del electrodo se altera por efecto del pH, se pierde la linealidad en la relación corriente de difusión-concentración. Así pues, el amortiguamiento adecuado de las disoluciones resulta esencial para generar potenciales de media onda y corrientes de difusión reproducibles, principalmente en polarografía de compuestos orgánicos (Harris, 2007).

#### 3.3.1.1.5. Aplicaciones de la polarografía.

a) Análisis cualitativo.

La polarografía tiene muchas aplicaciones en la química analítica. Una de las más directas es la identificación cualitativa de una sustancia problema. Para un proceso redox reversible, el potencial de media onda ( $E_{1/2}$ ) es una característica de la especie electroactiva (el analito) y del medio en el que se determina.



Factores como la concentración del analito y la constante capilar del electrodo no influyen en el  $E_{1/2}$ . Existen tablas extensas de potenciales de media onda, por lo que el valor de  $E_{1/2}$  de una sustancia problema puede compararse con valores conocidos para tratar de identificar las especies por polarografía. Para procesos irreversibles, las ondas son más anchas y  $E_{1/2}$  no es independiente de la concentración o de las características del capilar. Sin embargo, la variación en el potencial de media onda no es suficientemente grande para impedir el uso de la polarografía en el análisis cualitativo.

No es posible la identificación inequívoca de una sustancia problema con un solo valor de potencial de media onda. Sin embargo, una vez que se tiene una lista de iones sospechosos, puede reducirse aún más la lista modificando el medio (electrolito soporte).

Numerosos grupos funcionales orgánicos producen ondas polarográficas. También en este caso los potenciales de media onda pueden ayudar a diferenciar un posible grupo funcional de otro (Harris, 2007).

#### b) Análisis cuantitativo.

La principal aplicación de la polarografía se encuentra en el análisis cuantitativo, puesto que la magnitud de la corriente de difusión es proporcional a la concentración del analito, la altura de una onda polarográfica informa sobre la concentración de analito presente.

El método de análisis cuantitativo más seguro es por medio de curvas de calibración, que consiste en preparar una serie de disoluciones con concentraciones conocidas del analito en una matriz de la misma composición que la disolución problema. Se registra un polarograma de cada disolución y se grafica la corriente de difusión contra la concentración del analito. Finalmente se registra el polarograma de la disolución problema en las mismas condiciones



experimentales. La concentración del analito se determina a partir del valor medido de la corriente de difusión del problema y de la curva de calibración. Además de este método existen otros, como el de adiciones patrón y el de patrones internos (Harris, 2007).

### 3.4. VALIDACIÓN DE MÉTODOS DE ANÁLISIS.

La validación de métodos de análisis es un requisito indispensable en la práctica de análisis químico. (Eurachem, 1998). Validar es hacer una confirmación, mediante examen y suministro de evidencia objetiva, de que los requisitos particulares para un uso específico de interés son satisfechos (CONACyT, 2010).

La validación de un método de análisis, que es una adaptación específica de una técnica analítica para un propósito de medición seleccionado, es un procedimiento para establecer por medio de estudios de laboratorio una base de datos que demuestren científicamente que un método analítico tiene las características de desempeño que son adecuadas para cumplir los requerimientos de las aplicaciones analíticas pretendidas. El objetivo de la validación es demostrar que el método de análisis es conveniente para los fines previstos (EMA, CENAM, 2008).

Se puede interpretar la validación de un método como el proceso de definición de las necesidades analíticas y la confirmación de que el método bajo consideración presenta capacidades de desempeño consistentes con lo que la aplicación requiere. Está implícito, en un proceso de validación de método de análisis, que los estudios para determinar el desempeño de los parámetros del método, se tienen que llevar a cabo usando equipo que se encuentra bajo especificación, trabajando correctamente y con una calibración adecuada. Además de que el operador a cargo de los estudios debe de ser competente en su campo de trabajo y debe de poseer los conocimientos suficientes para poder tomar decisiones apropiadas a partir de los resultados y observaciones obtenidas en los estudios.



La validación de un método de análisis está usualmente relacionada con el desarrollo de métodos de análisis, de hecho muchas veces no es posible determinar exactamente cuándo termina el desarrollo de un método y cuándo comienza la validación. Muchos de los parámetros que se asocian con la validación del método, son usualmente evaluados como parte del desarrollo del método (Eurachem, 1998; ICH, 1994).

La validación parcial o confirmación del método, es una evidencia objetiva para demostrar que, al aplicar un método normalizado, se cumple con las especificaciones del mismo y se cuenta con la competencia técnica para realizarlo adecuadamente tomando en cuenta las instalaciones, equipo y personal de un laboratorio (CCAyAC, 2011).

#### 3.4.1. ¿Por qué es necesaria la validación de un método de análisis?

Millones de mediciones analíticas son hechas cada día en miles de laboratorios alrededor del mundo, por diferentes propósitos como: análisis clínicos, chequeo de la calidad del agua potable, análisis de la composición elemental de una aleación para la construcción de aviones, análisis forense de fluidos biológicos en investigaciones criminales, etc (CONACyT, 2010).

El costo que conllevan estas mediciones analíticas es alto y además acarrear costos adicionales derivados de las decisiones tomadas con base en los resultados. Por ejemplo, pruebas que demuestran que ciertos alimentos son aptos para consumo humano cuando en realidad no lo son, pueden resultar en demandas de las personas que los llegaron a consumir. Por lo que es muy importante determinar los resultados verdaderos y poder mostrar que en realidad son correctos.

Además de los altos costos que puede presentar un resultado erróneo, también puede ser causa de daños a las personas y al medio ambiente, lo cual es una



cuestión muy seria e importante. Por lo que cualquier resultado analítico debe de ser lo suficientemente confiable para poder emitir una decisión correcta con base en este resultado y así evitar un percance a la salud humana o al medio ambiente. Es por esto que los métodos analíticos deben ser validados y se debe determinar la incertidumbre sobre el resultado, la cual debe ser evaluada y citada de manera que sea ampliamente reconocida, consistente y fácil de interpretar (Eurachem, 1998).

#### 3.4.2. ¿Cuándo se deben de validar los métodos de análisis?

Un método de análisis debe de ser validado cuando es necesario verificar que el desempeño de sus parámetros es adecuado para su uso en un particular problema analítico. Por ejemplo:

- en el desarrollo de un nuevo método de análisis para un problema específico;
- en la revisión de un método establecido para incorporar mejoras o extenderlo a un problema nuevo;
- cuando el control de calidad indica que un método establecido está cambiando con el tiempo;
- para un método establecido en un laboratorio diferente, con diferente analista o con diferente instrumentación;
- para demostrar la equivalencia entre dos métodos, por ejemplo entre un método nuevo y uno estándar.

El alcance de la validación o revalidación requerida dependerá de la naturaleza de los cambios hechos para la aplicación de un método en diferentes laboratorios, diferente instrumentación o diferentes analistas, y las circunstancias en las que el método vaya a ser usado (Eurachem, 1998).



### 3.4.3. Grado de validación.

El laboratorio tiene que decidir qué parámetros de eficiencia del método se necesitan caracterizar para validar el método de análisis. La caracterización del desempeño del método es un proceso que puede ser caro e inevitable y estará sujeto a consideraciones de costo y tiempo.

En un problema analítico particular, se deben determinar las características analíticas que definen los requisitos de desempeño que un método debe tener para ser adecuado al momento de resolver el problema analítico. En respuesta a este requisito es posible evaluar si los métodos existentes son adecuados o si es necesario desarrollar un nuevo método.

Este método iterativo es de desarrollo y evaluación continua hasta que el método es capaz de igualarse con el requisito; un desarrollo posterior no es necesario y el trabajo analítico puede proceder. Este proceso de evaluación del criterio de desempeño y la confirmación de que el método es adecuado (Figura 3.8), es la validación del método de análisis.

Comúnmente se deja al criterio del analista el decidir qué parámetro de desempeño del método se requiere, lo que usualmente significa establecer un requisito analítico a la par de la capacidad conocida del método (Eurachem, 1998).

En la Tabla 3.3 se muestra el tipo de preguntas que se pueden plantear para formalizar un requerimiento analítico (columna 1) y los correspondientes parámetros de desempeño del método que pueden necesitar ser caracterizados (columna 2).

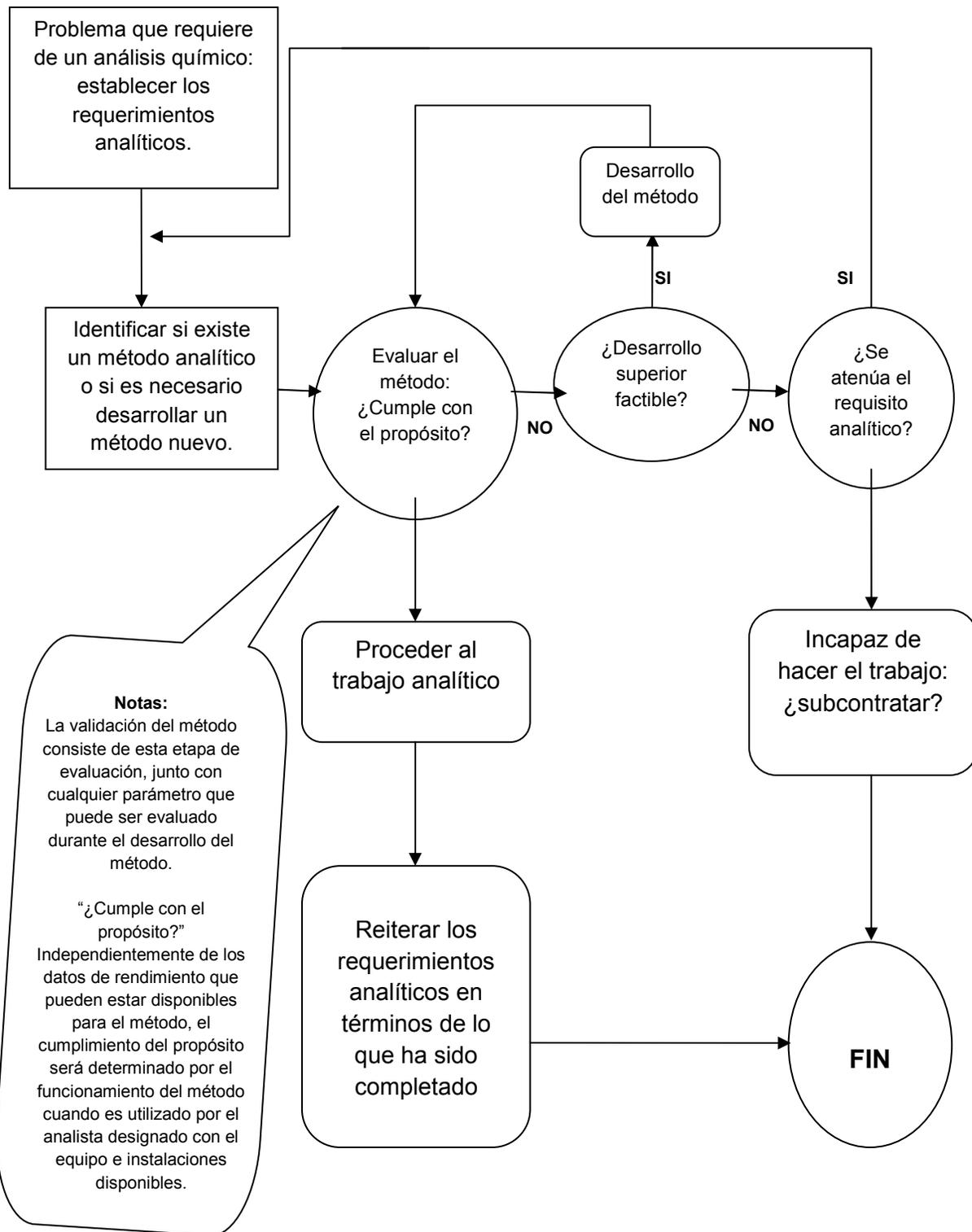


Figura 3.8. Elección, desarrollo y evaluación del método.



Tabla 3.3. Elementos del requerimiento analítico y sus características de desempeño relacionadas.

<b>Elementos del requerimiento analítico.</b>	<b>Características de desempeño relacionadas</b>
¿Qué tipo de respuesta se requiere: cualitativa o cuantitativa?	Confirmación de identidad. Selectividad/especificidad. Límite de detección. Límite de cuantificación.
Si el analito está presente en más de una forma, ¿Está interesado en el analito extraído, libre o total?	Confirmación de identidad. Recuperación.
¿Cuáles son los analitos de interés y en qué cantidad se encuentran (% , $\mu\text{g/g}$ , $\text{ng/g}$ , etc.)?	Confirmación de identidad. Límite de detección. Límite de cuantificación. Intervalo de trabajo y lineal.
¿Qué tan precisa y exacta debe ser la respuesta? / ¿Qué grado de incertidumbre es permitido y cómo se va a expresar?	Recuperación. Exactitud/veracidad. Repetibilidad. Reproducibilidad.
¿Cuáles son las interferencias más probables para el analito?	Selectividad/especificidad.
¿Los resultados necesitan ser comparados con resultados de otros laboratorios?	Robustez. Reproducibilidad.
¿Los resultados necesitan ser comparados con especificaciones externas?	Exactitud. Reproducibilidad.

(Eurachem, 1998)

En la Tabla 3.4 se muestra el criterio que se puede seguir para establecer los parámetros finales de desempeño a evaluar con base en el tipo de método (CCAyAC, 2011).



Tabla 3.4. Parámetros recomendados a evaluar según el tipo de método de análisis a utilizar.

Parámetro de desempeño	Tipo de prueba					
	Espectrofotométrica	Cromatográfica	Potenciométrica	Volumétrica	Gravimétrica	Física
Intervalo lineal y de trabajo	SI	SI	SI	SI	SI	NO
Límite de detección	SI <sup>a</sup>	SI <sup>a</sup>	NO	NO	NO	SI <sup>b</sup>
Límite de cuantificación	SI <sup>a</sup>	SI <sup>a</sup>	SI <sup>a</sup>	SI <sup>a</sup>	SI <sup>a</sup>	NO
Recuperación	SI	SI	NO	SI	SI	NO
Sesgo	SI	SI	SI	SI	SI	NO
Repetibilidad	SI	SI	SI	SI	SI	SI <sup>c</sup>
Reproducibilidad	SI	SI	SI	SI	SI	SI <sup>c</sup>
Incertidumbre	SI	SI	SI	SI	SI	SI <sup>c</sup>
Sensibilidad	SI <sup>d</sup>	SI <sup>d</sup>	SI <sup>d,e</sup>	SI <sup>e</sup>	SI <sup>d</sup>	NO
Selectividad	SI <sup>d</sup>	SI <sup>d</sup>	SI <sup>d,e</sup>	SI	SI	SI <sup>b</sup>
Robustez	SI <sup>d</sup>	SI <sup>d</sup>	SI <sup>d</sup>	SI <sup>d</sup>	SI <sup>d</sup>	SI <sup>d</sup>

<sup>a</sup> Solo para análisis a nivel de trazas (ppm, ppb, ppt)

<sup>b</sup> Solo métodos cualitativos.

<sup>c</sup> Solo métodos cuantitativos.

<sup>d</sup> Solo aplica para métodos no normalizados.

<sup>e</sup> Solo para el análisis de aniones y cationes por ión selectivo

(CCAyAC, 2011)

#### 3.4.4. Parámetros de desempeño a evaluar en un método de análisis.

##### a) Límite de detección.

El límite de detección se refiere a la menor cantidad de analito que puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada bajo las condiciones establecidas



del método de análisis. También se conoce como: concentración neta mínima detectable, límite de determinación o límite de decisión (OAA, 2003).

Cuando las mediciones se realizan para concentraciones bajas del analito, como en un análisis de trazas, es importante conocer cuál es la concentración más baja del analito que puede ser confiablemente detectada por el método. La importancia de determinar el límite de detección y los problemas asociados con éste, provienen del hecho de que la probabilidad de detección no cambia repentinamente de cero a la unidad. Los problemas se han investigado con cierto detalle estadísticamente y se ha propuesto una serie de criterios de decisión.

Para fines de validación, normalmente, el límite de detección es suficiente para proporcionar un indicio del nivel en donde la detección comienza a ser problemática. Para este propósito el valor de la media de 10 blancos independientes más 3-5 veces la desviación estándar ( $\bar{X} + 3-5 \sigma$ ), es suficiente para estimar el valor del límite de detección (Eurachem, 1998).

#### b) Linealidad.

Se define como la habilidad de un método de obtener resultados directamente proporcionales a la concentración del analito. Se infiere que el intervalo lineal es el intervalo de concentraciones del analito sobre las cuales el método da resultados directamente proporcionales a la concentración del analito (ICH, 1994).

#### c) Repetibilidad.

Es la proximidad entre los resultados de mediciones sucesivas del mismo mesurando, realizadas bajo las mismas condiciones de medición, es decir, la aplicación de un mismo procedimiento, a un mismo objeto, por el mismo operador, en intervalos cortos de tiempo, con el mismo equipamiento instrumental y en el mismo lugar (Eurachem, 1998).



d) Reproducibilidad.

Es la proximidad entre los resultados de mediciones de un mismo mesurando, realizadas bajo distintas condiciones de medición (Eurachem, 1998).

e) Especificidad.

Es la capacidad de evaluar inequívocamente el analito en presencia de componentes que se espera que puedan estar presentes. Normalmente estos componentes son impurezas, productos de degradación, componentes de la matriz, etc.

La falta de especificidad en un método analítico puede estar compensada por otros parámetros como: la identificación de la señal del analito, prueba de impurezas del analito y precisión del método (ICH, 1994).

f) Exactitud.

Es la proximidad de concordancia entre el resultado de una medición y el valor de referencia aceptado (CONACyT).



## 4. METODOLOGÍA.

### 4.1. MÉTODOS DE ANÁLISIS.

#### 4.1.1. MÉTODOS VOLUMÉTRICOS.

##### 4.1.1.1. Determinación de ácido ascórbico con 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP).

- a) Construcción de los diagramas de  $E' = f(\text{pH})$  para el ácido ascórbico y el 2,6-diclorofenol indofenol.

Para la construcción de los diagramas de  $E' = f(\text{pH})$  se preparó una disolución de ácido ascórbico reactivo puro pesando 0,25 mg de ácido ascórbico y aforando en un matraz de 25 mL con agua destilada (concentración 1 mg/mL); y una disolución de 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP) reactivo puro pesando 0,025 g de DCPIP y 0,0125 g de bicarbonato de sodio y aforando en un matraz de 250 mL con agua destilada (concentración 0,1 mg/mL).

En la determinación de la variación del potencial como una función del pH para el ácido ascórbico, se tomó una alícuota de 10 mL de la disolución de ácido ascórbico de concentración 1 mg/mL, la cual se fue ajustando a determinados valores de pH desde 0 hasta 14 y midiendo el potencial para cada uno de estos valores. El ajuste de pH se realizó agregando disoluciones de HCl y NaOH. La medición del pH se realizó con un potenciómetro Metrohm modelo 620 pH-meter y un electrodo combinado de membrana de vidrio. El potencial de la disolución se midió con ayuda de un potenciómetro marca Orion Research modelo 701A y un electrodo combinado, compuesto de un electrodo de trabajo de platino y un electrodo de referencia de Ag/AgCl.



Para la construcción del diagrama del 2,6-diclorofenol indofenol, se realiza el mismo procedimiento que para el ácido ascórbico.

b) Valoración del ácido ascórbico con el 2,6-diclorofenol.

En la valoración del ácido ascórbico con el 2,6-diclorofenol indofenol se tomó una alícuota de 0,5 mL de la disolución de ácido ascórbico 1 mg/mL, preparada en el procedimiento anterior, y se transfirió a un vaso de precipitados agregando aproximadamente 9,5 mL de una disolución de ácido acético al 5 % v/v. Se tituló con la disolución de 2,6-diclorofenol indofenol de concentración 0,1 mg/mL.

Para la valoración potenciométrica se fue adicionando un cierto volumen de titulante y midiendo el potencial para cada volumen adicionado hasta obtener un potencial constante mientras que para la colorimétrica sólo se tituló hasta obtener un cambio de color en la disolución (de incoloro a rosa) al menos por 20 segundos.

#### 4.1.1.2. Determinación de ácido ascórbico con yodo (yodometría).

Este método se da mediante una valoración indirecta del ácido ascórbico. Para ello se pesaron 0,1061 g de yodato de potasio ( $\text{KIO}_3$ ) y 2 g de KI, y se disolvieron en medio ácido. Se dejó que se llevara a cabo la reacción entre el  $\text{KIO}_3$  y el KI en oscuridad durante 3 minutos, lo que produce yodo. Después de transcurrido este tiempo se agregaron 0,1069 g de ácido ascórbico y se agitó durante 1 minuto. El yodo que no reaccionó se valoró potenciométricamente y con indicador (almidón soluble) con la disolución normalizada de  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ .

#### 4.1.1.3. Determinación de ácido ascórbico con hipoclorito ( $\text{ClO}^-$ ).

Esta determinación se realizó utilizando una disolución de hipoclorito comercial (Clorox).



Para la titulación del ácido ascórbico se pesaron 0,1081 g de ácido ascórbico y se disolvieron en agua destilada con 0,5 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado. La disolución de ácido ascórbico se tituló potenciométricamente con la disolución de  $\text{ClO}^-$  normalizada.

#### 4.1.1.4. Determinación de ácido ascórbico con azul de metileno.

Se pesaron 0,0996 g de ácido ascórbico, se disolvieron en agua y se valoraron con una disolución de azul de metileno que se preparó pesando 1,0238 g de azul de metileno y aforando en un matraz de 100 mL con agua destilada. La valoración se realizó potenciométricamente.

#### 4.1.2. MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS.

##### 4.1.2.1. Determinación de ácido ascórbico con azul de metileno.

- a) Determinación de la longitud de onda de máxima absorbancia del azul de metileno.

Para esta determinación se preparó una disolución de azul de metileno de concentración de 10 mg/L con un pH aproximado de 13, para la cual se pesó 100 mg de azul de metileno y se aforó en un matraz de 100 mL con agua y después se realizó una dilución 1:100 tomando una alícuota de 1 mL de la disolución preparada y aforando en un matraz de 100 mL con agua destilada a un pH de 13.

De la disolución anterior se tomó una alícuota de 3 mL y se leyó en un espectrofotómetro marca Milton Roy modelo Spectronic 21D con una celda de vidrio, en el intervalo de longitud de onda de 400 a 750 nm, de diez en diez nm, para obtener la curva de absorbancia.



b) Curva de calibración del azul de metileno.

Se tomó la disolución de azul de metileno preparada en el inciso anterior de concentración 10 mg/L como disolución stock. De esta disolución se hicieron diluciones de tal manera que se obtuvieron 7 disoluciones con concentraciones de 0,5, 1, 2,5, 5, 6,5, 8 y 10 mg/L de azul de metileno. Estas disoluciones se leyeron a una longitud de onda de 670 nm, que es la longitud de onda correspondiente a la máxima absorbancia del azul de metileno, con un espectrofotómetro marca Milton Roy modelo Spectronic 21D y una celda de vidrio, y se obtuvo la curva de calibración.

c) Determinación de ácido ascórbico con azul de metileno.

Se preparó una disolución stock de ácido ascórbico  $10^{-3}$  M. Se hicieron 7 determinaciones de concentraciones conocidas de ácido ascórbico, mezclando 5 mL de azul de metileno para las 7 muestras y 0, 0,3, 0,5, 0,7, 1, 1,5 y 2 mL de ácido ascórbico respectivamente, y se dejó que se llevara a cabo la reacción por 5 minutos. Pasado este tiempo se leyó cada muestra. La determinación se realizó utilizando la curva de calibración del azul de metileno

#### 4.1.3. MÉTODOS ELECTROQUÍMICOS.

##### 4.1.3.1. Polarografía.

- a) Selección de electrolito soporte e identificación de la señal de oxidación y linealidad del ácido ascórbico por polarografía clásica y diferencial de pulsos.

Se probaron tres electrolitos soporte, nitrato de potasio ( $\text{KNO}_3$ ), ácido acético (HAc) y el buffer Britton-Robinson (Pungor, 1968), a dos valores de pH, 3,6 y 6, y a dos velocidades de barrido 5 y 10 mV/s. Para ello se prepararon tres disoluciones,



una de  $\text{KNO}_3$  0,1 M, otra de HAc 0,04 M y una disolución del buffer Britton-Robinson que consta de una mezcla de ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) 0,04 M, ácido bórico ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ) 0,04 M y HAc 0,04 M; y se realizaron mediciones polarográficas de cada electrolito, en el polarógrafo en las siguientes condiciones:

<b>Técnica:</b>	Polarografía Clásica
<b>Volumen de electrolito soporte:</b>	20 mL
<b>Tiempo de purga con <math>\text{N}_2</math>:</b>	3 min
<b>Potencial inicial (<math>E_{in}</math>):</b>	0,0 V
<b>Velocidad de barrido (<math>V_{barrido}</math>):</b>	5 y 10 mV/s
<b>Tiempo de goteo (<math>T_{goteo}</math>):</b>	1 gota/s
<b>Sensibilidad:</b>	0,05 mA
<b>Intervalo de trabajo:</b>	1,5 V

Con lo que se determinó la corriente residual para cada electrolito soporte.

Para la identificación de la señal de oxidación del ácido ascórbico por polarografía clásica se hicieron mediciones polarográficas en el equipo mencionado anteriormente, de 6 volúmenes, 100, 200, 300, 400, 500 y 600  $\mu\text{L}$  de una disolución stock de ácido ascórbico 0,1 M, en los diferentes electrolitos soportes, con las condiciones que se mencionaron anteriormente.

La identificación de la señal por polarografía diferencial de pulsos se realizó en los tres electrolitos a prueba, con los mismos volúmenes de la misma disolución stock que se usó para la polarografía clásica, en las siguientes condiciones:

<b>Técnica:</b>	Polarografía diferencial de pulsos
<b>Volumen de electrolito soporte:</b>	20 mL
<b>Tiempo de purga con <math>\text{N}_2</math>:</b>	3 min
<b><math>E_{in}</math>:</b>	-0,2 V
<b><math>V_{barrido}</math>:</b>	10 mV/s
<b><math>T_{goteo}</math>:</b>	1 gota/s
<b>Intervalo de trabajo:</b>	1,5 V
<b>Sensibilidad:</b>	
<b><math>\text{KNO}_3</math></b>	0,05 y 0,1 mA
<b>HAc</b>	0,05 mA
<b>Buffer Britton-Robinson</b>	0,05 mA
<b>Amplitud del Pulso</b>	25 mV



## 4.2. VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS SELECCIONADOS.

### 4.2.1. VALIDACIÓN DE LA DETERMINACIÓN DE ÁCIDO ASCÓRBICO CON 2,6-DICLOROFENOL INDOFENOL.

#### 4.2.1.1. Recuperación (linealidad).

Para la linealidad se hicieron cuatro determinaciones de diferentes volúmenes de una disolución stock de ácido ascórbico de concentración 1 mg/mL, 0,3, 0,5, 0,7 y 1 mL. Al ácido ascórbico se le agregó aproximadamente 10 mL de una disolución de ácido acético al 5 % v/v y se tituló con 2,6-diclorofenol indofenol a una concentración de 0,1 mg/mL. La titulación se hizo con indicador y potenciométricamente, esta última con un potenciómetro marca Orion Research modelo 701A y un electrodo combinado, compuesto de un electrodo de trabajo de platino y un electrodo de referencia de Ag/AgCl.

#### 4.2.1.2. Precisión del sistema.

##### 4.2.1.2.1. Repetibilidad.

Para determinar el parámetro de repetibilidad del método volumétrico, se realizó la valoración por quintuplicado de 3 diferentes cantidades de ácido ascórbico 0,1, 0,5 y 1 mg en 10 mL de una disolución de ácido acético al 5 % v/v, con una disolución de 2,6-diclorofenol indofenol 0,1 mg/mL. Las valoraciones se realizaron con indicador y potenciométricamente.

##### 4.2.1.2.2. Reproducibilidad.

Para el parámetro de reproducibilidad, se hizo la determinación volumétrica por duplicado de tres volúmenes diferentes de ácido ascórbico, 0,1, 0,5 y 1 mL,



tomados de una disolución stock de concentración de 1 mg/mL, durante 3 días, utilizando una disolución de 0,1 mg/mL de 2,6-diclorofenol indofenol. Las disoluciones fueron preparadas cada día y las determinaciones se hicieron potenciométricamente y con indicador.

#### 4.2.2. VALIDACIÓN DE LA DETERMINACIÓN DE ÁCIDO ASCÓRBICO POR POLAROGRAFÍA CLÁSICA.

##### 4.2.2.1. Linealidad del sistema.

Para determinar la linealidad se prepararon tres curvas de calibración provenientes de tres disoluciones stock de ácido ascórbico 0,1 M. La primera disolución stock se preparó pesando 0,1772 g de ácido ascórbico y se aforó en un matraz de 10 mL con agua destilada, la segunda disolución se preparó pesando 0,1768 g de ácido ascórbico y se aforó en un matraz de 10 mL con agua destilada y para la tercera se pesaron 0,1764 g de ácido ascórbico y se aforó en un matraz de 10 mL.

De cada disolución stock se prepararon 6 disoluciones de diferente concentración agregando 100, 200, 300, 400, 500 y 600  $\mu$ L de la disolución stock, respectivamente, se ajustó el pH a 6 y se aforaron en un matraz de 25 mL con agua destilada. Estas disoluciones se midieron en el polarógrafo con las siguientes condiciones:

<b>Técnica:</b>	Polarografía Clásica
<b>Volumen de electrolito soporte (<math>\text{KNO}_3</math> a pH 6):</b>	25 mL
<b>Tiempo de purga con <math>\text{N}_2</math>:</b>	3 min
<b>Potencial inicial (<math>E_{in}</math>):</b>	-0,2 V
<b>Velocidad de barrido (<math>V_{barrido}</math>):</b>	10 mV/s
<b>Tiempo de goteo (<math>T_{goteo}</math>):</b>	1 gota/s
<b>Sensibilidad:</b>	0,05 mA
<b>Intervalo de trabajo:</b>	1,5 V



#### 4.2.2.2. Límite de detección.

##### 4.2.2.2.1. Estimación del límite de detección.

Para la determinación del límite de detección se hizo la medición de 10 blancos que contenían únicamente electrolito soporte ( $\text{KNO}_3$ ) en el polarógrafo marca PAR modelo 174A, con las siguientes condiciones:

<b>Técnica:</b>	Polarografía Clásica
<b>Volumen de electrolito soporte (<math>\text{KNO}_3</math> a pH 6):</b>	25 mL
<b>Tiempo de purga con <math>\text{N}_2</math>:</b>	3 min
<b>Potencial inicial (<math>E_{in}</math>):</b>	-0,2 V
<b>Velocidad de barrido (<math>V_{barrido}</math>):</b>	10 mV/s
<b>Tiempo de goteo (<math>T_{goteo}</math>):</b>	1 gota/s
<b>Sensibilidad:</b>	0,05 mA
<b>Intervalo de trabajo:</b>	1,5 V

##### 4.2.2.2.2. Corroboración del límite de detección.

Se corroboró el límite de detección por medio de la determinación de seis muestras de ácido ascórbico: tres a una concentración igual a la concentración del límite de detección estimado con los 10 blancos ( $1,4444 \times 10^{-4}$  M) y las otras tres al 87,7 % de la concentración del límite de detección ( $1,2666 \times 10^{-4}$  M), las cuales se prepararon a partir de una disolución stock de ácido ascórbico 0,1 M, utilizando como electrolito soporte  $\text{KNO}_3$  0,1 M, leídas en el mismo equipo que se mencionó anteriormente, en las siguientes condiciones:

<b>Técnica:</b>	Polarografía Clásica
<b>Volumen de electrolito soporte (<math>\text{KNO}_3</math> a pH 6):</b>	25 mL
<b>Tiempo de purga con <math>\text{N}_2</math>:</b>	3 min
<b>Potencial inicial (<math>E_{in}</math>):</b>	-0,2 V
<b>Velocidad de barrido (<math>V_{barrido}</math>):</b>	10 mV/s
<b>Tiempo de goteo (<math>T_{goteo}</math>):</b>	1 s
<b>Sensibilidad:</b>	0,05 mA
<b>Intervalo de trabajo:</b>	1,5 V



#### 4.2.2.3. Precisión del sistema.

##### 4.2.2.3.1. Repetibilidad.

El parámetro de repetibilidad se realizó para tres concentraciones diferentes de ácido ascórbico, las cuales fueron tomadas de las curvas de calibración del ácido ascórbico,  $2 \times 10^{-4}$  M,  $1 \times 10^{-3}$  M y  $2 \times 10^{-3}$  M. Para ello se midió 5 muestras de cada concentración preparadas a partir de una disolución stock de ácido ascórbico 0,1 M, que se preparó pesando 0,1768 g de ácido ascórbico y se aforó en un matraz de 10 mL.

Las muestras de concentración  $2 \times 10^{-4}$  M se prepararon tomando una alícuota de 50  $\mu$ L de la disolución stock y aforando a 25 mL, las de concentración  $1 \times 10^{-3}$  M se prepararon tomando 250  $\mu$ L de la solución stock y aforando a 25 mL y las de concentración  $2 \times 10^{-3}$  M tomando 500  $\mu$ L de la solución stock y aforando a 25 mL. A todas las muestras se les ajustó el pH a un valor de 6 antes de aforar.

Las muestras se midieron en el polarógrafo en las siguientes condiciones:

<b>Técnica:</b>	Polarografía Clásica
<b>Volumen de electrolito soporte (KNO<sub>3</sub> a pH 6):</b>	25 mL
<b>Tiempo de purga con N<sub>2</sub>:</b>	3 min
<b>Potencial inicial (E<sub>in</sub>):</b>	-0,2 V
<b>Velocidad de barrido (V<sub>barrido</sub>):</b>	10 mV/s
<b>Tiempo de goteo (T<sub>goteo</sub>):</b>	1 gota/s
<b>Sensibilidad:</b>	0,05 mA
<b>Intervalo de trabajo:</b>	1,5 V

Para cada concentración se calculó el coeficiente de variación.

##### 4.2.2.3.2. Reproducibilidad.

La reproducibilidad se realizó mediante la determinación por duplicado durante 4 días, de tres diferentes concentraciones de ácido ascórbico,  $2 \times 10^{-4}$  M,  $1 \times 10^{-3}$  M y  $2 \times 10^{-3}$  M, las cuales se obtuvieron a partir de una disolución stock de ácido



ascórbico 0,1 M, que fue preparada cada día. Las muestras fueron medidas en el polarógrafo en las siguientes condiciones:

<b>Técnica:</b>	Polarografía Clásica
<b>Volumen de electrolito soporte (KNO<sub>3</sub> a pH 6):</b>	25 mL
<b>Tiempo de purga con N<sub>2</sub>:</b>	3 min
<b>Potencial inicial (E<sub>in</sub>):</b>	-0,2 V
<b>Velocidad de barrido (V<sub>barrido</sub>):</b>	10 mV/s
<b>Tiempo de goteo (T<sub>goteo</sub>):</b>	1 gota/s
<b>Sensibilidad:</b>	0,05 mA
<b>Intervalo de trabajo:</b>	1,5 V

Se calculó el coeficiente de variación para cada concentración de ácido ascórbico.

#### 4.3. DETERMINACIÓN DE ÁCIDO ASCÓRBICO EN DISTINTAS MATRICES ALIMENTARIAS.

##### 4.3.1. Determinación por valoración con 2,6-diclorofenol indofenol.

###### a) Limón.

Para la determinación de la cantidad de ácido ascórbico en el limón se pesaron 0,9920 g de jugo de limón que se mezclaron con 10 mL de ácido acético al 5 % v/v. La determinación se realizó valorando con 2,6-diclorofenol indofenol a una concentración de 0,1 mg/mL, con indicador y potenciométricamente.

###### b) Naranja.

Para esta determinación se pesó 1,0354 g de jugo de naranja y se aforó a 10 mL con ácido acético al 5 %. El procedimiento fue el mismo que para la determinación del limón.



## c) Guayaba.

Se pesó 0,5686 g de guayaba molida e igualmente se aforó a 10 mL con ácido acético al 5 %, siguiendo el procedimiento descrito anteriormente.

## d) Chile.

Para el chile se pesaron 1,1153 g de chile que fue triturado en un molino marca Spex Mixer modelo 8000 con un vial de plástico, en presencia de 5 mL de una disolución de ácido acético al 5 %. La determinación se realizó de la misma forma que para las otras matrices.

#### 4.3.2. Determinación por polarografía.

Para cada muestra se hicieron dos mediciones polarográficas. Cada muestra fue disuelta en el electrolito soporte ( $\text{KNO}_3$  0,1 M) y se ajustó el pH a un valor de 6. Las muestras fueron medidas en el polarógrafo en las siguientes condiciones:

<b>Técnica:</b>	Polarografía Clásica
<b>Volumen de electrolito soporte (<math>\text{KNO}_3</math> a pH 6):</b>	25 mL
<b>Tiempo de purga con <math>\text{N}_2</math>:</b>	3 min
<b>Potencial inicial (<math>E_{in}</math>):</b>	-0,2 V
<b>Velocidad de barrido (<math>V_{barrido}</math>):</b>	10 mV/s
<b>Tiempo de goteo (<math>T_{goteo}</math>):</b>	1 gota/s
<b>Sensibilidad:</b>	0,05 mA (naranja y guayaba) y 0,02 mA (limón, chile y brócoli)
<b>Intervalo de trabajo:</b>	1,5 V

## a) Limón.

Para la determinación polarográfica de la cantidad de ácido ascórbico en el limón, se pesaron para la primera muestra, 5,0416 g de jugo de limón, y para la segunda muestra 5,1421 g aforando a 25 mL con el electrolito soporte.



## b) Naranja.

Para la muestra uno se pesaron 5,0656 g de jugo de naranja y para la muestra dos 5,0712 g y se aforó a 25 mL con el electrolito soporte.

## c) Guayaba.

Se pesaron 3,2411 g para la muestra uno y 3,2436 g de guayaba molida para la muestra dos y se aforó a 25 mL con el electrolito soporte.

## d) Chile.

Para la determinación de ácido ascórbico en chile se pesaron 2,4395 g para una muestra y 3,7536 g para la otra, lo cual se trituró con 5 mL de ácido acético al 5 % v/v, en un molino marca Spex Mixer modelo 8000 con un vial de plástico. La suspensión resultante de la molienda se pasó por papel de filtración rápida, debido a que quedaron partículas suspendidas después de la molienda y se preparó como las demás muestras.

## e) Brócoli.

Para el brócoli se pesaron 7,1343 g y 5,4259 g, los cuales fueron molidos en las mismas condiciones y con el mismo equipo que se utilizó para moler el chile. La suspensión resultante se pasó por papel de filtración rápida y se prepararon las muestras de la misma manera que las anteriores.



#### 4.4. NORMALIZACIÓN DE LOS REACTIVOS UTILIZADOS.

- a) Normalización de la disolución de tiosulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ). Para la determinación de ácido ascórbico con yodo

Se realizó la normalización de la disolución de tiosulfato de sodio que se preparó pesando 6,2045 g de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  reactivo puro y se aforó en un matraz volumétrico de 250 mL. Esta disolución se utilizó para valorar una cierta cantidad de yodo proveniente de una reacción redox entre 0,1009 g de dicromato de sodio ( $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) y 2 g de yoduro de potasio (KI) en medio ácido. La valoración se realizó potenciométricamente y con ayuda de un indicador colorido (en este caso almidón soluble).

- b) Normalización de la disolución de  $\text{ClO}^-$  (Clorox).

Para esta determinación de ácido ascórbico se utilizó el limpiador comercial Clorox, el cual es una disolución de  $\text{ClO}^-$ , cuya concentración no está reportada en el envase, por lo que se determinó la concentración de hipoclorito en el limpiador. Para la determinación de la concentración de la disolución de hipoclorito se tomó una alícuota de 1 mL del producto comercial, se transfirió a un vaso de precipitados que contenía 2 g de KI y se adicionó 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado y agua destilada.

El  $\text{I}_2$  resultante de la reacción del  $\text{ClO}^-$  con el KI en medio ácido se tituló potenciométricamente con la disolución de  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ , preparada en la determinación anterior.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### 5.1. MÉTODOS DE ANÁLISIS.

#### 5.1.1. MÉTODOS VOLUMÉTRICOS.

##### 5.1.1.1. Determinación de ácido ascórbico con 2,6-diclorofenol indofenol.

La determinación de ácido ascórbico con 2,6-diclorofenol indofenol se basa en una reacción redox entre las dos sustancias. Esta determinación se puede llevar a cabo gracias a que el 2,6-diclorofenol indofenol, que es la especie oxidante, posee un potencial normal estándar de 0,700 V (Ksenzhek et al., 1977) a un pH de 0, mayor que el potencial normal estándar del ácido ascórbico (agente reductor), 0,390 V a un pH de 0, lo que hace que estas dos especies puedan reaccionar entre sí cuantitativamente (Figura 5.1).

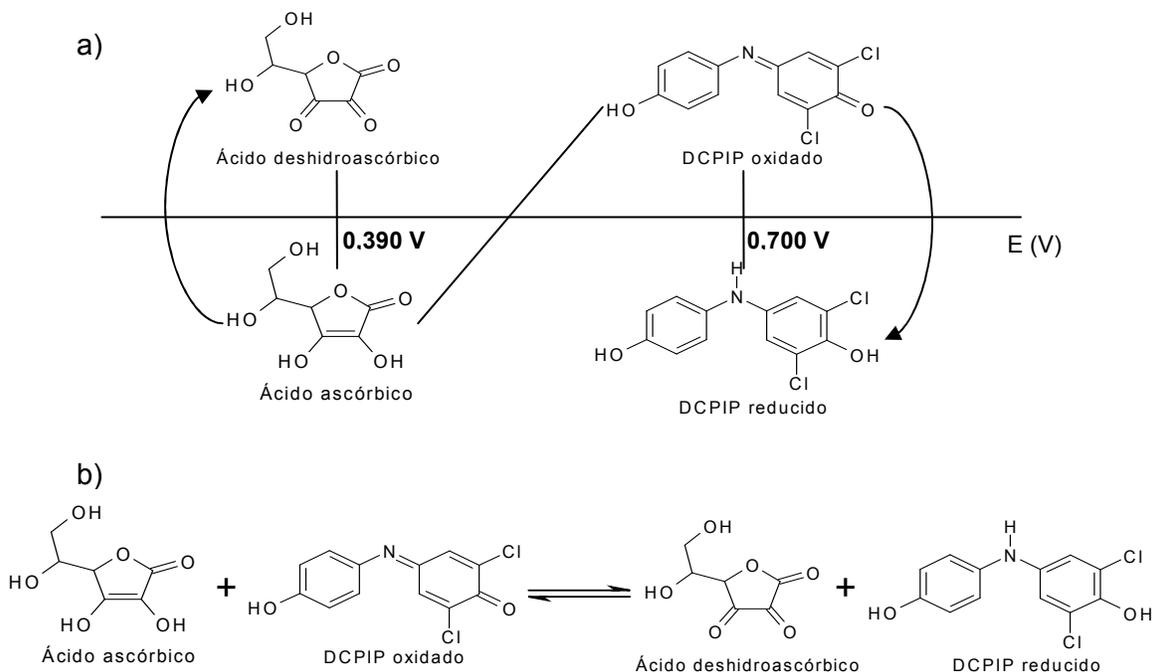


Figura 5.1. a) Escala de potencial en donde se observa que el ácido ascórbico es capaz de reaccionar con la forma oxidada del 2,6-diclorofenol indofenol. b) Reacción balanceada entre el ácido ascórbico y el DCPIP.



dando como productos ácido deshidroascórbico y la forma reducida del DCPIP.

- a) Construcción de los diagramas de  $E'=f(\text{pH})$  para el ácido ascórbico y el 2,6-diclorofenol indofenol.

Como se puede observar en el Gráfico 5.1, el potencial normal estándar de las dos especies involucradas en la determinación, el ácido ascórbico y el DCPIP, varían con el pH del medio. Se puede notar que ambos potenciales disminuyen conforme el pH aumenta; sin embargo, en todo el intervalo de pH el potencial del ácido ascórbico siempre es menor que el potencial del DCPIP, lo que indica que, termodinámicamente, siempre habrá una reacción espontánea entre las dos especies, ya que la constante de equilibrio de la reacción redox siempre será mayor a 1, por lo que se podría suponer que no importa el valor de pH al que se lleva a cabo la determinación, sin embargo la cuantitatividad de la reacción puede cambiar.

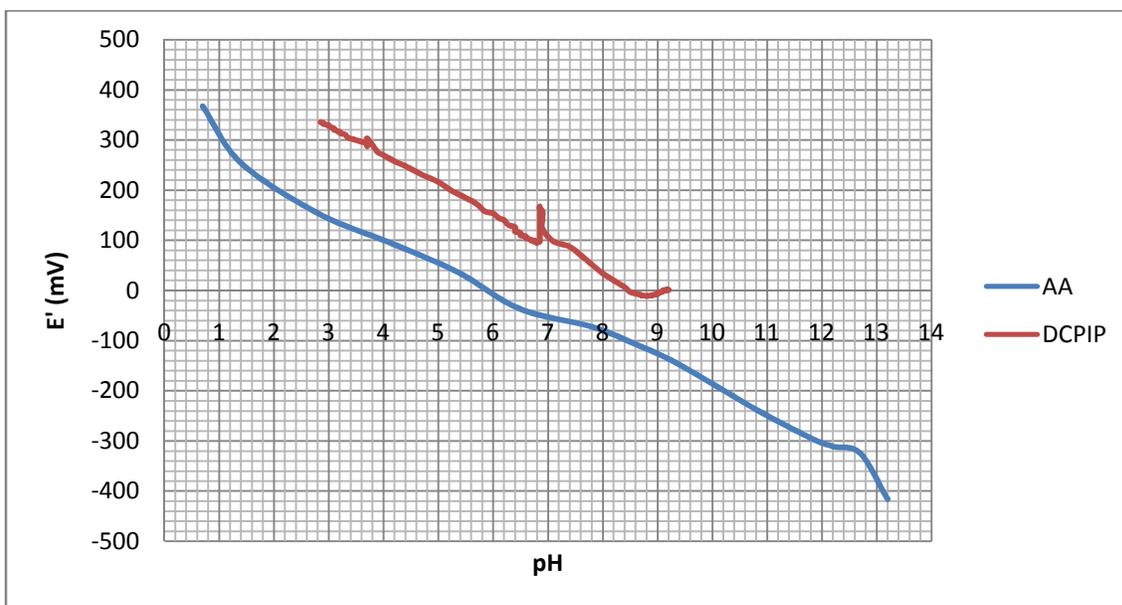


Gráfico 5.1. Diagramas de  $E'=f(\text{pH})$  para el ácido ascórbico y para el 2,6-diclorofenol indofenol.

Esta determinación se hace en presencia de ácido acético al 5 %, por lo que el pH del medio es ácido ( $\text{pH}=2,38$ ). Esto se hace debido a que en medios con un pH superior a 7 el ácido ascórbico se degrada muy fácilmente formando otros



compuestos que pueden no presentar reacción con el DCPIP, lo que interfiere con la determinación y porque también a pH muy altos (10-12), el DCPIP es muy inestable.

A este valor de pH se tiene que la diferencia de potencial entre los dos sistemas es de 0.180 V, lo que da un valor de constante de equilibrio de la reacción entre el ácido ascórbico y el 2,6-diclorofenol indofenol de  $10^6$ .

Además el medio ácido hace que el DCPIP funcione como un indicador para detectar el punto final de la valoración. Lo cual se da gracias a que la forma oxidada del DCPIP es de color azul en medios neutros o alcalinos y vira a un color rosa cuando se encuentra en medios ácidos, mientras que la forma reducida del DCPIP es incolora a cualquier valor de pH. En la determinación se titula con la forma oxidada del DCPIP preparada en medio alcalino (ya que se agrega bicarbonato de sodio a la disolución), que es de color azul, el cual al reaccionar con el ácido ascórbico en el medio ácido se reduce y forma una especie incolora, lo que hace que el medio también sea incoloro. Cuando ya no hay ácido ascórbico que reaccione con el DCPIP, éste estará en exceso en la disolución, y al estar en medio ácido, el DCPIP vira a un color rosa permitiendo detectar el punto final de la valoración.

b) Valoración del ácido ascórbico con 2,6-diclorofenol indofenol.

Para la valoración potenciométrica se obtuvo una curva de titulación (Gráfico 5.2), que representa la valoración de una especie reductora (ácido ascórbico) con un agente oxidante (DCPIP). En ésta, el potencial del sistema debe ir aumentando conforme se va agregando el titulante, sin embargo, en la gráfica se puede observar que primero se tiene una caída de potencial, es decir, el potencial empieza a disminuir respecto al potencial inicial, conforme se va aumentando el volumen del titulante agregado, y después de un cierto volumen de titulante éste comienza a aumentar. Lo anterior se debe a que al inicio sólo se tiene un reductor en la disolución, que es el ácido ascórbico, lo que hace que el potencial esté



indefinido. Para que se tenga un potencial definido en la disolución se necesita un oxidante y un reductor para que haya una transferencia de electrones y se alcance un equilibrio.

Esta caída de potencial podría indicar que cuando se tiene una pequeña cantidad de volumen de titulante agregado, la reacción entre el DCPIP y el ácido ascórbico sería de cinética lenta, lo que hace que el potencial de la disolución no se estabilice rápidamente y presente fluctuaciones que dificultan su lectura. A pesar de esto se puede notar que la curva de valoración presenta un gran salto de potencial, lo que sirve para determinar el volumen de titulante que se ocupó para valorar todo el ácido ascórbico, el cual es el punto de inflexión de la curva.

El punto de inflexión de la curva de titulación, que indica el punto final de la valoración, se determina con la primera derivada de la curva de titulación, la cual se presenta en el Gráfico 5.3. El máximo de este gráfico representa el volumen de DCPIP gastado en el punto final de la titulación, el cual es de 8,55 mL, con lo que se obtiene que la cantidad de ácido ascórbico que se tenía en la disolución es de 0,5193 mg. Esta cantidad no es la misma que la cantidad de ácido ascórbico que se había puesto al principio, 0,5 mg (valor calculado considerando el peso del reactivo, el aforo y la alícuota utilizados, aunque este valor conlleva una incertidumbre); sin embargo, es un valor muy cercano (Tabla 5.1). La diferencia entre el valor obtenido y el valor verdadero se puede deber a que la curva de valoración potenciométrica no se encuentra bien definida, debido a la cinética de la reacción, o a la incertidumbre del método, la cual sería necesario calcular para determinar si la concentración obtenida por la determinación es la misma que la que se tenía inicialmente.

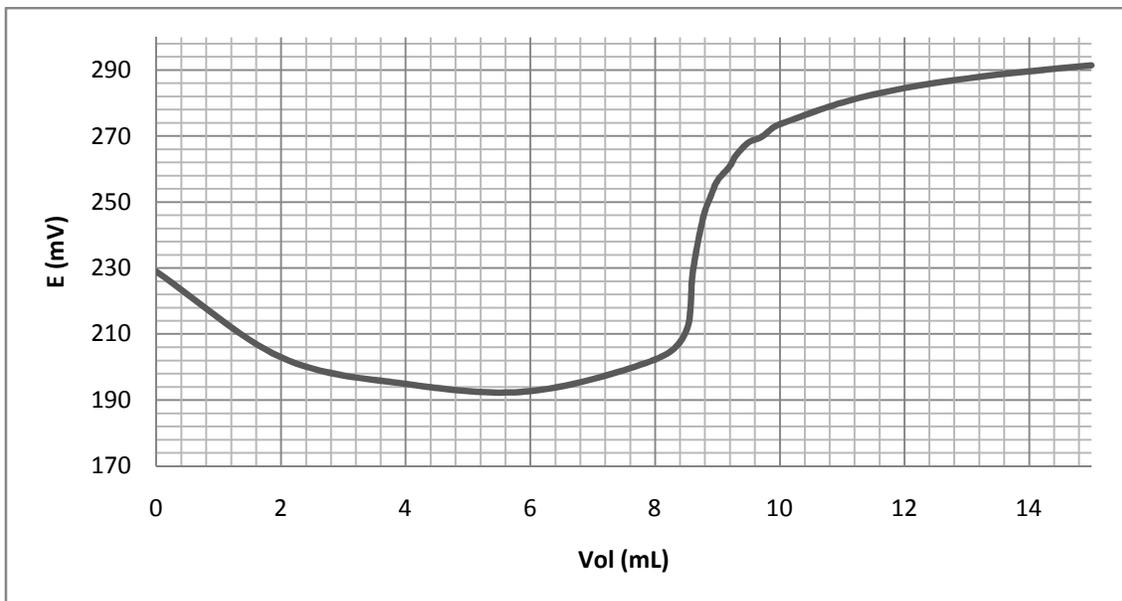


Gráfico 5.2. Curva de la valoración potenciométrica del ácido ascórbico con 2,6-diclorofenol indofenol.

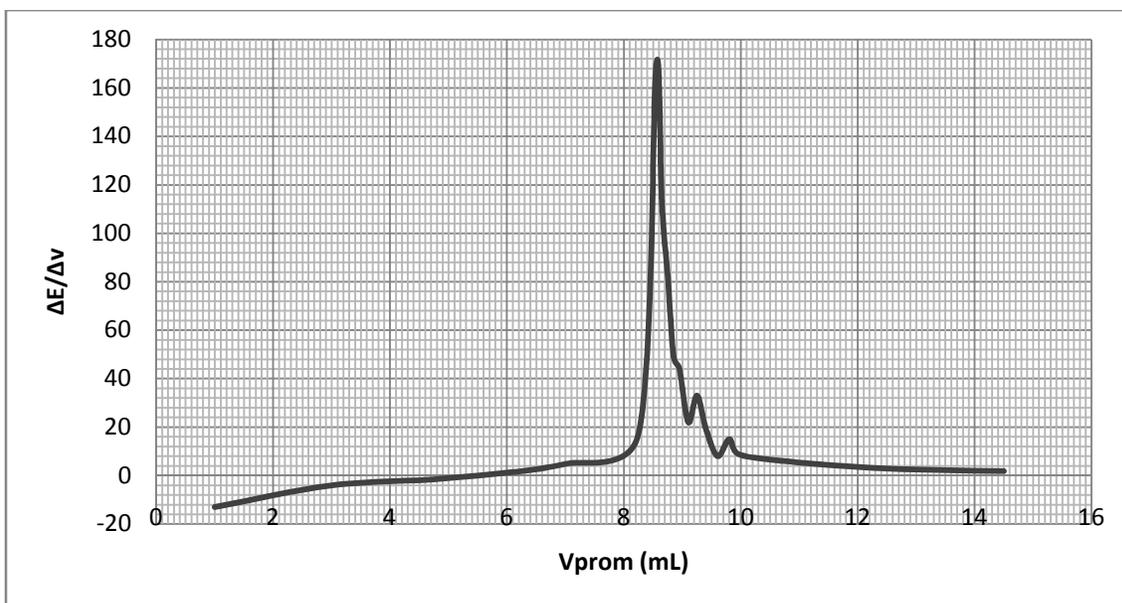


Gráfico 5.3. Primera derivada de la valoración potenciométrica del AA con DCPIP.

En cuanto a la valoración realizada con indicador se obtiene que el volumen final de la titulación es de 8,9 mL, con lo que se determina que la cantidad de ácido ascórbico que se tenía en la disolución es de 0,5409 mg, lo cual es un valor que difiere (8,18 %) de la cantidad de ácido ascórbico con la que se trabajó, 0,5 mg (Tabla 5.1), tal vez debido al uso del indicador.



Tabla 5.1. Resultados de la determinación de ácido ascórbico por valoración con 2,6-diclorofenol indofenol.

	Cantidad inicial de ácido ascórbico (mg)	Volumen de DCPIP gastado (mL)	Cantidad determinada de ácido ascórbico (mg)
Titulación potenciométrica	0,5	8,55	0,5193
Titulación con indicador	0,5	8,9	0,5409

5.1.1.2. Determinación de ácido ascórbico con yodo (yodometría).

El yodo es un agente oxidante que se puede usar para titular agentes reductores moderadamente fuertes. Cuando se agrega un exceso de yoduro a una disolución de un agente oxidante, se produce yodo en una cantidad equivalente al agente oxidante presente. Por tanto, este  $I_2$  se puede titular con un agente reductor. El agente titulante que se usa es el tiosulfato de sodio normalizado (Ver anexo A). A esta técnica se le conoce como yodometría (Christian, 2009).

Debido a que el yodo (oxidante) posee un potencial normal estándar de 0,54 V, superior al potencial normal estándar del ácido ascórbico (reductor), estas dos especies pueden reaccionar entre sí, formando yoduro y ácido deshidroascórbico, como se muestra en la Figura 5.2.

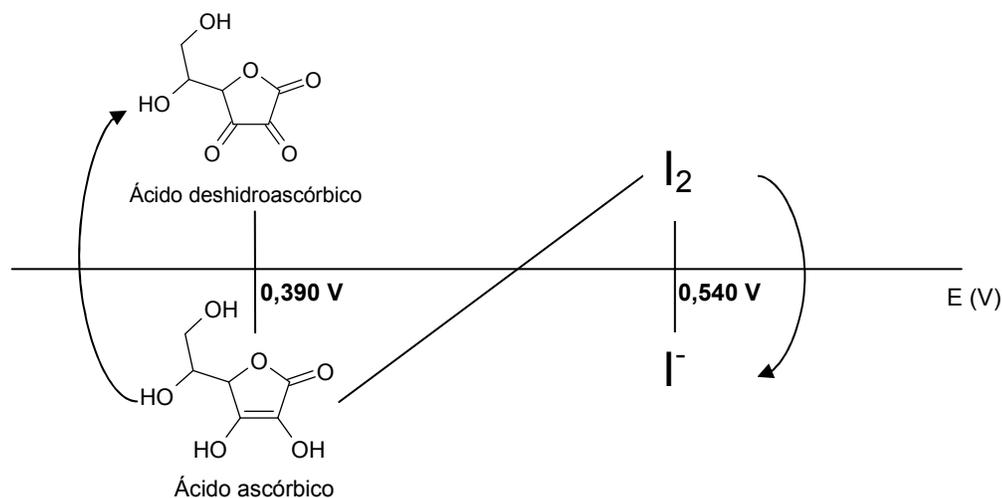
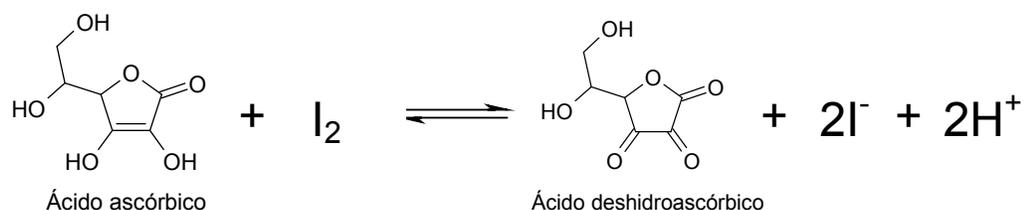


Figura 5.2. Escala de potencial en donde se observa que el ácido ascórbico es capaz de reaccionar con el yodo.



Esta determinación se basa en la producción de un exceso de  $I_2$ , a partir de una reacción redox entre el yoduro ( $I^-$ ) y el yodato ( $IO_3^-$ ), el cual se hace reaccionar con ácido ascórbico. El  $I_2$  sobrante (que no reaccionó con el ácido ascórbico) se titula con tiosulfato de sodio ( $Na_2S_2O_3$ ), con lo que se puede determinar la cantidad de yodo que reaccionó con el ácido ascórbico y así la concentración inicial de este último. La detección del punto de equivalencia de la titulación del  $I_2$  con  $S_2O_3^{2-}$  se hace potenciométricamente o con indicador (almidón soluble, el cual se agrega a la disolución cuando está a punto de titularse todo el yodo (amarillo muy tenue), dando una coloración azul, debido a la formación de un complejo entre el yodo y el almidón), el cual vira a incoloro cuando se titula todo el yodo (rompimiento del complejo). Lo anterior se representa en la Figura 5.3.

a)



b)



Figura 5.3. a) Reacción entre el yodo en exceso, que se formó a partir de la reacción de yoduro y yodato, con ácido ascórbico. b) Reacción entre el yodo que no reaccionó con el ácido ascórbico y el tiosulfato.

El Gráfico 5.4 representa la curva de titulación potenciométrica del  $I_2$  con tiosulfato, que corresponde a la valoración por retroceso del ácido ascórbico. Esta curva presenta un comportamiento decreciente, es decir, el potencial disminuye en función del volumen de titulante agregado, ya que muestra la valoración de un oxidante ( $I_2$ ) con un reductor ( $S_2O_3^{2-}$ ). Otra cosa que se puede observar es que la curva de valoración está bien definida y no presenta fluctuaciones en los valores de potencial, lo cual significa que la reacción entre el yodo y el tiosulfato es de cinética rápida en todos los puntos de la valoración, a diferencia de la



determinación con DCPIP, es decir, la reacción de óxido-reducción entre estas dos especies alcanza el equilibrio de una manera rápida.

En esta valoración se obtiene un salto de potencial de 180 mV, el cual es mayor al que existe en la determinación del AA con DCPIP (60 mV), lo que significa que la constante de equilibrio de la reacción entre el yodo y el tiosulfato (cuyo  $E^\circ = 0,100$  V (Harris, 2007)) es mayor que la de la reacción entre el AA y el DCPIP. Es posible aseverar esto, ya que en los dos sistemas se intercambia el mismo número de electrones (dos), por lo que la constante de equilibrio sólo depende de la diferencia de potencial en los dos sistemas. Para la reacción entre el yodo y el tiosulfato el valor de la constante de equilibrio es  $K_{eq} = 10^{14.67}$ , a cualquier valor de pH, ya que el potencial de los 2 sistemas no depende de este último, mientras que la constante de equilibrio para la reacción con 2,6-diclorofenol indofenol tiene un valor de  $K_{eq} = 10^6$  a un pH de 2,38, que es el pH de trabajo.

Gracias a que la curva de titulación está bien definida, es posible determinar fácilmente el punto final de la valoración, que corresponde al punto de inflexión de la curva, con ayuda de la primera derivada de la valoración de  $I_2$  con  $S_2O_3^{2-}$ . Del máximo del Gráfico 5.5 se obtiene que el volumen final de la titulación es de 17,45 mL, valor con el cual se determina la cantidad de ácido ascórbico que se tenía en la disolución, que es de 0,1078 g. El valor obtenido es muy similar a la cantidad inicial de ácido ascórbico que se tenía, 0,1069 g (Tabla 5.2); sin embargo, para decir si la concentración determinada es igual a la inicial es necesario realizar una prueba de hipótesis.

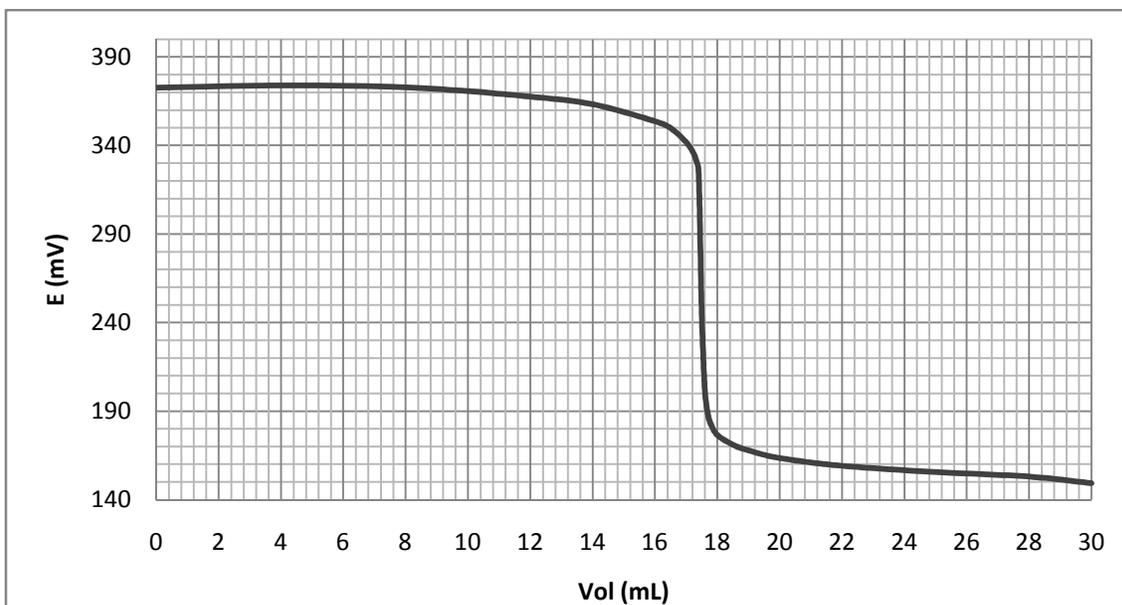


Gráfico 5.4. Valoración con tiosulfato del yodo que no reaccionó con el AA. Valoración indirecta del AA.

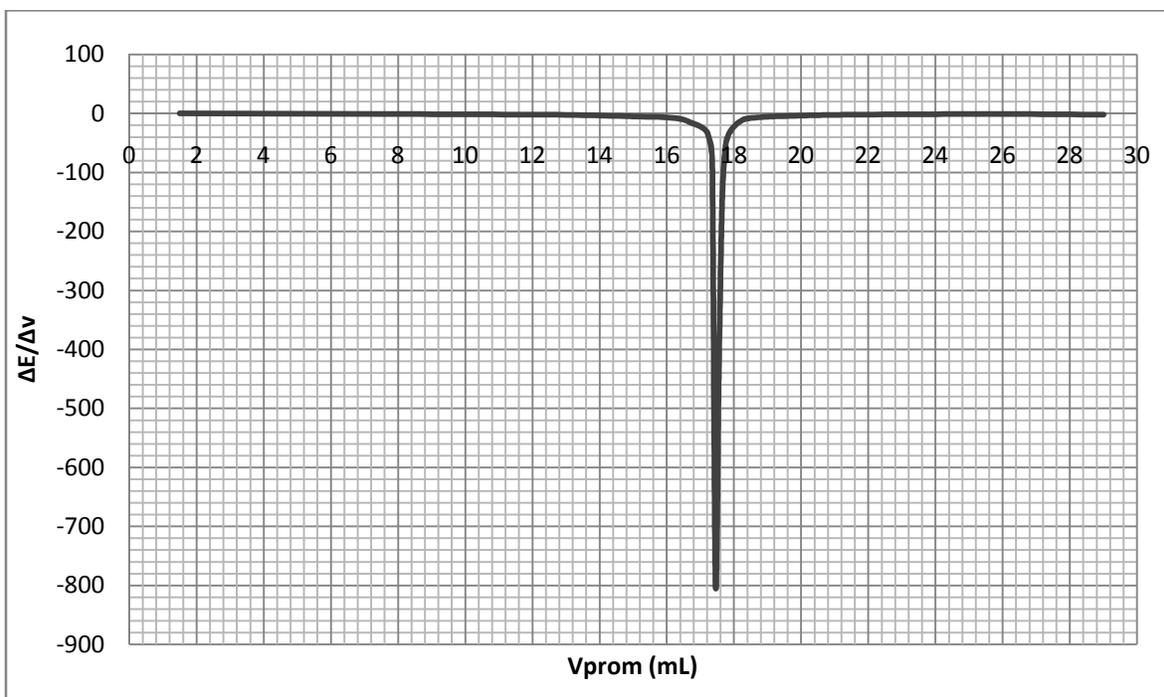


Gráfico 5.5. Primera derivada de la valoración de yodo con tiosulfato.

En cuanto a la valoración con indicador, se utilizó una disolución de almidón soluble, el cual forma un complejo de color azul con el yodo. Cuando se termina de titular todo el yodo el complejo de yodo-almidón, se rompe y la disolución se vuelve incolora, indicando el punto final de la titulación. El volumen gastado de



tiosulfato para esta determinación es de 17,7 mL, el cual indica que la cantidad determinada de ácido ascórbico es de 0,1062 g (Tabla 5.2). A pesar de que el volumen gastado en la valoración con indicador es mayor que el obtenido en la determinación potenciométrica, la cantidad de ácido ascórbico calculado en la primera es mayor al calculado en la segunda. Esto se debe a que el volumen corresponde al tiosulfato gastado para valorar al yodo que no reaccionó con el ácido ascórbico, lo que significa que en la valoración con indicador se determinó una mayor cantidad de yodo sin reaccionar, lo cual se puede deber a la poca estabilidad del yodo y al error que se tiene por el uso del indicador.

Tabla 5.2. Resultados de la determinación de ácido ascórbico por valoración con yodo.

	Cantidad inicial de ácido ascórbico (mg)	Volumen de DCPIP gastado (mL)	Cantidad determinada de ácido ascórbico (mg)
<b>Titulación potenciométrica</b>	0,1069	17,45	0,1078
<b>Titulación con indicador</b>	0,1069	17,7	0,1062

#### 5.1.1.3. Determinación de ácido ascórbico con hipoclorito ( $\text{ClO}^-$ ).

El hipoclorito ( $\text{ClO}^-$ ) es un agente oxidante capaz de reaccionar con el ácido ascórbico (Figura 5.4) debido a que posee un potencial normal estándar de 1,630 V a pH 0, mayor que el potencial normal estándar del ácido ascórbico. La ventaja de esta determinación es que el hipoclorito de sodio se puede obtener de limpiadores comerciales como el Clorox, y solamente se necesita hacer una normalización de este hipoclorito para determinar su concentración real (Ver anexo A).

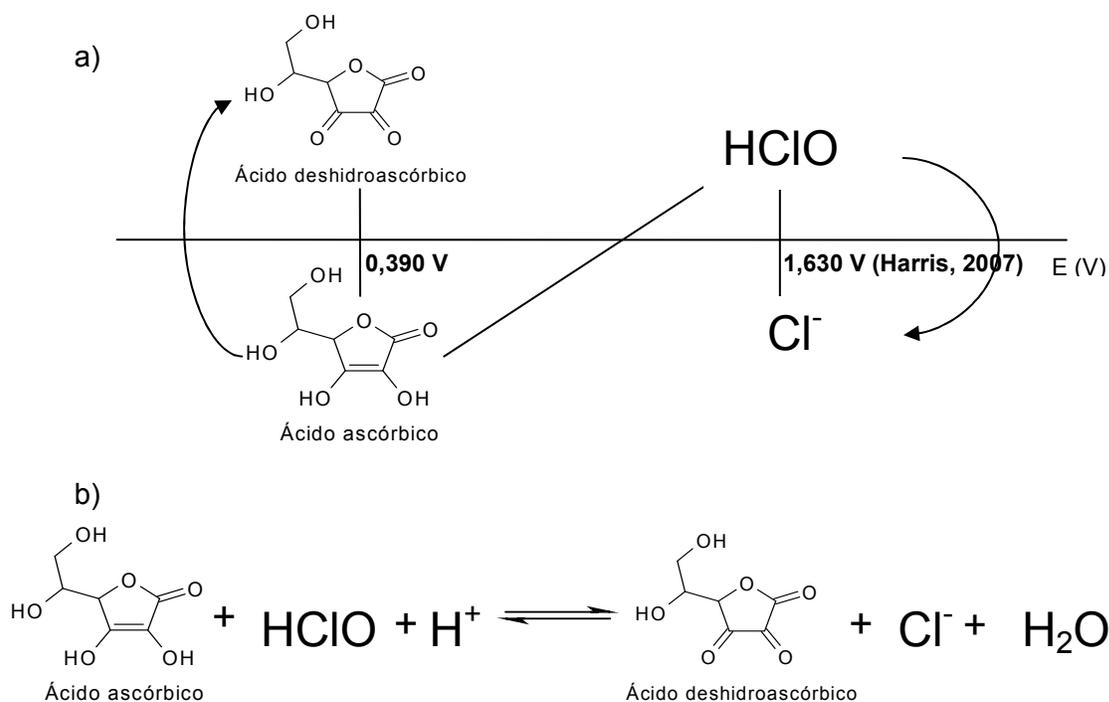


Figura 5.4. a) Escala de potencial en donde se observa que el ácido ascórbico es capaz de reaccionar con el hipoclorito. b) Reacción balanceada entre el ácido ascórbico y el hipoclorito.

Como se puede observar en el Gráfico 5.6, la curva de valoración del ácido ascórbico con hipoclorito presenta un comportamiento creciente, diferente al comportamiento de la valoración de yodo con tiosulfato y similar a la determinación de ácido ascórbico con DCPIP, ya que esta determinación se basa en la valoración de un reductor con un oxidante, por lo que el potencial aumenta en función del volumen de titulante agregado.

También se nota que el potencial presenta una pequeña fluctuación, es decir, hay partes de la curva en donde el potencial decrece en vez de aumentar, esto puede deberse a que el agente titulante, que es el hipoclorito, al provenir de un limpiador, se encuentra en una disolución donde existen otro tipo de sustancias, como el peróxido de hidrógeno, que poseen propiedades redox y pueden influir en el potencial, lo cual se ve más marcado cerca del punto final de la valoración, aunque la curva esté lo suficientemente bien definida. Esto se puede notar mejor en el gráfico que representa la primera derivada de la valoración (Gráfico 5.7).

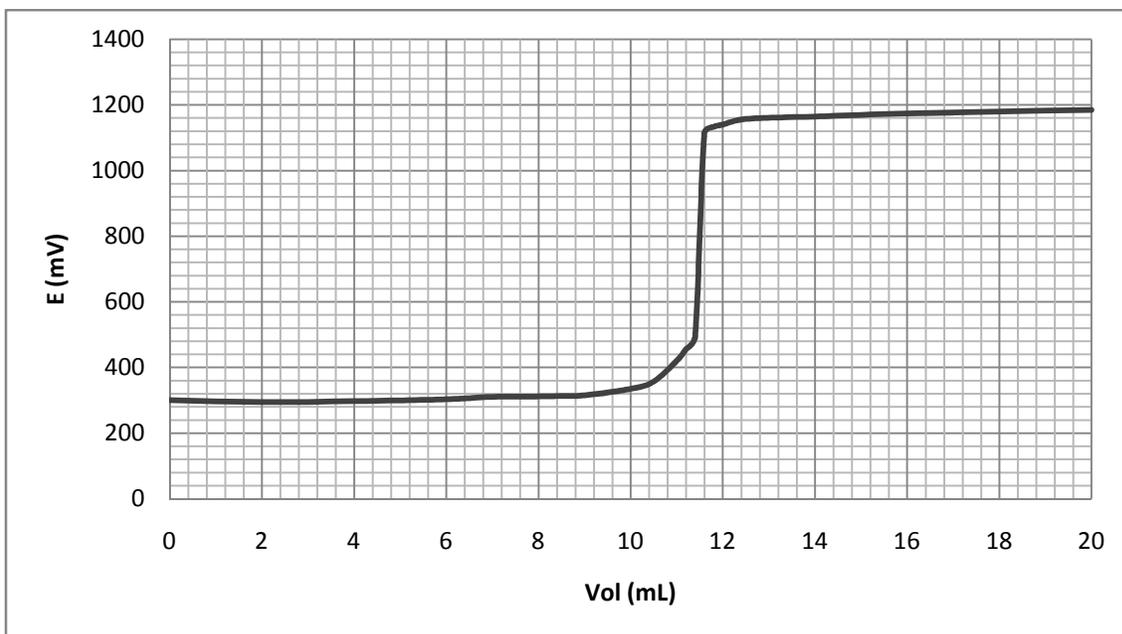


Gráfico 5.6. Valoración potenciométrica del ácido ascórbico con hipoclorito.

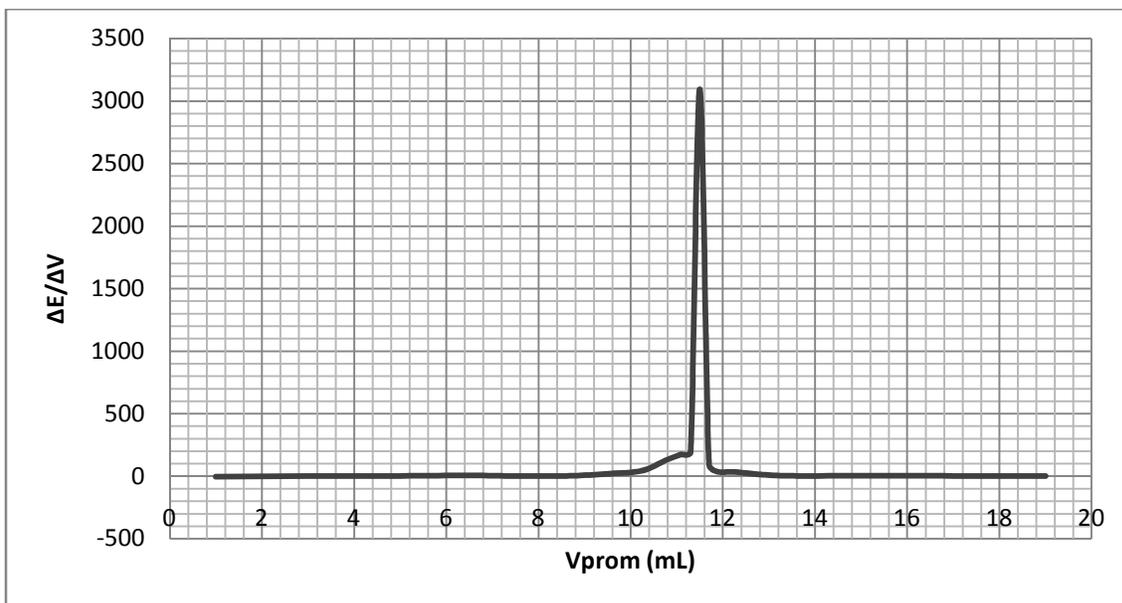


Gráfico 5.7. Primera derivada de la valoración potenciométrica del ácido ascórbico con hipoclorito.

En el Gráfico 5.7 es posible determinar el volumen que corresponde al punto final de la titulación del ácido ascórbico con el hipoclorito, el cual es de 11,5 mL. Con este volumen se calcula la cantidad de ácido ascórbico presente en la disolución, la cual es de 0,1019 g (Tabla 5.3), que es un valor muy cercano (98 %) al de la cantidad inicial de ácido ascórbico (0,1037 mg), sin embargo, difiere más que las



concentraciones determinadas con los métodos de análisis mencionados anteriormente.

Tabla 5.3. Resultado de la determinación de ácido ascórbico por valoración con hipoclorito.

	Cantidad inicial de ácido ascórbico (mg)	Volumen de DCPIP gastado (mL)	Cantidad determinada de ácido ascórbico (mg)
<b>Titulación potenciométrica</b>	0,1037	11,5	0,1019

#### 5.1.1.4. Determinación de ácido ascórbico con azul de metileno.

El azul de metileno es un agente oxidante frecuentemente utilizado como indicador de reacciones redox, debido a que la forma oxidada es de color azul y la forma reducida es incolora. Este compuesto posee un potencial normal estándar de 0,530 V a pH 0 (Christian, 2009; Ksenzhek et al., 1977), superior al del ácido ascórbico (0,390 V), por lo que termodinámicamente es posible llevar a cabo una valoración entre estos dos compuestos, con la ventaja de que además de ser el agente titulante el azul de metileno sirve como indicador directo de la reacción, teniendo que, cuando es titulado todo el ácido ascórbico de la disolución inicial, ésta se pone de color azul, lo que permite determinar el punto final de la titulación.

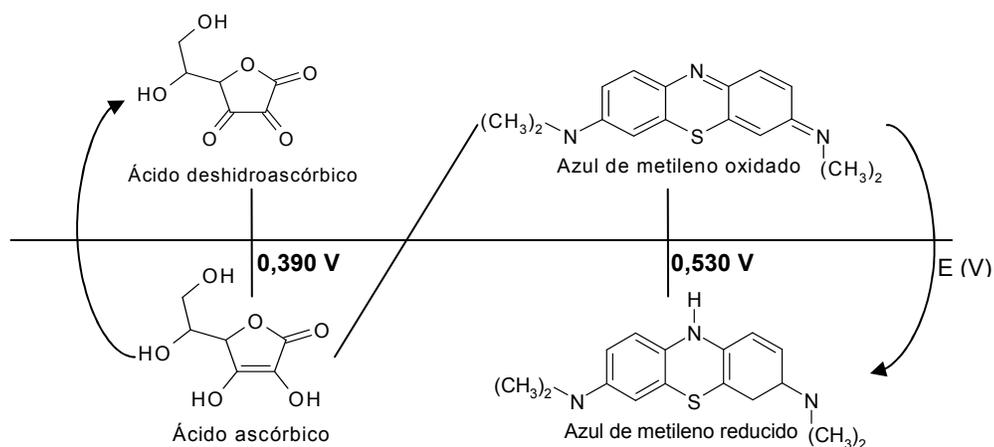


Figura 5.5. Escala de potencial en donde se observa que el ácido ascórbico es capaz de reaccionar con el azul de metileno.



No fue posible obtener el gráfico de la valoración potenciométrica, debido a que, a pesar de que la reacción entre el ácido ascórbico y el azul de metileno es termodinámicamente muy favorable y cuantitativa, la cinética de reacción entre estos dos compuestos es muy lenta, lo que significa que debe de transcurrir mucho tiempo para que la reacción alcance el equilibrio y se establezca el potencial de equilibrio del sistema.

Al inicio de la valoración, en donde está presente un exceso del ácido ascórbico respecto al azul de metileno, se observó que la reacción alcanzaba el equilibrio, desapareciendo el color azul de la disolución, en un tiempo de 2 minutos. Entre más se esté cerca del punto final de la valoración más tiempo transcurre para que la reacción alcance el equilibrio y el potencial se estabilice.

Debido al tiempo que tarda en realizarse esta determinación (aproximadamente 2 minutos para que el potencial se estabilice cada vez que se agrega un cierto volumen de titulante), por el hecho de que la cinética de reacción es lenta, se estableció que no es factible este análisis del ácido ascórbico y ya no se realizó la valoración potenciométrica.

### 5.1.2. MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS.

#### 5.1.2.1. Determinación de ácido ascórbico con azul de metileno.

Como se mencionó en la determinación anterior, la reacción entre el azul de metileno y el ácido ascórbico es termodinámicamente favorable (Figura 5.5), sin embargo la cinética de reacción entra estas dos especies es muy lenta. No obstante esto último no interfiere con la determinación espectrofotométrica, ya que es posible dejar reaccionar un exceso de azul de metileno con ácido ascórbico por un tiempo (aproximadamente 45 minutos) y después medir la cantidad de azul de metileno que no reaccionó.



- a) Determinación de la longitud de onda de máxima absorbancia del azul de metileno.

El azul de metileno presenta una coloración azul en disolución acuosa, lo que hace que absorba en la región del visible del espectro electromagnético. Teóricamente las disoluciones de color azul presentan la longitud de onda de máxima absorbancia en un intervalo de 580 – 620 nm (Harris, 2007), sin embargo se puede observar en el espectro de absorbancia del azul de metileno (Gráfico 5.8), que éste presenta una longitud de onda de máxima absorbancia a 670 nm bajo las condiciones experimentales que se mencionan en la metodología, pH=13.

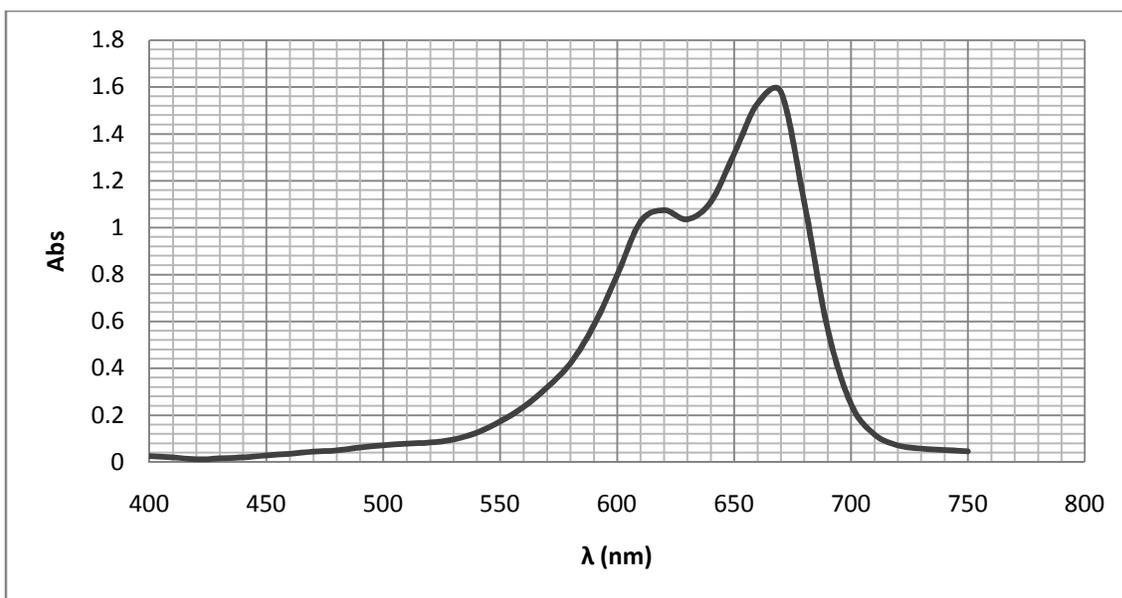


Gráfico 5.8. Espectro de absorción del azul de metileno.

- b) Curva de calibración del azul de metileno.

En cuanto a la curva de calibración del azul de metileno (Gráfico 5.9), se puede notar que éste presenta un comportamiento lineal, ya que el coeficiente de correlación de la curva de calibración es muy cercano a 1 (0.9938), lo que indica una buena correlación y una buena linealidad.

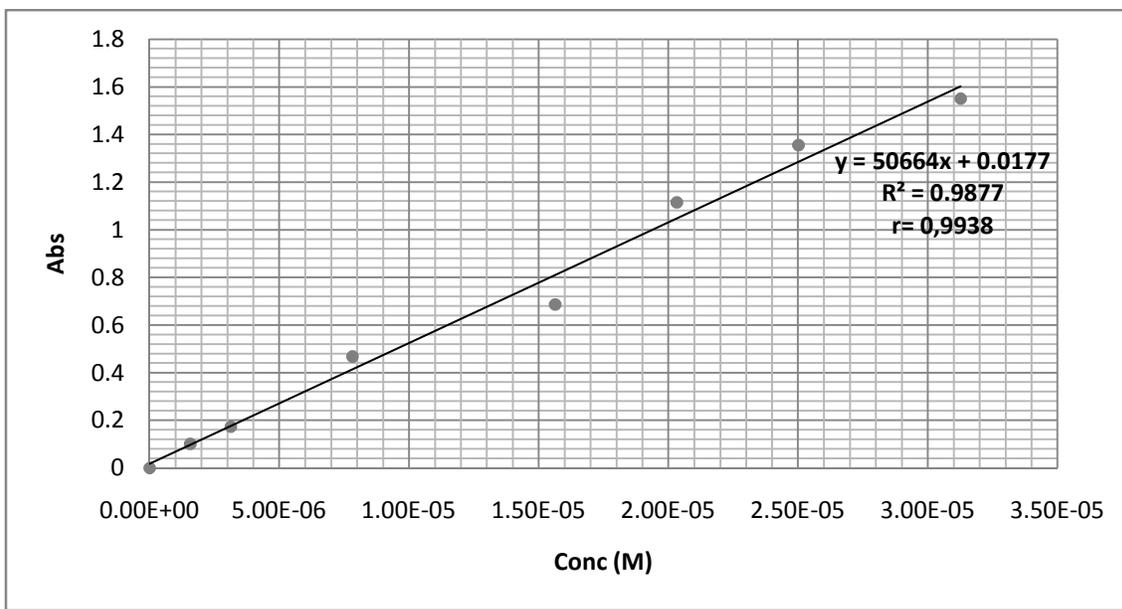


Gráfico 5.9. Curva de calibración para el azul de metileno.

De la curva de calibración se obtiene que la fórmula para determinar la concentración del azul de metileno es:

$$C = \frac{A - 0,0177}{50664}$$

c) Determinación espectrofotométrica.

No fue posible realizar la cuantificación del ácido ascórbico por medio de la determinación espectrofotométrica con azul de metileno, debido a que la reacción entre estas dos especies es de cinética lenta y a que el azul de metileno en su forma reducida es capaz de reaccionar de manera cuantitativa y rápida con el oxígeno del ambiente, cuyo potencial normal estándares de 1,229 V (Harris, 2007), superior al potencial normal estándar del azul de metileno, lo que provoca que el azul de metileno que ya reaccionó con al ácido ascórbico, y por consiguiente se encuentra en su forma reducida, que es incolora, reaccione con el oxígeno del ambiente y forme de nuevo la forma oxidada del azul de metileno, lo que interfiere en la determinación e impide determinar la cantidad inicial de ácido ascórbico en la disolución.

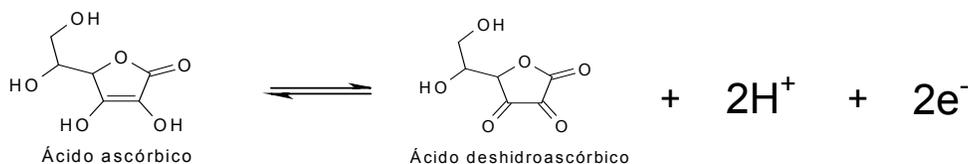
### 5.1.3. MÉTODOS ELECTROQUÍMICOS.

#### 5.1.3.1. Polarografía.

Para la determinación electroquímica del ácido ascórbico se trabajó con dos técnicas, la polarografía clásica y la polarografía diferencial de pulsos. Se encontró que las dos técnicas arrojan buenos resultados en la determinación del ácido ascórbico, presentan señales bien definidas de la oxidación de éste y sin ninguna interferencia, tienen muy buena linealidad dando coeficientes de correlación muy cercanos a 1. Sin embargo, la polarografía clásica permite identificar cuáles señales son de oxidación y cuáles de reducción, por lo que se decidió trabajar con esta técnica.

- a) Selección de electrolito soporte e identificación de la señal de oxidación y linealidad del ácido ascórbico por polarografía clásica y diferencial de pulsos.

La corriente residual de los tres electrolitos soporte que se probaron, nitrato de potasio ( $\text{KNO}_3$ ) 0,1 M, ácido acético (HAc) 0,04 M y el buffer Britton-Robinson, no presentó alguna señal desde 0 V hasta la aparición del muro anódico (Gráfico 5.10, 5.11 y 5.12), lo que significa que ninguno de ellos interfiere en la señal de oxidación correspondiente al ácido ascórbico (Figura 5.6).



**Figura 5.6. Oxidación electroquímica del ácido ascórbico.**

Al adicionar ácido ascórbico en los tres electrolitos, se obtiene una señal de oxidación con un potencial de media onda muy similar al potencial normal estándar del ácido ascórbico, 0,390 V, se notó que en el HAc la señal presentaba



una subida con una pendiente menor (Gráfico 5.10) que la de los otros electrolitos soporte, el buffer Britton-Robinson (Gráfico 5.11) y el nitrato de potasio (Gráfico 5.12), lo que significa que la reacción de oxidación en este electrolito soporte es menos reversible y la cinética de reacción es más lenta, problema que no afecta en la determinación del ácido ascórbico, ya que lo que se busca solamente es que se tenga una señal estable para poder medir el tamaño de ésta, y que sea proporcional a la concentración para realizar la cuantificación del ácido ascórbico. Este problema que se presenta en el HAc hace que sea más difícil realizar la medición de la señal, ya que su señal de oxidación se da muy cerca del comienzo del muro anódico.

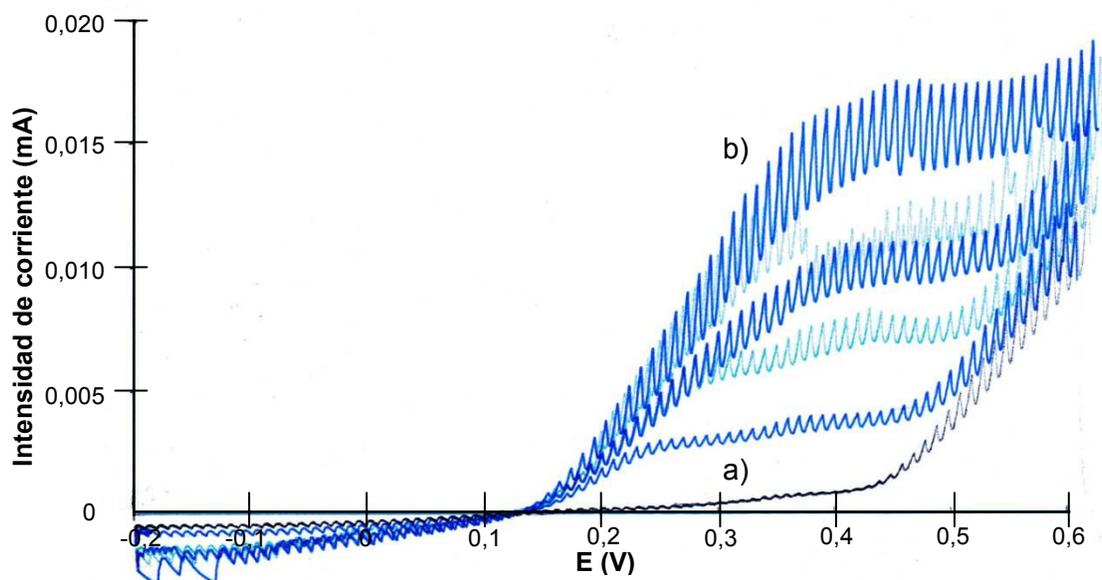


Gráfico 5.10. a) Corriente residual del ácido acético a pH 6. b) Señales de oxidación del ácido ascórbico a diferentes concentraciones ( $5 \times 10^{-4}$ ,  $10^{-3}$ ,  $1,5 \times 10^{-3}$ ,  $2 \times 10^{-3}$  y  $2,5 \times 10^{-3}$  M) en ácido acético como electrolito soporte a pH 6.

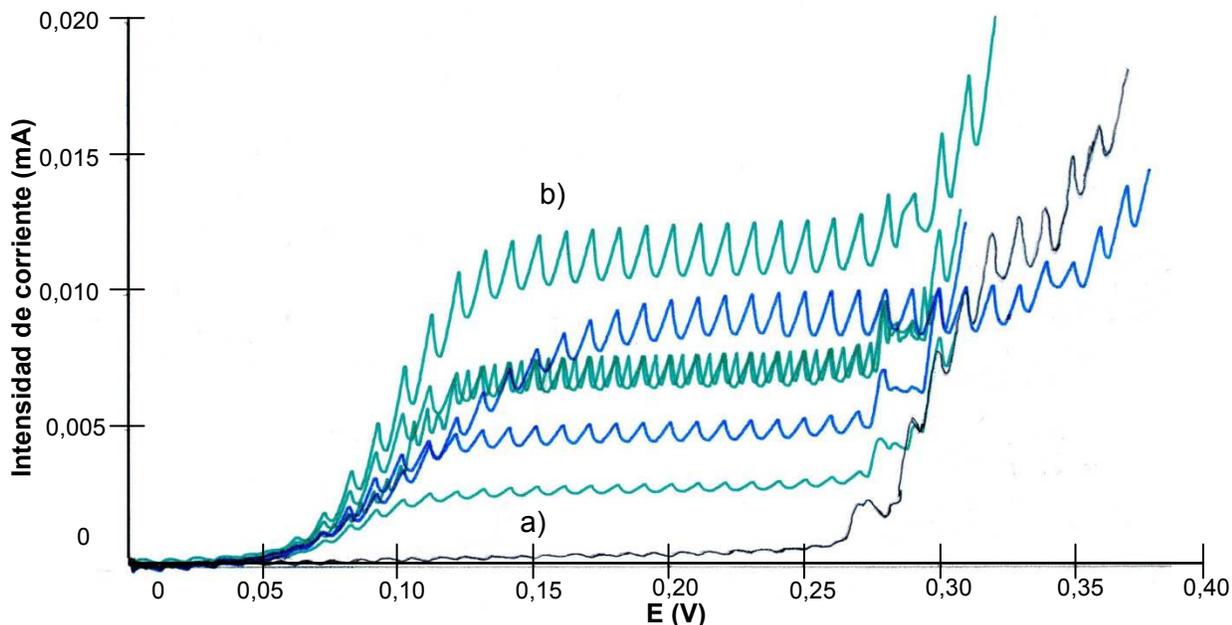


Gráfico 5.11. a) Corriente residual del buffer Britton-Robinson a pH 6. b) Señales de oxidación del ácido ascórbico a diferentes concentraciones ( $5 \times 10^{-4}$ ,  $10^{-3}$ ,  $1,5 \times 10^{-3}$ ,  $2 \times 10^{-3}$  y  $2,5 \times 10^{-3}$  M) en buffer Britton-Robinson como electrolito soporte a pH 6.

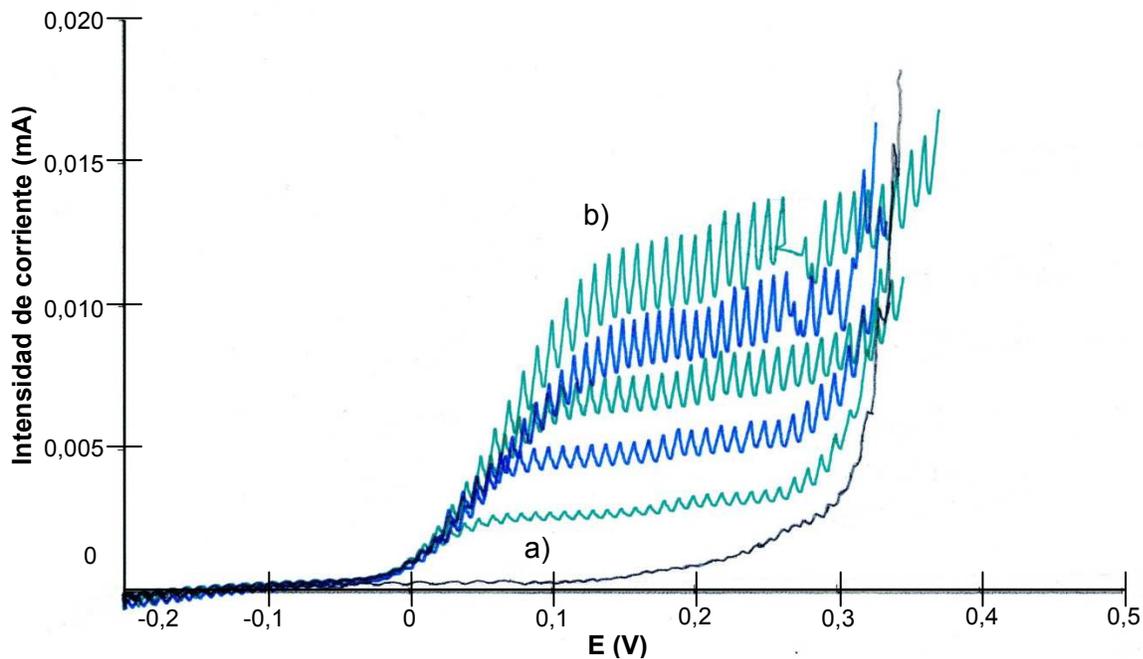


Gráfico 5.12. a) Corriente residual del nitrato de potasio a pH 6. b) Señales de oxidación del ácido ascórbico a diferentes concentraciones ( $5 \times 10^{-4}$ ,  $10^{-3}$ ,  $1,5 \times 10^{-3}$ ,  $2 \times 10^{-3}$  y  $2,5 \times 10^{-3}$  M) en  $\text{KNO}_3$  como electrolito soporte a pH 6.



Los otros electrolitos presentan una subida con una pendiente mayor, lo que indica que la reacción de oxidación del ácido ascórbico en estos electrolitos es más rápida. Esto ayuda a que la señal se establezca más rápido y sea más fácil realizar la medición. Se observó que la señal más limpia se dio en el buffer Britton-Robinson, aunque la señal en el  $\text{KNO}_3$  también presenta buenas características para su determinación.

En cuanto al pH, se notó que la señal del ácido ascórbico era más pequeña y menos definida en los tres electrolitos soportes a pH de 3,6 (Gráficos 5.13 y 514), siendo más grande y definida a pH de 6 (Gráficos 5.10, 5.11 y 5.12). Esto se debe a que para que se lleve a cabo la oxidación del ácido ascórbico, éste necesita liberar dos  $\text{H}^+$  al medio, lo cual es muy difícil si el pH de la disolución en la que se encuentra es un pH muy ácido, dificultando así su oxidación. Para los tres electrolitos, el pH escogido para realizar las determinaciones del ácido ascórbico fue de 6.

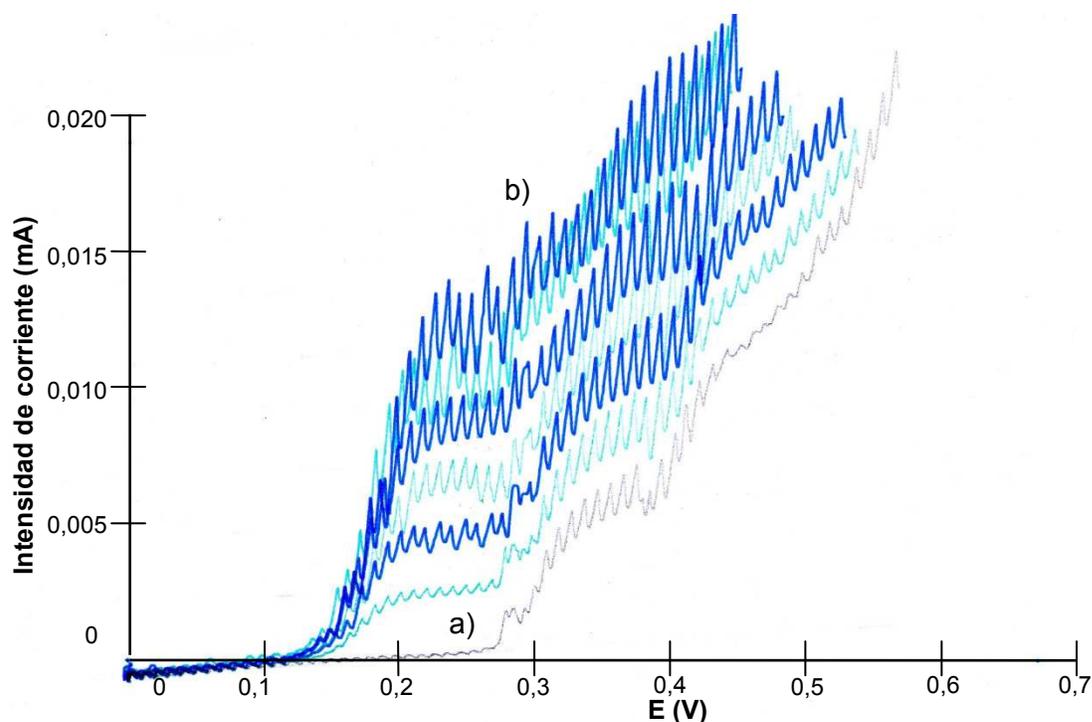


Gráfico 5.13. a) Corriente residual del buffer Britton-Robinson a pH 3,6. b) Señales de oxidación del ácido ascórbico a diferentes concentraciones ( $5 \times 10^{-4}$ ,  $10^{-3}$ ,  $1,5 \times 10^{-3}$ ,  $2 \times 10^{-3}$  y  $2,5 \times 10^{-3}$  M) en buffer Britton-Robinson como electrolito soporte a pH 3,6.

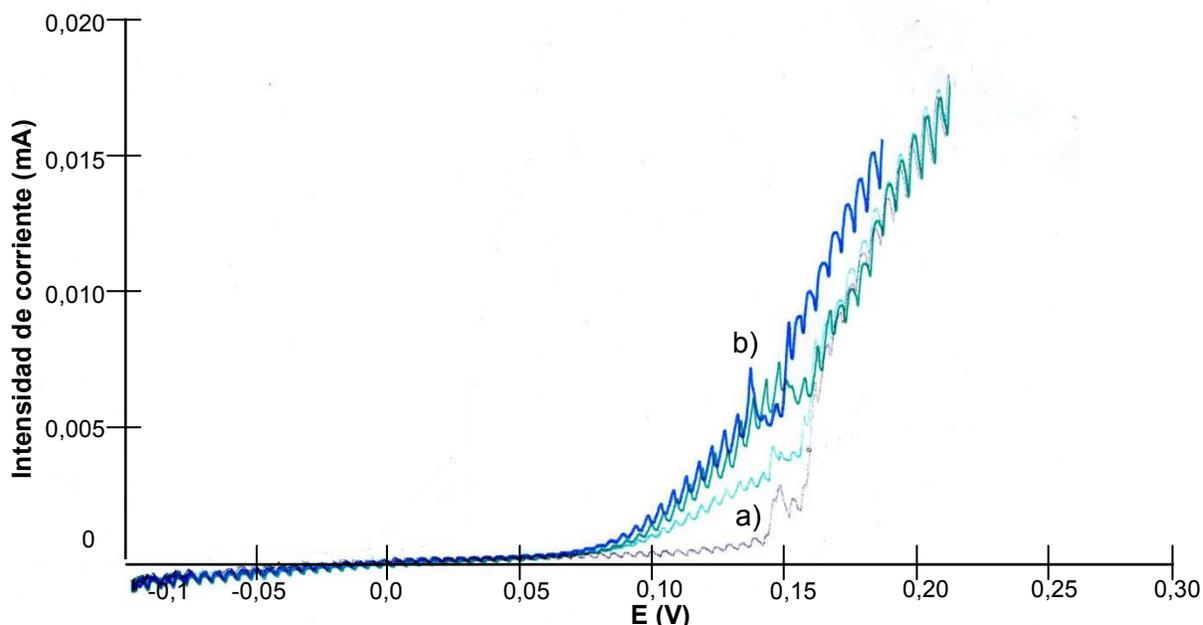


Gráfico 5.14. a) Corriente residual del nitrato de potasio a pH 3,6. b) Señales de oxidación del ácido ascórbico a diferentes concentraciones ( $5 \times 10^{-4}$ ,  $10^{-3}$ ,  $1,5 \times 10^{-3}$  M) en  $\text{KNO}_3$  como electrolito soporte a pH 3,6.

En el  $\text{KNO}_3$  y en el buffer Britton-Robinson se presentó un mejor coeficiente de correlación para la curva de calibración del ácido ascórbico (0,9992 y 0,9986 respectivamente), en comparación con el ácido acético (0,9839), lo cual se puede deber a que, como ya se mencionó anteriormente, es más difícil realizar la medición en el HAC, sobre todo a concentraciones elevadas de ácido ascórbico.

Por lo anterior, el electrolito soporte seleccionado para la determinación del ácido ascórbico fue el  $\text{KNO}_3$ , ya que aunque en el buffer Britton-Robinson se presentaba una mejor señal, es más laboriosa la preparación de este electrolito soporte y el costo de éste es más elevado que el del  $\text{KNO}_3$ , el cual también arrojó buenos resultados.

En la Tabla 5.4 se presenta un resumen de los métodos de análisis estudiados para determinar el ácido ascórbico.



Tabla 5.4. Resumen de los métodos de análisis estudiados.

	Método de análisis	Observaciones
<b>Métodos volumétricos</b>	Determinación con 2,6-diclorofenol indofenol	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Método oficial de la AOAC</li> <li>- No es necesario normalizar el titulante</li> <li>- El titulante sirve como un indicador colorido para la valoración</li> <li>- Al haber un indicador colorido la determinación es más rápida</li> <li>- La determinación potenciométrica no presenta una curva bien definida</li> <li>- La disolución del titulante es estable por lo que se puede preparar para utilizar por varios días</li> <li>- Otras sustancias capaces de reaccionar con alguno de los reactivos interfieren en la determinación</li> </ul>
	Determinación con I <sub>2</sub>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Valoración por retroceso</li> <li>- Es necesario normalizar el tiosulfato para la titulación del yodo</li> <li>- El yodo es una sustancia muy volátil</li> <li>- Se cuenta con un indicador colorido, lo que hace que la determinación sea más rápida</li> <li>- La valoración potenciométrica del I<sub>2</sub> con tiosulfato presenta una curva bien definida</li> <li>- El tiosulfato es una sustancia un poco inestable por lo que la disolución se necesita volver a normalizar después de un cierto tiempo</li> <li>- Otras sustancias capaces de reaccionar con alguno de los reactivos interfieren en la determinación</li> </ul>
	Determinación con ClO <sup>-</sup> (Clorox)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- El reactivo titulante proviene de un producto comercial y es necesaria su normalización</li> <li>- Es una valoración directa</li> <li>- La curva de titulación no presenta una buena definición cerca del punto final</li> <li>- No se cuenta con un indicador colorido para la determinación, lo que la hace un poco lenta</li> <li>- Existen otras sustancias presentes en el producto comercial que pueden interferir con la determinación</li> <li>- Otras sustancias capaces de reaccionar con alguno de los reactivos interfieren en la determinación</li> </ul>
	Determinación con azul de metileno	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Es una reacción de cinética lenta</li> <li>- El azul de metileno es capaz de reaccionar con el oxígeno del ambiente</li> </ul>
<b>Método espectrofotométrico</b>	Determinación con azul de	<ul style="list-style-type: none"> <li>- La curva de calibración del azul de metileno presenta una buena linealidad</li> </ul>



	metileno	<ul style="list-style-type: none"><li>- Es una reacción de cinética lenta</li><li>- El azul de metileno es capaz de reaccionar con el oxígeno del ambiente</li></ul>
<b>Método electroquímico</b>	Polarografía	<ul style="list-style-type: none"><li>- La señal de oxidación del ácido ascórbico está bien definida y es fácil de identificar</li><li>- El electrolito soporte seleccionado es de fácil preparación</li><li>- La determinación es rápida</li><li>- La curva de calibración presenta una buena linealidad</li></ul>

## 5.2. VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS SELECCIONADOS.

De los métodos volumétricos, se seleccionó la determinación de ácido ascórbico con el 2,6-diclorofenol indofenol, debido a que los dos otros métodos que funcionaron, la determinación con yodo y con hipoclorito, involucran más pasos, como la normalización de los titulantes, y son más complicados de realizar, el primero por la volatilidad del yodo y el segundo por la falta de un indicador para realizar la valoración. Además se encontró que el primer método es el método oficial establecido por la AOAC.

El método espectrofotométrico no se eligió debido a que presenta una cinética de reacción lenta y a que el azul de metileno es capaz de reaccionar con el oxígeno del ambiente, lo que interfiere con la determinación.

El otro método que se seleccionó fue el polarográfico, ya que se identificó fácilmente la señal de oxidación del ácido ascórbico, presentó buena linealidad, es un método rápido y no se presentaron interferencias.

Cabe destacar que la validación de los dos métodos seleccionados se realizó con base en lo establecido en el documento *Criterios para la validación de métodos fisicoquímicos*, establecido por la CCAyAC en 2011, ya que esta institución es la



encargada de verificar las características de la mayoría de los productos (alimentos, fármacos, etc.) que se comercializan en México.

#### 5.2.1. Validación de la determinación de ácido ascórbico con 2,6-diclorofenol indofenol.

Los datos para la validación del método volumétrico con 2,6-diclorofenol indofenol, se tomaron de la determinación con indicador, ya que ésta es la recomendada por la AOAC y además tiene la ventaja de ser rápida en comparación con la determinación potenciométrica.

##### 5.2.1.1. Recuperación (linealidad).

Debido a que para un método volumétrico no es posible realizar una prueba de linealidad, ya que la determinación no se basa en el uso de una curva de calibración, es necesario evaluar el parámetro de recuperación, el cual indica si la cantidad o concentración del analito, en este caso el ácido ascórbico que se determina, es proporcional, de manera lineal, a la cantidad o concentración de analito que se puso inicialmente.

Es posible observar en el Gráfico 5.15 que el método volumétrico para determinación de ácido ascórbico presenta linealidad con un coeficiente de correlación ( $r$ ) de 0,9875, lo que nos indica que la cantidad determinada de ácido ascórbico por el método, es linealmente proporcional a la cantidad presente.

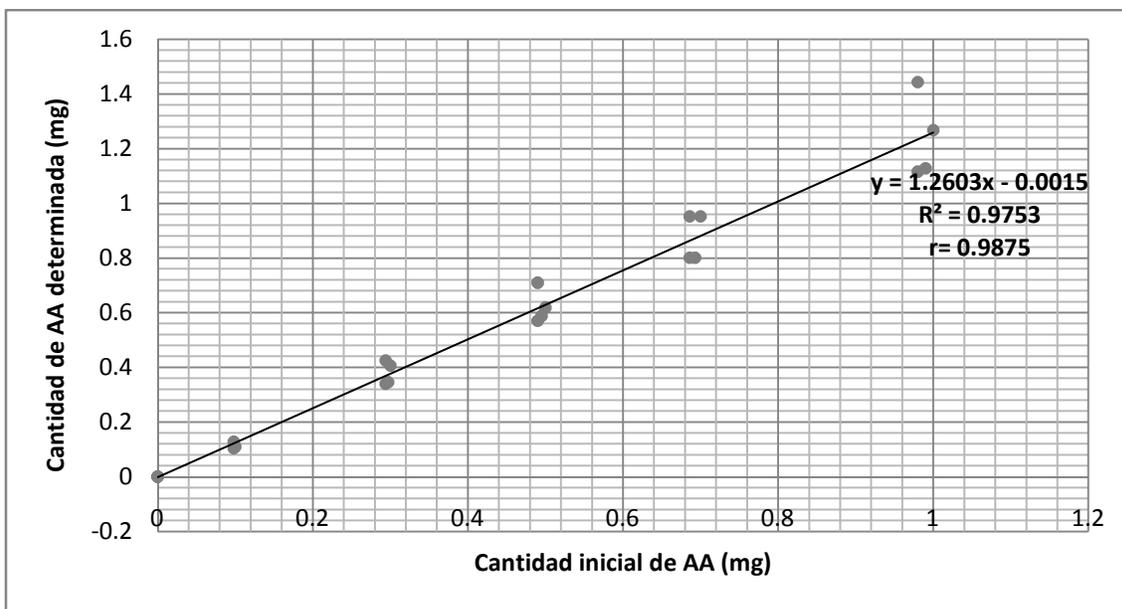


Gráfico 5.15. Resultados de la prueba de recuperación del método volumétrico.

También es posible ver que a cantidades mayores de ácido ascórbico se presenta una mayor dispersión en los resultados, lo cual se puede deber a que a cantidades mayores de ácido ascórbico es necesario más titulante lo que hace que haya un mayor volumen y sea más difícil ver el vire del indicador (DCPIP) por efecto de dilución.

#### 5.2.1.2. Precisión del sistema.

##### 5.2.1.2.1. Repetibilidad.

La repetibilidad para el método volumétrico se realizó a tres diferentes cantidades de ácido ascórbico, las cuales fueron tomadas de las cantidades utilizadas para evaluar el parámetro de recuperación. Las cantidades escogidas fueron 0,1, 0,5 y 1 mg de ácido ascórbico, cuyos resultados se presentan en las Tablas 5.5, 5.6 y 5.7.



Tabla 5.5. Resultados y análisis estadístico para evaluar la repetibilidad del método volumétrico para determinar 0,1 mg de ácido ascórbico.

Muestra	Cantidad de AA (mg)	Vol. DCPIP (mL)	Cantidad de AA determinada (mg)
1	0,1	1,8	0,1091
2	0,1	1,9	0,1151
3	0,1	1,8	0,1091
4	0,1	1,9	0,1151
5	0,1	1,9	0,1151
		$\bar{X}$	0,1127
		$\sigma$	0,0033
		CV %	2,94 %

Tabla 5.6. Resultados y análisis estadístico para evaluar la repetibilidad del método volumétrico para determinar 0,5 mg de ácido ascórbico.

Muestra	Cantidad de AA (mg)	Vol. DCPIP (mL)	Cantidad de AA determinada (mg)
1	0,5	9,5	0,5757
2	0,5	9,8	0,5939
3	0,5	9,7	0,5878
4	0,5	9,5	0,5757
5	0,5	9,2	0,5575
		$\bar{X}$	0,5781
		$\sigma$	0,0140
		CV %	2,41 %

Tabla 5.7. Resultados y análisis estadístico para evaluar la repetibilidad del método volumétrico para determinar 1 mg de ácido ascórbico.

Muestra	Cantidad de AA (mg)	Vol. DCPIP (mL)	Cantidad de AA determinada (mg)
1	1	20	1,2120
2	1	18,6	1,1272
3	1	18,8	1,1393
4	1	19,8	1,1999
5	1	18,4	1,1151
		$\bar{X}$	1,1587
		$\sigma$	0,0442
		CV %	3,81 %



A partir de los resultados se nota que el coeficiente de variación es menor en la cantidad intermedia (0,5 mg de ácido ascórbico) y es mayor en la cantidad más grande (1 mg). El que sea mayor el coeficiente de variación a la cantidad mayor se puede deber a que para cantidades grandes de ácido ascórbico es necesario utilizar un mayor volumen de titulante para alcanzar el punto final de la titulación, lo que dificulta (por efecto de dilución) la detección del vire del indicador (DCPIP), provocando que exista una mayor variación en los resultados. Los coeficientes de variación obtenidos son, en todos los casos inferiores al 4 %.

De acuerdo con la guía de CCAyAC publicada en febrero de 2011, la repetibilidad del método volumétrico para la cantidad más grande de ácido ascórbico (1 mg) no cumple con el criterio de aceptación, ya que esta guía dice que la repetibilidad de un método para determinar el contenido de un compuesto en los alimentos debe de tener un coeficiente de variación menor al 3 % y el coeficiente de variación obtenido es de 3,81 %.

#### 5.2.1.2.2. Reproducibilidad.

Para la reproducibilidad se varió el tiempo, ya que las determinaciones se realizaron durante tres días y además cada día se prepararon disoluciones nuevas de los reactivos, ácido ascórbico y 2,6-diclorofenol indofenol.

Al igual que para la repetibilidad, el parámetro de reproducibilidad para la determinación volumétrica del ácido ascórbico se realizó con tres cantidades diferentes, 0,1, 0,5 y 1 mg de ácido ascórbico. Los resultados para estas concentraciones se presentan en las Tablas 5.8, 5.9 y 5.10, en las cuales se puede observar que el coeficiente de variación es mayor en la cantidad más baja, 0,1 mg y disminuye conforme aumenta la cantidad de ácido ascórbico valorado.



Tabla 5.8. Resultados y análisis estadístico para la reproducibilidad del método volumétrico para determinar 0,1 mg de ácido ascórbico.

Muestra	Cantidad de AA (mg)	Vol. DCPIP (mL)	Cantidad de AA determinada (mg)
1	0,1	1,8	0,1091
2	0,1	1,7	0,1030
3	0,1	2	0,1212
4	0,1	1,9	0,1151
5	0,1	2,1	0,1273
6	0,1	2,1	0,1273
		$\bar{X}$	0,1172
		$\sigma$	0,0099
		CV %	8,45 %

Tabla 5.9. Resultados y análisis estadístico para la reproducibilidad del método volumétrico para determinar 0,5 mg de ácido ascórbico.

Muestra	Cantidad de AA (mg)	Vol. DCPIP (mL)	Cantidad de AA determinada (mg)
1	0,5	9,5	0,5757
2	0,5	10,4	0,6303
3	0,5	9,5	0,5757
4	0,5	9,4	0,5697
5	0,5	10,5	0,6363
6	0,5	9,5	0,5757
		$\bar{X}$	0,5939
		$\sigma$	0,0307
		CV %	5,16 %

Tabla 5.10. Resultados y análisis estadístico para la reproducibilidad del método volumétrico para determinar 1 mg de ácido ascórbico.

Muestra	Cantidad de AA (mg)	Vol. DCPIP (mL)	Cantidad de AA determinada (mg)
1	1	20	1,2120
2	1	18,6	1,1272
3	1	18,8	1,1393
4	1	19,8	1,1999
5	1	18,4	1,1151
6	1	18,4	1,1151
		$\bar{X}$	1,1514
		$\sigma$	0,0434
		CV %	3,77 %



Esto indica que para la cantidad baja y para la cantidad media, aparte de la influencia del ruido de fondo se presenta una gran variación dada por la preparación de la disolución, ya que como se mencionó anteriormente los reactivos fueron preparados cada día, por lo que los coeficientes de variación para estas dos cantidades son mayores que en la repetibilidad, en donde se trabajó con las mismas disoluciones.

A pesar de que a cantidades más altas se presentan más variaciones en el volumen de titulante gastado, el coeficiente de variación es pequeño porque el volumen de titulante gastado es mayor. Los valores de los coeficientes de variación son inferiores al 9 % y son mayores que los obtenidos en la repetibilidad.

En este caso la reproducibilidad del método volumétrico para la determinación de la cantidad más baja de ácido ascórbico (donde se obtuvo un coeficiente de variación del 8,45 %) no cumple con lo establecido en la guía de CCAyAC, ya que en ésta se menciona que el coeficiente de variación para la reproducibilidad debe de ser menor al 6 %.

## 5.2.2. VALIDACIÓN DE LA DETERMINACIÓN DE ÁCIDO ASCÓRBICO POR POLAROGRAFÍA CLÁSICA.

### 5.2.2.1. Linealidad del sistema.

Se puede observar en el Gráfico 5.16 que, para el intervalo de concentraciones de  $4,0147 \times 10^{-4}$  M a  $2,4088 \times 10^{-3}$  M, se obtiene un comportamiento ascendente, es decir, conforme aumenta la concentración del ácido ascórbico en la disolución mayor es la altura de la señal de oxidación del ácido ascórbico, lo que significa que la altura de la señal es directamente proporcional a la concentración de ácido ascórbico.

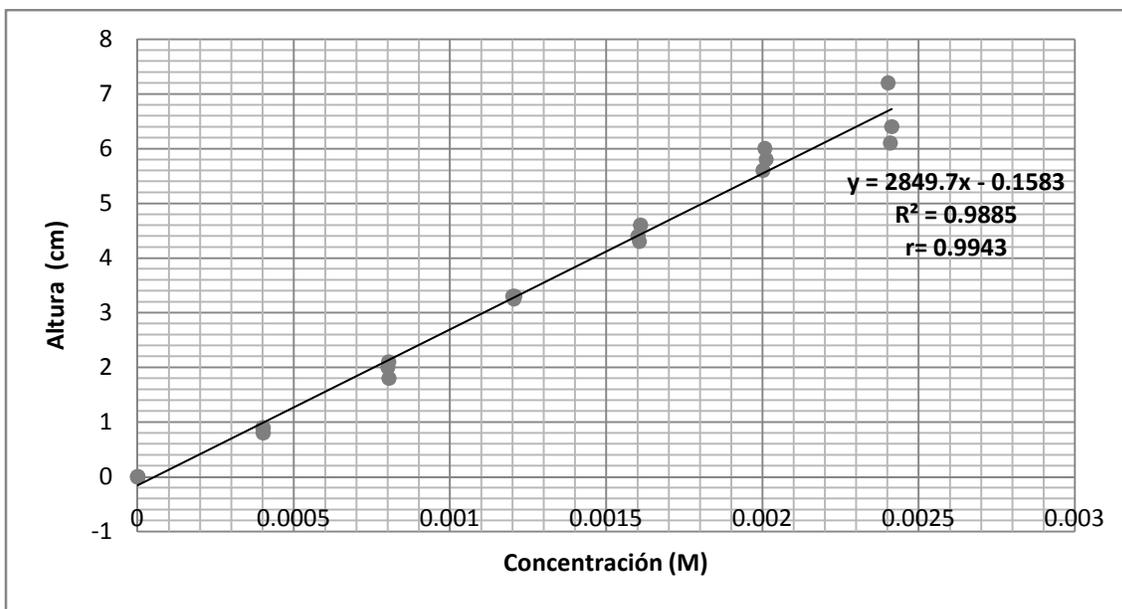


Gráfico 5.16. Curva de calibración para el ácido ascórbico y su regresión lineal, realizadas con los datos de concentración y altura de la señal de cada curva de calibración.

Como se puede ver en la Tabla 5.11, el método polarográfico para la determinación de ácido ascórbico, presenta un buen comportamiento lineal. El valor del coeficiente de correlación múltiple ( $r$ ) es muy cercano a la unidad, 0,9943 y el valor del coeficiente de determinación ( $R^2$ ) es de 0,9887.

Tabla 5.11. Datos estadísticos, obtenidos con Excel, de la regresión lineal de la curva de calibración del ácido ascórbico.

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coeficiente de correlación múltiple ( $r$ )	0,9943
Coeficiente de determinación $R^2$	0,9887
$R^2$ ajustado	0,9881
Error típico	0,2570

De la regresión lineal de la curva de calibración del ácido ascórbico es posible determinar la ecuación que relaciona la altura de la señal de oxidación de éste con su concentración, la cual es:

$$\text{Altura (cm)} = 2849,67 \text{ Conc. (M)} - 0,1583$$

de donde se obtiene que la ecuación para calcular la concentración de ácido ascórbico en una muestra es:



$$C (M) = \frac{A(\text{cm}) + 0,1583}{2849,67}$$

#### 5.2.2.2. Límite de detección (LD).

##### 5.2.2.2.1. Estimación del límite de detección.

Para la estimación del límite de detección por el método polarográfico se realizó la medición de 10 blancos, los cuales presentaron una media de 0,063 cm y un valor de desviación estándar de 0,06343 (Tabla 5.12). Esta estimación se puede realizar calculando la concentración con ayuda de la curva de calibración obtenida en el parámetro de linealidad del sistema, de la media de los blancos más 3 a 5 veces la desviación estándar de los mismos.

**Tabla 5.12. Resultados obtenidos de la medición de 10 blancos con el método polarográfico y su análisis estadístico.**

<b>Blanco</b>	<b>Altura (cm)</b>
1	0,1
2	0,05
3	0
4	0,05
5	0,1
6	0,1
7	0,03
8	0
9	0,2
10	0
$\bar{X}$	0,0630
$\sigma$	0,0634
$\bar{X} + 3\sigma$	0,2533
$\bar{X} + 5\sigma$	0,3801

Para conocer cuantas veces más es necesario sumar la desviación estándar a la media, para poder estimar el límite de detección es necesario graficar la distribución de los blancos, la media de éstos y la del valor de la media sumado a la desviación estándar, lo cual es representado en el Gráfico 5.17. De este último es posible observar que ningún blanco sobrepasa el valor de la media más tres



veces la desviación estándar, a pesar de que uno de los blancos está en el valor de la media más 2 veces la desviación estándar, y mucho menos el valor de la media más cinco veces la desviación estándar. Por lo que es posible utilizar el valor más chico para estimar el límite de detección, el cual corresponde a la media más 3 veces la desviación estándar, según lo establecido en la guía de la Eurachem.

Además se sabe que al utilizar el valor de la media de los blancos más tres veces su desviación estándar, la probabilidad de que se cometa un error de Tipo I (que es cuando se determina que está presente el analito cuando en realidad no lo está) o un error de Tipo II (que es cuando se determina que el analito está ausente cuando en realidad está presente) es aproximadamente un 7 %, lo que muchos analistas consideran razonable. Si se quiere disminuir esta probabilidad es necesario aumentar la cantidad de veces que se suma la desviación estándar a la media, por ejemplo una probabilidad de 5 % se obtiene con un valor de límite de detección de la media más 3,28 veces la desviación estándar, sin embargo esto hace que la concentración mínima que se pueda detectar sea mayor (Miller, 2002).

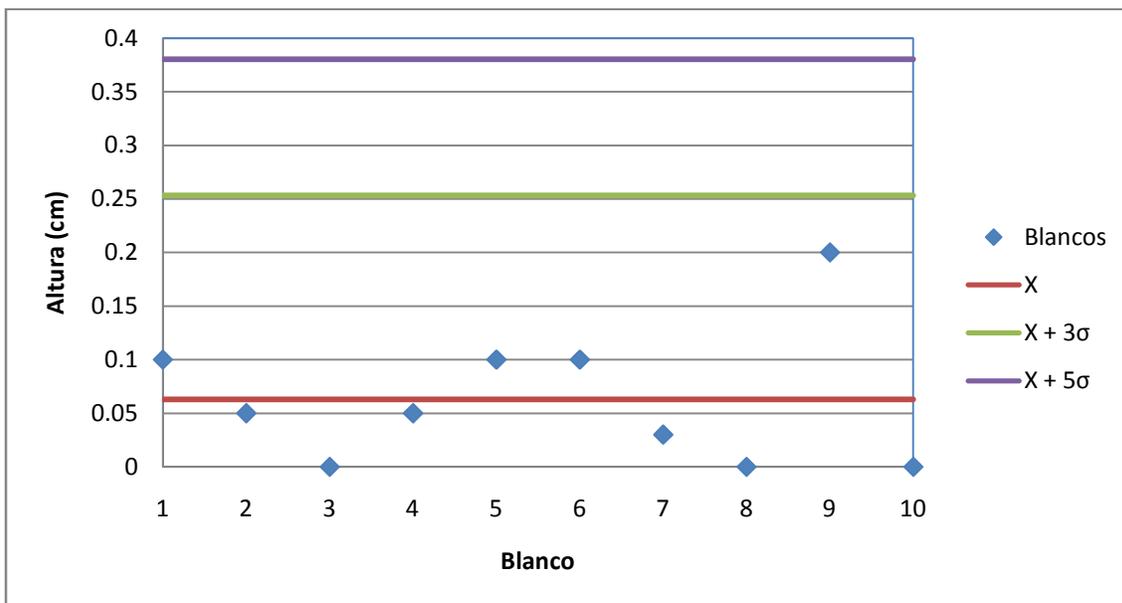


Gráfico 5.17. Distribución de la altura de los blancos. Representación gráfica de los parámetros estadísticos: media, media más 3 veces la desviación estándar y media más 5 veces la desviación estándar.



Por lo que si en una determinación se obtiene un valor menor para la concentración de ácido ascórbico que el límite de detección ( $X + 3\sigma$ ), esta concentración no se podrá tomar como confiable, ya que existe una gran influencia del ruido de fondo sobre este valor.

Dado lo anterior el valor del límite de detección estimado es:

$$\text{Concentración del LD} = \frac{0,2533 + 0,1583}{2849,7} = 1,4443 \times 10^{-4} \text{ M}$$

5.2.2.2. Corroboración del límite de detección.

Después de estimar el límite de detección se prosiguió a corroborar el valor de éste. Para lo cual se hizo la determinación de tres muestras de ácido ascórbico a la concentración del límite de detección estimado,  $1,4443 \times 10^{-4}$  M, cuyos resultados se muestran en la Tabla 5.13, en la cual se puede observar que la concentración determinada por el método polarográfico es menor que la concentración verdadera para los tres casos.

Tabla 5.13. Datos obtenidos para corroborar el valor de límite de detección estimado.

Muestra	Concentración real (M)	Altura (cm)	Concentración determinada (M)
1	$1,4443 \times 10^{-4}$	0,2	$1,2573 \times 10^{-4}$
2	$1,4443 \times 10^{-4}$	0,2	$1,2573 \times 10^{-4}$
3	$1,4443 \times 10^{-4}$	0,24	$1,3977 \times 10^{-4}$
		$\bar{X}$	$1,3041 \times 10^{-4}$
		$\sigma$	$8,1040 \times 10^{-6}$

Al realizar la prueba estadística t de student para dos muestras con varianzas distintas (Tabla 5.14), se encontró que es posible aseverar que la concentración media de las muestras analizadas, es igual a la concentración real, ya que el valor de t calculado para dos colas obtenido en el análisis estadístico es de 1,1998, el cual es menor que el valor de t crítica para dos colas con una probabilidad del 95 %.

**Tabla 5.14. Análisis estadístico, realizado con Excel, para el límite de detección.**

Prueba t de dos colas para dos muestras con un nivel de confianza del 95 %

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Media	0,0001444	0,0001304
Varianza	0	6,5675x10 <sup>-11</sup>
Observaciones	3	3
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	2	
Estadístico t	2,9967	
P(T<=t) dos colas	0,09565	
Valor crítico de t (dos colas)	4,3026	

Lo anterior indica que el valor estimado de límite de detección, es una concentración que todavía es posible determinar por el método polarográfico. Sin embargo, para saber si esta concentración corresponde al límite de detección es necesario verificar una concentración más pequeña. Para lo cual se realizó la determinación polarográfica de tres muestras con una concentración de  $1,2667 \times 10^{-4}$  M, que corresponde al 87,7 % del límite de detección estimado. Los resultados de estas determinaciones se muestran en la Tabla 5.15, en la cual se puede observar que las concentraciones determinadas son menores a la concentración real.

**Tabla 5.15. Datos obtenidos para el 87,7 % del límite de detección.**

Muestra	Concentración real (M)	Altura (cm)	Concentración determinada (M)
1	$1,2667 \times 10^{-4}$	0,16	$1,1170 \times 10^{-4}$
2	$1,2667 \times 10^{-4}$	0,2	$1,2573 \times 10^{-4}$
3	$1,2667 \times 10^{-4}$	0,2	$1,2573 \times 10^{-4}$
		$\bar{x}$	$1,2105 \times 10^{-4}$
		$\sigma$	$8,1040 \times 10^{-6}$

Para saber si la media de las concentraciones determinadas es igual que la concentración real, se realizó un prueba estadística t de student (Tabla 5.16), como la que se realizó para el límite de detección estimado, en donde se observa que la t calculada para dos colas es menor que la t crítica, lo que significa que



estadísticamente la concentración determinada es la misma que la concentración real.

**Tabla 5.16. Análisis estadístico, realizado con Excel, de los datos obtenidos para el 87,7 % del límite de detección. Prueba t de student con un  $\alpha = 0,05$ .**

Prueba t de dos colas para dos muestras con un nivel de confianza del 95 %

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Media	0,0001267	0,0001210
Varianza	0	$6,5675 \times 10^{-11}$
Observaciones	3	3
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	2	
Estadístico t	1,1998	
P(T<=t) dos colas	0,3531	
Valor crítico de t (dos colas)	4,3026	

Debido a lo anterior se toma que el límite de detección del sistema corresponde al 87,7 % del límite de detección estimado, el cual corresponde a una concentración de ácido ascórbico de  $1,2667 \times 10^{-4}$  M, y en todo caso todavía se podría trabajar con concentraciones todavía más pequeñas.

### 5.2.2.3. Precisión del sistema.

#### 5.2.2.3.1. Repetibilidad.

La repetibilidad del sistema se hizo a tres diferentes concentraciones de ácido ascórbico, obtenidas de la curva de calibración,  $2 \times 10^{-4}$ ,  $1 \times 10^{-3}$  y  $2 \times 10^{-3}$  M, cuyos resultados se presentan en las Tablas 5.17, 5.18 y 5.19, respectivamente.

Se observa que el coeficiente de variación para las tres concentraciones es inferior a 3,5 %, siendo menor a concentraciones más elevadas de ácido ascórbico. Esto se debe a que el ruido de fondo del equipo afecta más a la señal de oxidación del ácido ascórbico a concentraciones pequeñas de éste, además de que la forma en que se realiza la medición de la señal hace que se presente una mayor variación a concentraciones pequeñas.

Tabla 5.17. Resultados y análisis estadístico para evaluar la repetibilidad del método polarográfico para determinar ácido ascórbico a una concentración de  $2 \times 10^{-4}$  M.

Muestra	Concentración real (M)	Altura (cm)	Concentración determinada (M)
1	$2 \times 10^{-4}$	0,36	$1,8188 \times 10^{-4}$
2	$2 \times 10^{-4}$	0,38	$1,8890 \times 10^{-4}$
3	$2 \times 10^{-4}$	0,4	$1,9592 \times 10^{-4}$
4	$2 \times 10^{-4}$	0,36	$1,8188 \times 10^{-4}$
5	$2 \times 10^{-4}$	0,36	$1,8188 \times 10^{-4}$
		$\bar{X}$	$1,8609 \times 10^{-4}$
		$\sigma$	$6,2773 \times 10^{-6}$
		CV %	3,37 %

Tabla 5.18. Resultados y análisis estadístico para evaluar la repetibilidad del método polarográfico para determinar ácido ascórbico a una concentración de  $1 \times 10^{-3}$  M.

Muestra	Concentración real (M)	Altura (cm)	Concentración determinada (M)
1	$1 \times 10^{-3}$	2,8	$1,0381 \times 10^{-3}$
2	$1 \times 10^{-3}$	2,9	$1,0732 \times 10^{-3}$
3	$1 \times 10^{-3}$	3	$1,1083 \times 10^{-3}$
4	$1 \times 10^{-3}$	2,8	$1,0381 \times 10^{-3}$
5	$1 \times 10^{-3}$	2,8	$1,0381 \times 10^{-3}$
		$\bar{X}$	$1,0592 \times 10^{-3}$
		$\sigma$	$3,1387 \times 10^{-5}$
		CV %	2,96 %

Tabla 5.19. Resultados y análisis estadístico para evaluar la repetibilidad del método polarográfico para determinar ácido ascórbico a una concentración de  $2 \times 10^{-3}$  M.

Muestra	Concentración real (M)	Altura (cm)	Concentración determinada (M)
1	$2 \times 10^{-3}$	5,8	$2,0909 \times 10^{-3}$
2	$2 \times 10^{-3}$	5,9	$2,1259 \times 10^{-3}$
3	$2 \times 10^{-3}$	5,8	$2,0909 \times 10^{-3}$
4	$2 \times 10^{-3}$	6	$2,1610 \times 10^{-3}$
5	$2 \times 10^{-3}$	6,2	$2,2312 \times 10^{-3}$
		$\bar{X}$	$2,1400 \times 10^{-3}$
		$\sigma$	$5,8719 \times 10^{-5}$
		CV %	2,74 %



En este caso la repetibilidad para la determinación de la concentración más baja de ácido ascórbico no cumple con lo establecido en la guía de CCAyAC, ya que el coeficiente de variación obtenido (3,37 %) es mayor al 3 %.

#### 5.2.2.3.2. Reproducibilidad.

Para la reproducibilidad del sistema se trabajó en las mismas concentraciones que para la repetibilidad. En las Tablas 5.20, 5.21 y 5.22 se muestran los resultados del parámetro de reproducibilidad para las diferentes concentraciones.

**Tabla 5.20. Resultados y análisis estadístico para evaluar la reproducibilidad del método polarográfico para determinar ácido ascórbico a una concentración de  $2 \times 10^{-4}$  M.**

Muestra	Concentración real (M)	Altura (cm)	Concentración determinada (M)
1	$2 \times 10^{-4}$	0,36	$1,8188 \times 10^{-4}$
2	$2 \times 10^{-4}$	0,36	$1,8188 \times 10^{-4}$
3	$2 \times 10^{-4}$	0,38	$1,8890 \times 10^{-4}$
4	$2 \times 10^{-4}$	0,39	$1,9241 \times 10^{-4}$
5	$2 \times 10^{-4}$	0,4	$1,9592 \times 10^{-4}$
6	$2 \times 10^{-4}$	0,4	$1,9592 \times 10^{-4}$
7	$2 \times 10^{-4}$	0,36	$1,8188 \times 10^{-4}$
8	$2 \times 10^{-4}$	0,36	$1,8188 \times 10^{-4}$
$\bar{X}$			$1,8758 \times 10^{-4}$
$\sigma$			$6,4807 \times 10^{-6}$
CV %			3,45 %

**Tabla 5.21. Resultados y análisis estadístico para evaluar la reproducibilidad del método polarográfico para determinar ácido ascórbico a una concentración de  $1 \times 10^{-3}$  M.**

Muestra	Concentración real (M)	Altura (cm)	Concentración determinada (M)
1	$1 \times 10^{-3}$	2,8	$1,0381 \times 10^{-3}$
2	$1 \times 10^{-3}$	2,8	$1,0381 \times 10^{-3}$
3	$1 \times 10^{-3}$	2,9	$1,0732 \times 10^{-3}$
4	$1 \times 10^{-3}$	2,95	$1,0907 \times 10^{-3}$
5	$1 \times 10^{-3}$	2,7	$1,0030 \times 10^{-3}$



6	$1 \times 10^{-3}$	2,9	$1,0732 \times 10^{-3}$
7	$1 \times 10^{-3}$	2,8	$1,0381 \times 10^{-3}$
$\bar{X}$			$1,0506 \times 10^{-3}$
$\sigma$			$2,9903 \times 10^{-3}$
CV %			2,85 %

Tabla 5.22. Resultados y análisis estadístico para evaluar la reproducibilidad del método polarográfico para determinar ácido ascórbico a una concentración de  $2 \times 10^{-3}$  M.

Muestra	Concentración real (M)	Altura (cm)	Concentración determinada (M)
1	$2 \times 10^{-3}$	5,8	$2,0909 \times 10^{-3}$
2	$2 \times 10^{-3}$	5,8	$2,0909 \times 10^{-3}$
3	$2 \times 10^{-3}$	5,9	$2,1259 \times 10^{-3}$
4	$2 \times 10^{-3}$	5,8	$2,0909 \times 10^{-3}$
5	$2 \times 10^{-3}$	6	$2,1610 \times 10^{-3}$
6	$2 \times 10^{-3}$	6,1	$2,1961 \times 10^{-3}$
7	$2 \times 10^{-3}$	5,7	$2,0558 \times 10^{-3}$
8	$2 \times 10^{-3}$	5,9	$2,1259 \times 10^{-3}$
$\bar{X}$			$2,1172 \times 10^{-3}$
$\sigma$			$4,4978 \times 10^{-5}$
CV %			2,12 %

De la misma manera que para la reproducibilidad del método volumétrico, las determinaciones si hicieron durante un periodo de tiempo, 4 días, y preparando disoluciones nuevas cada día.

Es posible observar que al igual que en la repetibilidad el coeficiente de variación para las tres concentraciones es pequeño (inferior a 3,5 %), y que a concentraciones más elevadas el coeficiente de variación es menor. Es de llamar la atención que los coeficientes de variación obtenidos para las dos últimas concentraciones en el caso de la reproducibilidad son ligeramente menores que en la repetibilidad. Debido a que los coeficientes de variación son muy similares que los de la repetibilidad, es posible decir que la preparación de las disoluciones no influye en la determinación y que la variación en los resultados sólo se debe al ruido de fondo del equipo y a la variación existente encada determinación.



A diferencia del método volumétrico la reproducibilidad de la determinación polarográfica cumple con el criterio de aceptación establecido por la CCAyAC, ya que los coeficientes de variación obtenidos son inferiores al 6 %.

### 5.2.3. COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS VALIDADOS.

En la Tabla 5.23 se presentan los resultados obtenidos para los parámetros evaluados en la validación de los dos métodos, en la cual es posible observar que el método polarográfico de manera general presenta mejores resultados que el método volumétrico.

Tabla 5.23. Resultados de los parámetros evaluados para la validación del método volumétrico y polarográfico.

Parámetro	Método polarográfico	Método volumétrico
<b>Linealidad</b>	R= 0,9943	-----
<b>Recuperación</b>	-----	R= 0,9875
<b>Límite de detección</b>	1,2667x10 <sup>-4</sup> M	-----
<b>Repetibilidad:</b>		
Concentración baja	CV= 3,37 %	CV= 2,94 %
Concentración media	CV= 2,96 %	CV= 2,41 %
Concentración alta	CV= 2,74 %	CV= 3,81 %
<b>Reproducibilidad:</b>		
Concentración baja	CV= 3,45 %	CV= 8,45 %
Concentración media	CV= 2,84 %	CV= 5,16 %
Concentración alta	CV= 2,12 %	CV= 3,77 %
<b>Incertidumbre relativa</b>	4,82 %	0,33 %

En cuanto a la linealidad el método polarográfico presenta un coeficiente de relación muy alto, lo que nos dice que es muy lineal. Este parámetro no es posible compararlo con el método volumétrico, ya que este último no se basa en una curva de calibración para la determinación, sin embargo se puede tomar al parámetro de recuperación como una especie de linealidad. Por lo que es posible decir que el método polarográfico presenta una mejor linealidad que el método volumétrico, ya que el coeficiente de correlación de este último es menor.

Para el límite de detección, el método polarográfico puede detectar una concentración muy pequeña, la cual no se puede comparar con el método volumétrico, ya que en las guías para realizar la validación de un método de



análisis, mencionan que para los métodos volumétricos no es necesario determinar el límite de detección.

En cuanto a la precisión del sistema (repetibilidad y reproducibilidad), se observa que, de manera general, el método polarográfico es más preciso, porque presenta valores de coeficiente de variación más pequeños que el método volumétrico.

Sin embargo, en estos dos últimos parámetros se observó que el método volumétrico no cumple con lo establecido por la CCAYAC en el parámetro de repetibilidad para la concentración más alta de ácido ascórbico y en el parámetro de reproducibilidad para la concentración más baja de ácido ascórbico, mientras que el método polarográfico no cumple sólo en el parámetro de repetibilidad para la concentración más baja de ácido ascórbico.

Para la incertidumbre del método se nota que la determinación volumétrica presenta una menor incertidumbre relativa que la polarográfica, ya que para la segunda se tiene más fuentes de incertidumbre debido a la curva de calibración, la cual es la que contribuye más en el valor de incertidumbre del método polarográfico.

### 5.3. DETERMINACIÓN DE ÁCIDO ASCÓRBICO EN DISTINTAS MATRICES ALIMENTARIAS.

Cabe destacar que la determinación del ácido ascórbico por el método volumétrico se realizó potenciométricamente y con indicador (en ambos se obtuvieron casi los mismo resultados). Los datos que se utilizaron para la comparación de los dos métodos fueron los que se obtuvieron con indicador, ya que esta determinación tiene la ventaja de ser rápida.



## a) Naranja.

Los resultados de la determinación de la concentración de ácido ascórbico en naranja se presentan en el Gráfico 5.18 y en la Tabla 5.24, en donde se observa que la concentración media obtenida con el método volumétrico es muy similar a la que se obtiene con el método polarográfico, sin embargo el primero presenta una desviación estándar mayor, lo que nos indica que los datos están más dispersos. En ambos casos el coeficiente de variación es muy pequeño.

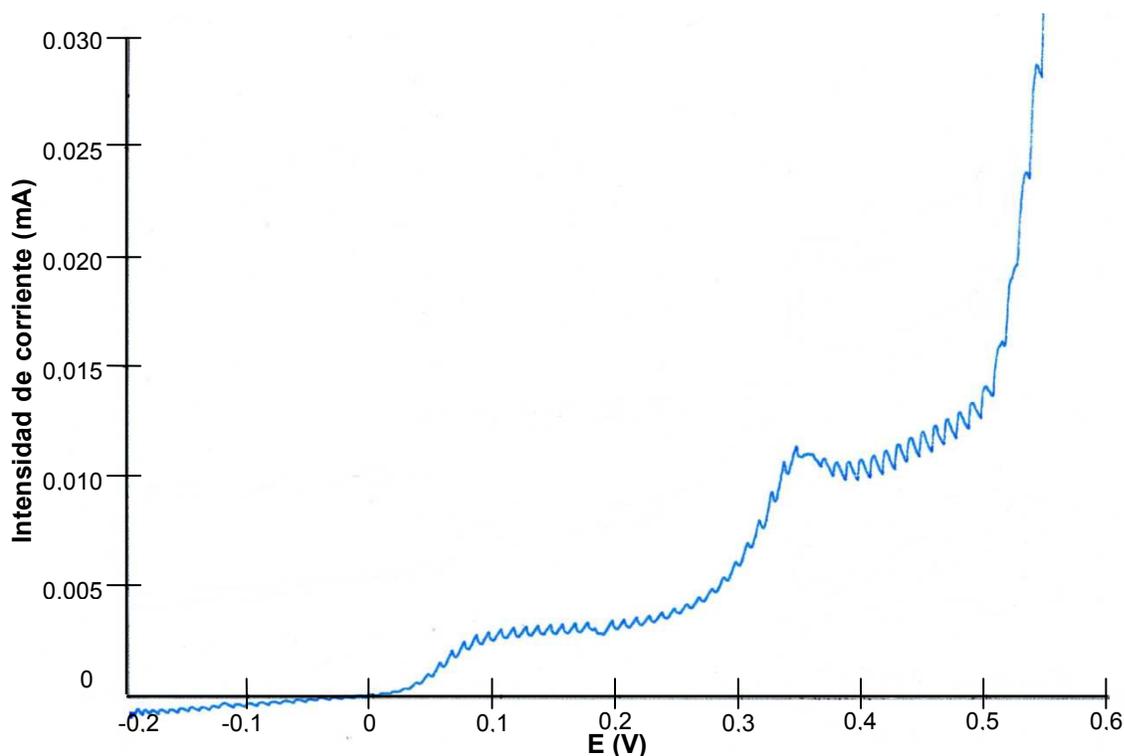


Gráfico 5.18. Señal de oxidación del ácido ascórbico presente en naranja.

Tabla 5.24. Concentración de ácido ascórbico determinado en naranja por método volumétrico y método polarográfico.

Muestra	Método volumétrico			Método polarográfico		
	Masa (g)	Vol. DCPIP (mL)	Conc. AA (mg/g)	Masa (g)	Altura (cm)	Conc. AA (mg/g)
1	1,0354	7,65	0,4478	5,0656	1,3	0,44493
2	1,1164	8,1	0,4397	5,0712	1,3	0,4444
$\bar{X}$			0,4437			0,4447
$\sigma$			0,005699			0,0003474
CV %			1,28			0,08



Al realizar un análisis estadístico, con la prueba t de student de los datos obtenidos (Tabla 5.25), se puede decir que la concentración determinada de ácido ascórbico en la naranja con el método polarográfico es igual a la concentración obtenida por el método volumétrico, ya que el valor estadístico de t (t calculada), es menor al valor de t crítica para una prueba de 2 colas.

**Tabla 5.25. Análisis estadístico para los resultados obtenidos en la determinación de ácido ascórbico en naranja. Prueba t de student.**

Prueba t de dos colas para dos muestras con un nivel de confianza del 95 %

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Media	0,4437	0,4447
Varianza	$3,2475 \times 10^{-5}$	$1,2070 \times 10^{-7}$
Observaciones	2	2
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	1	
Estadístico t	0,2360	
P(T<=t) dos colas	0,8525	
Valor crítico de t (dos colas)	12,7062	

Dado lo anterior la concentración de ácido ascórbico en la naranja es de 0,4447 mg de ácido ascórbico/g de naranja, lo cual concuerda con lo reportado en la literatura (Lide, 1993-1994).

#### b) Limón.

Para la determinación de ácido ascórbico en el limón, la concentración media determinada por el método volumétrico difiere de manera importante de la concentración media determinada por el método polarográfico (Gráfico 5.19 y Tabla 5.26). Además los datos obtenidos por el método volumétrico presentan una desviación estándar mayor que los del método polarográfico, lo que indica que los datos están más dispersos. El método volumétrico se trabajó con cantidades de muestra prácticamente 5 veces menores que en el método polarográfico.

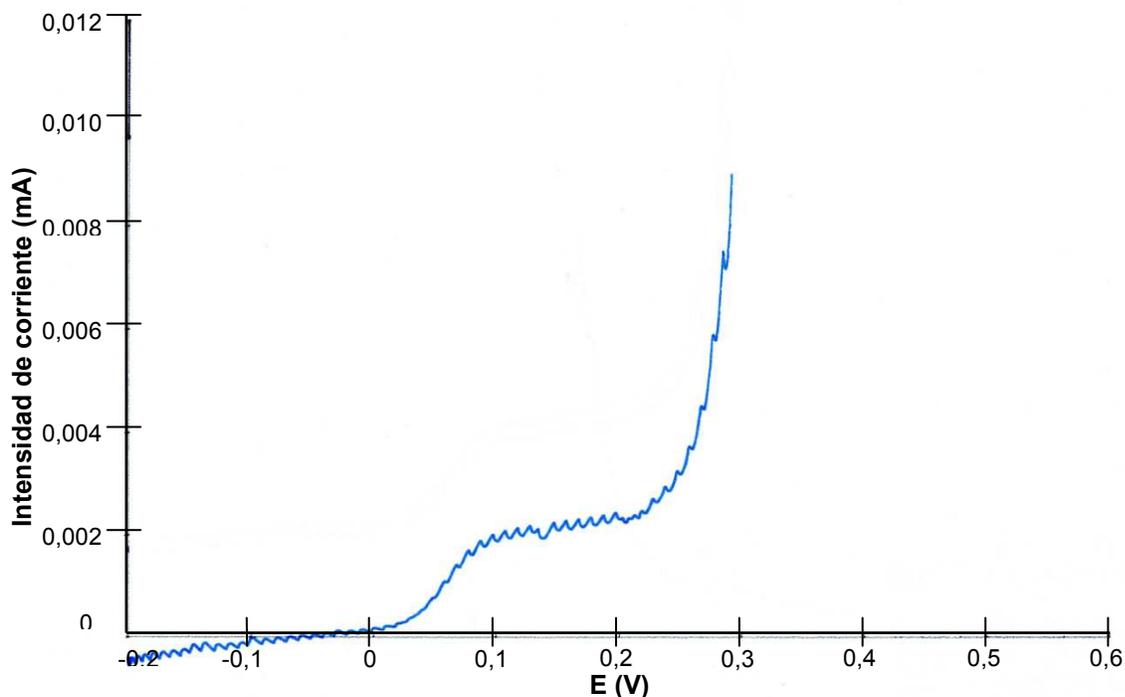


Gráfico 5.19. Señal de oxidación del ácido ascórbico presente en limón.

Tabla 5.26. Concentración de ácido ascórbico determinado en limón por método volumétrico y método polarográfico.

Muestra	Método volumétrico			Método polarográfico		
	Masa (g)	Vol. DCPIP (mL)	Conc. AA (mg/g)	Masa (g)	Altura (cm)	Conc. AA (mg/g)
1	0,9920	7,6	0,4643	5,0416	0,94	0,3367
2	1,0532	7,9	0,4546	5,1421	0,94	0,3301
$\bar{X}$			0,4594			0,3334
$\sigma$			0,006871			0,004653
CV %			1,50			1,40

Con el análisis estadístico se establece que los valores obtenidos por los dos métodos para determinar la concentración de ácido ascórbico no son los mismos, ya que el valor del estadístico t es mucho mayor que el valor de t crítico para una prueba de 2 colas (Tabla 5.27).

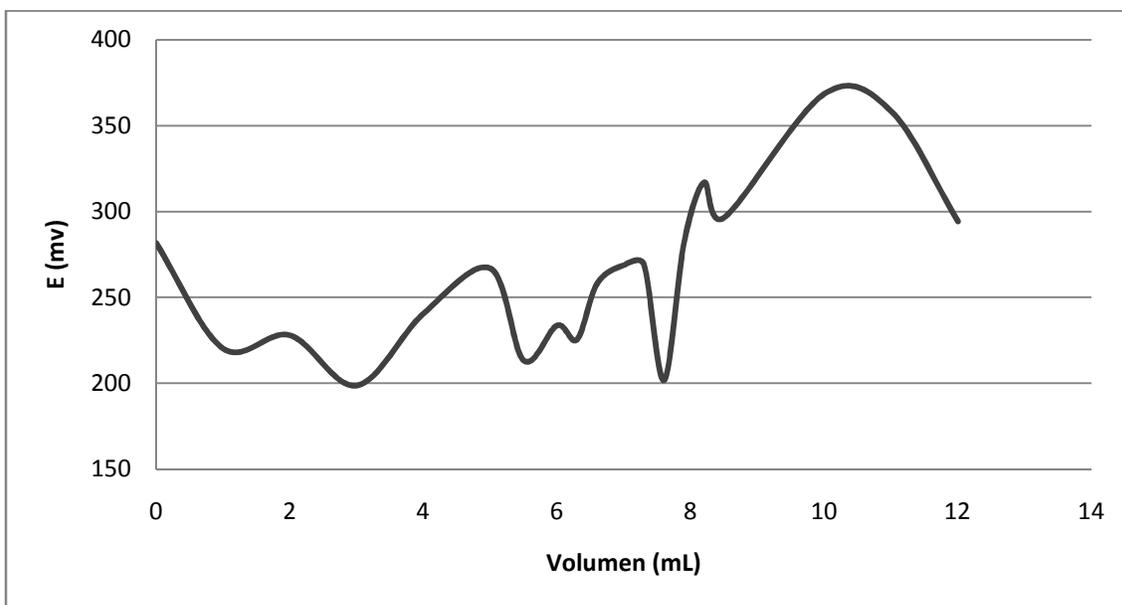


**Tabla 5.27. Análisis estadístico para los resultados obtenidos en la determinación de ácido ascórbico en limón. Prueba t de student.**

Prueba t de dos colas para dos muestras con un nivel de confianza del 95 %

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Media	0,4594	0.3334
Varianza	$4,7211 \times 10^{-5}$	$2.1651 \times 10^{-5}$
Observaciones	2	2
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	2	
Estadístico t	21,4798	
P(T<=t) dos colas	0,002160	
Valor crítico de t (dos colas)	4,3026	

Debido a que la prueba t de student dice que estadísticamente las concentraciones de ácido ascórbico determinadas no son iguales, se volvió a hacer la determinación volumétrica pero potenciométricamente en vez de con indicador, en la cual se observa que la curva de valoración obtenida no se encuentra bien definida y presenta muchas fluctuaciones (Gráfico 5.20), lo que se puede deber a que estén presentes otros compuestos en el limón que interfieren en la determinación.



**Gráfico 5.20. Determinación potenciométrica del ácido ascórbico en limón.**



Considerando lo anterior se tomó el valor de concentración de ácido ascórbico de 0,3334 mg de ácido ascórbico/g de limón, el cual corresponde a la determinación polarográfica.

c) Guayaba.

En el Gráfico 5.21 y en la Tabla 5.28 se presentan los resultados obtenidos de la determinación de ácido ascórbico en guayaba por los dos métodos, en la cual se observa que la concentración media determinada por el método volumétrico es muy similar a la determinada por el método polarográfico, y que la desviación estándar del primer método es mayor que la del segundo, lo que significa que el método volumétrico presenta una mayor dispersión en los datos, aunque al igual que en el caso del limón y la naranja, se trabaja con cantidades menores de muestra.

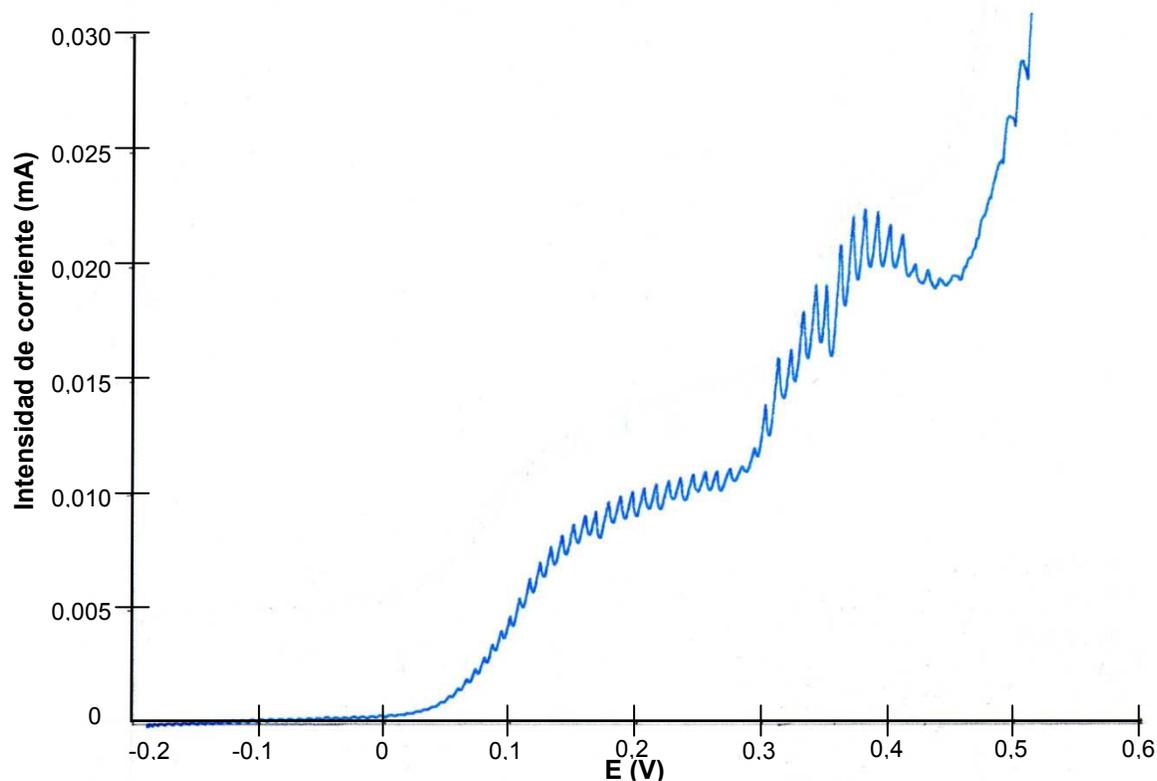


Gráfico 5.21. Señal de oxidación del ácido ascórbico presente en guayaba.



Tabla 5.28. Concentración de ácido ascórbico determinado en guayaba por método volumétrico y método polarográfico.

Muestra	Método volumétrico			Método polarográfico		
	Masa (g)	Vol. DCPIP (mL)	Conc. AA (mg/g)	Masa (g)	Altura (cm)	Conc. AA (mg/g)
1	0,5686	20,15	2,1476	3,2411	4,4	2,1736
2	0,6028	20,6	2,0710	3,2436	4,45	2,1958
$\bar{X}$			2,1093			2,1847
$\sigma$			0,05417			0,01566
CV %			2,57			0,72

En el análisis estadístico para los datos obtenidos (Tabla 5.29), se observa que el valor del estadístico t es menor que el valor crítico de t para una prueba de dos colas, por lo que se concluye que las concentraciones medias determinadas por los dos métodos son iguales.

Tabla 5.29. Análisis estadístico para los resultados obtenidos en la determinación de ácido ascórbico en guayaba. Prueba t de student.

Prueba t de dos colas para dos muestras con un nivel de confianza del 95 %

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Media	2,1093	2,1847
Varianza	0,002934	0,0002453
Observaciones	2	2
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	1	
Estadístico t	1,8903	
P(T<=t) dos colas	0,3098	
Valor crítico de t (dos colas)	12,7062	

Por lo anterior es posible concluir que la concentración de ácido ascórbico es de 2,1847 mg de ácido ascórbico/g de guayaba.

d) Chile.

Para la determinación de ácido ascórbico en Chile, la concentración media obtenida por el método volumétrico es más pequeña que la concentración



obtenida por el método polarográfico, y que la primera presenta un desviación estándar mayor (Gráfico 5.22 y Tabla 5.30).

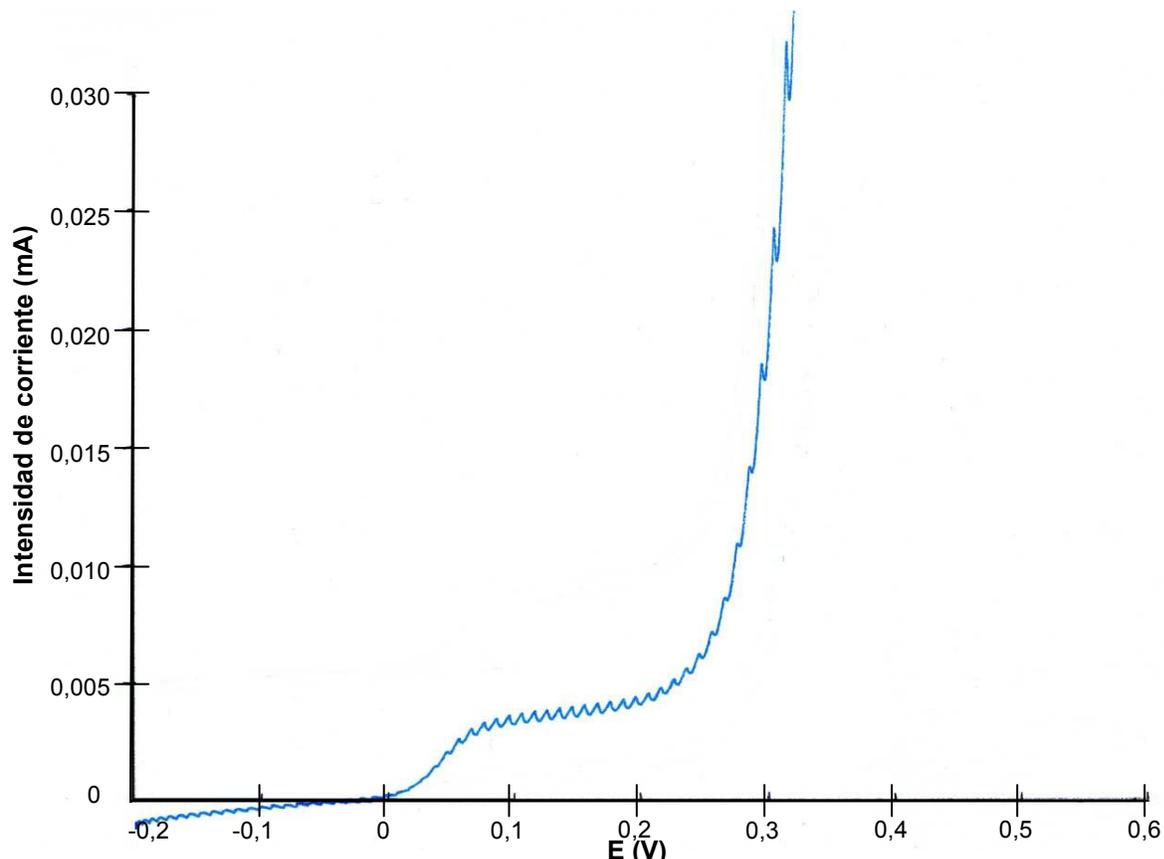


Gráfico 5.22. Señal de oxidación del ácido ascórbico presente en Chile.

Tabla 5.30. Concentración de ácido ascórbico determinado en Chile por método volumétrico y método polarográfico.

Muestra	Método volumétrico			Método polarográfico		
	Masa (g)	Vol. DCPIP (mL)	Conc. AA (mg/g)	Masa (g)	Altura (cm)	Conc. AA (mg/g)
1	1,1153	2,75	0,1494	2,4395	0,68	0,5311
2	1,2959	3,3	0,1543	2,7736	0,8	0,5340
$\bar{X}$			0,1519			0,5325
$\sigma$			0,003462			0,002045
CV %			2,28			0,38

Con el análisis estadístico, prueba t de student, de los datos obtenidos (Tabla 5.31), es posible decir que las concentraciones medias obtenidas por ambos métodos no son iguales, ya que el valor del estadístico t es mucho mayor que el valor crítico de t.

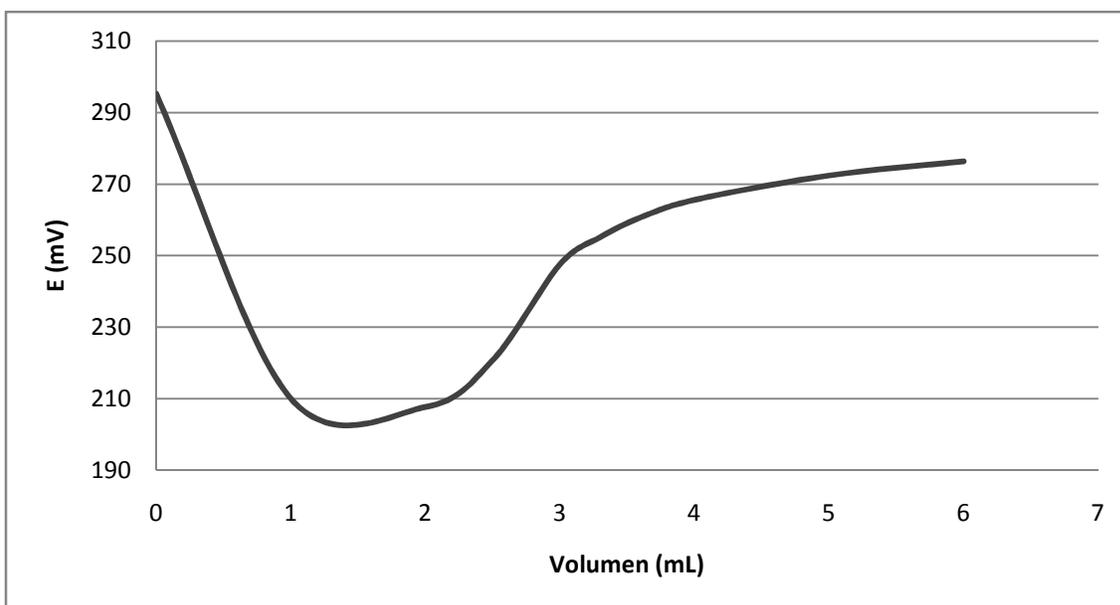


**Tabla 5.31. Análisis estadístico para los resultados obtenidos en la determinación de ácido ascórbico en Chile. Prueba t de student.**

Prueba t de dos colas para dos muestras con un nivel de confianza del 95 %

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Media	0,1519	0,5325
Varianza	$1,1985 \times 10^{-5}$	$4,1837 \times 10^{-6}$
Observaciones	2	2
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	2	
Estadístico t	133,8797	
P(T<=t) dos colas	$5,5787 \times 10^{-5}$	
Valor crítico de t (dos colas)	4,3026	

Dado lo anterior se volvió a realizar la prueba volumétrica pero con un potenciómetro en vez de con indicador, obteniendo una curva de valoración (Gráfico 5.23) diferente a la que se obtiene al titular ácido ascórbico con DCPIP, ya que el salto que se presenta es muy pequeño, lo que indica que la titulación es poco cuantitativa.



**Gráfico 5.23. Determinación potenciométrica de la concentración de ácido ascórbico en Chile.**

La concentración de ácido ascórbico en el Chile es de 0,5325 mg de ácido ascórbico/g de Chile, valor que corresponde a la determinación polarográfica.



## e) Brócoli.

Como se puede observar en el polarograma del ácido ascórbico en brócoli (Gráfico 5.24), la señal de oxidación de éste presenta una elevada inclinación, lo que imposibilita la medición de la señal. Por lo que no fue posible realizar la comparación entre el método polarográfico y el volumétrico para esta determinación.

La inclinación de la señal puede deberse a la modificación de la tensión superficial de la gota del electrodo de mercurio debido a moléculas presentes en la composición del brócoli como pueden ser las proteínas. Para evitar que la tensión superficial se modifique es necesario estudiar la oxidación del ácido ascórbico agregando algún surfactante.

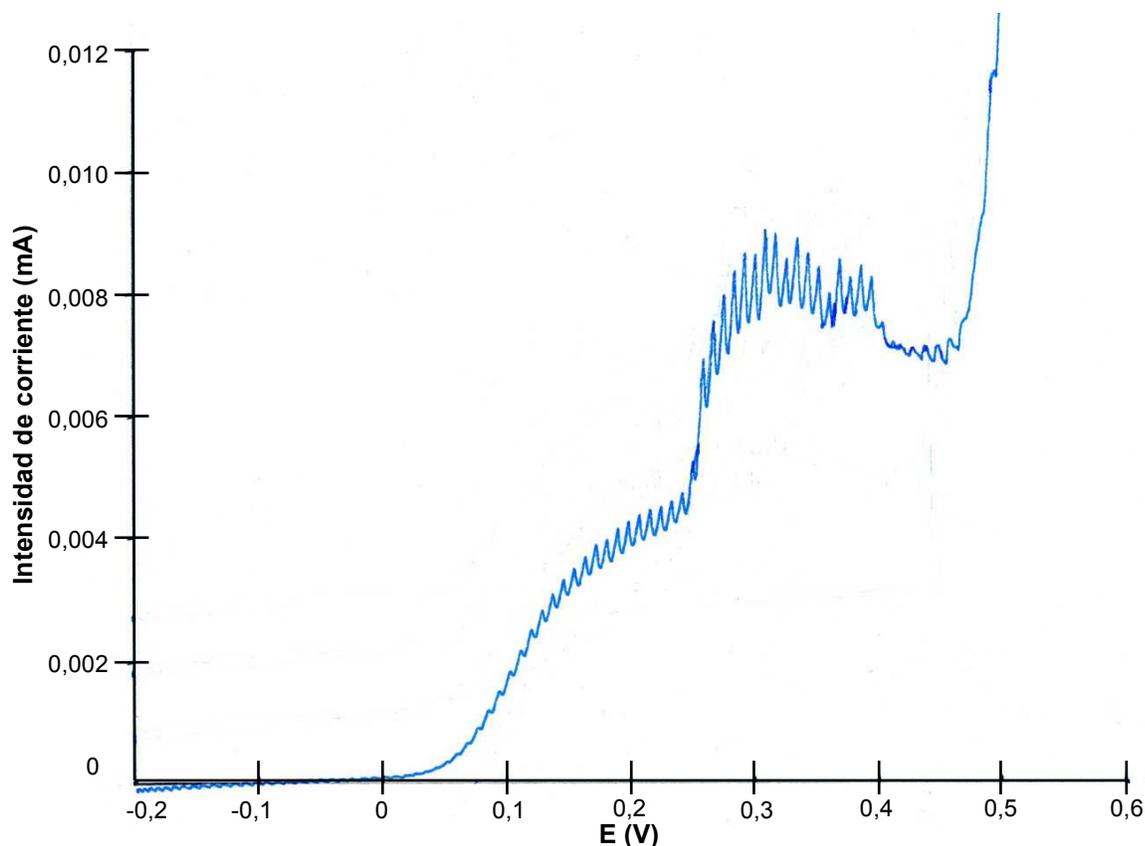


Gráfico 5.24. Señal de oxidación del ácido ascórbico presente en brócoli.



## 6. CONCLUSIONES.

El ácido ascórbico es una vitamina cuya estabilidad está muy marcada por reacciones de óxido reducción, ya que ésta presenta una función como antioxidante o participa en reacciones redox en el organismo o incluso en los alimentos donde se encuentra, como las frutas.

Debido a la función de esta vitamina de participar en reacciones redox, es posible plantear métodos electroquímicos para su determinación que se basen en sus propiedades óxido-reductoras.

De los métodos volumétricos, el que arrojó mejor resultado fue la determinación con yodo, ya que la curva de valoración obtenida fue la más definida y el volumen obtenido por la titulación con indicador fue el más cercano al obtenido potenciométricamente. Esta determinación presenta varios pasos, como la normalización del titulante, y cuidados, debido a que se trabaja con yodo, el cual es volátil, por lo que la determinación se vuelve lenta. Dado lo anterior, el método volumétrico seleccionado fue la determinación con 2,6-diclorofenol indofenol, ya que a pesar de que la curva de valoración que presenta no está tan bien definida, tiene la ventaja de que se puede usar un indicador, el cual hace la determinación rápida y sencilla.

Para el método espectrofotométrico se encontró que no era factible su uso, ya que presentó problemas, como: cinética de reacción lenta y que el azul de metileno reacciona con el oxígeno del ambiente, lo que interfiere en la determinación.

Para el método polarográfico se encontró que las condiciones óptimas para observar una señal definida de la oxidación del ácido ascórbico fueron las siguientes:



<b>Técnica:</b>	Polarografía Clásica
<b>Volumen de electrolito soporte (KNO<sub>3</sub> a pH 6):</b>	25 mL
<b>Tiempo de purga con N<sub>2</sub>:</b>	3 min
<b>Potencial inicial (E<sub>in</sub>):</b>	-0,2 V
<b>Velocidad de barrido (V<sub>barrido</sub>):</b>	10 mV/s
<b>Tiempo de goteo (T<sub>goteo</sub>):</b>	1 gota/s
<b>Sensibilidad:</b>	0,05 mA
<b>Intervalo de trabajo:</b>	1,5 V

Dado que el método polarográfico no presentó ningún problema, fue el que se escogió para validar y comparar con el método oficial para la determinación de ácido ascórbico, el cual se basa en una valoración redox con el 2,6-diclorofenol indofenol, que también fue validado.

Con la validación de los métodos escogidos, se encontró que el método polarográfico es mejor que el método volumétrico, ya que presentó mejores resultados en los parámetros evaluados, mayor relación lineal, mayor precisión y se conoce el límite de detección, además de que cumplen con los criterios de aceptación recomendados en la guía de CCAYAC; sin embargo este método presenta una mayor incertidumbre, ya que presenta mas fuentes de incertidumbre.

Para la determinación de ácido ascórbico en las matrices alimentarias se encontró que la concentración determinada por el método polarográfico es estadísticamente igual a la determinada por el método volumétrico para la naranja y la guayaba, y difieren para el limón y el chile. Para estos últimos se observó que el método volumétrico presentaba problemas en la determinación, por lo que se consideró la concentración determinada por el método polarográfico como la correcta.

Gracias a lo anterior es posible decir que el método polarográfico es un método adecuado y factible para la determinación de ácido ascórbico, ya que es un método confiable, preciso (ya que posee bajos coeficientes de variación en la reproducibilidad y repetibilidad), rápido, puede determinar concentraciones bajas de ácido ascórbico, presenta una incertidumbre aceptable y es económico.



## 7. BIBLIOGRAFÍA.

- Augustin, J., Association of Vitamin Chemists. (1985). *Methods of Vitamin Assay*. 4<sup>th</sup> edition. New York, USA. John Wiley & Sons.
- Assard, H., May, J., Smirnoff, N. (2004). *Vitamin C: function and biochemistry in animals and plants*. 1<sup>st</sup> edition. USA. BIOS Scientific Publishers.
- Badui, S. (1993). *Química de los Alimentos*. 3<sup>a</sup> edición. México. Alhambra Mexicana.
- Burton, G., Traber, M. (1990). *Vitamin E: Antioxidant activity, biokinetics and bioavailability*. *Annu. Rev. Nutr.* **10**. 357-382.
- CCAyAC. (2011). *Criterios para la validación de métodos fisicoquímicos*. 1<sup>a</sup> edición. México.
- CENAM. (2008). *Guía técnica sobre trazabilidad e incertidumbre en las mediciones analíticas que emplean las técnicas de espectrofotometría de absorción atómica y de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente*. México
- Chen, H., Song, Q., Liu, H., Jin, Q. (2001). *Determination of ascorbic acid in pharmaceuticals, drinks and vegetables with methylene blue based on bleaching out reaction*. *J. Instrument. Anal.* **20**. 55-57.
- Christian, G. (2009). *Química Analítica*. 6<sup>a</sup> edición. México. McGraw-Hill.
- Combs, G. (2008). *The vitamins: Fundamental aspects of nutrition and health*. 3<sup>rd</sup> edition. California, USA. Elsevier Academic Press.
- CONACyT. (2010). *Guías Técnicas: Validación de métodos analíticos fisicoquímicos*. 1<sup>a</sup> edición. México.
- Deutsch, J., Kolhouse, J. (1993). *Ascorbate and dehydroascorbate measurements in aqueous solutions and plasma determined by gas chromatography-mass spectrometry*. *Anal. Chem.* **65**. 321-326.
- Elving, P., Smith, D. (1960). *The Graphite Electrode. An Improved Technique for Voltammetry and Chronopotentiometry*. *Anal. Chem.* **32**. 1849-1854.



- EMA, CENAM. (2008). Guía para la validación y la verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empleados por el laboratorio clínico. 1ª edición. México.
- Englard, S., Seifter, S. (1986). *The biochemical functions of ascorbic acid*. Ann. Rev. Nutr. **6**. 365-406.
- Ensafi, A., Taei, M., Khayamian, T., Arabzadeh, A. (2010). *Highly selective determination of ascorbic acid, dopamine, and uric acid by differential pulse voltammetry using poly(sulfonazo III) modified glassy carbon electrode*. Sensor. Actuat. B-Chem. **147**. 213-221.
- Eurachem. (1998). *The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*. 1<sup>st</sup> digital edition.
- Fennema, O. (2000). *Química de los alimentos*. 2ª edición. España. Editorial Acribia.
- Harris, D. (2007). *Análisis químico cuantitativo*. 3ª edición. España. Editorial Reverté.
- ICH. (1994). *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)*. 4<sup>th</sup> edition. USA.
- IMNC. (2002). *Guía para la Expresión de la Incertidumbre en las Mediciones*. México.
- Kirk, R., Othmer, D. (1978-1984). *Encyclopedia of chemical technology*. 3<sup>rd</sup> edition. New York, USA. John Wiley & Sons.
- Ksenzhek, O., Petrova, S., Kolodyazhny, M. (1977). *Electrochemical properties of some redox indicators*. Bioelectroch. Bioener. **4**. 346-357.
- Lide, D. (1993-1994). *Handbook of Chemistry and Physics*. 74<sup>th</sup> edition. USA. CRC Press.
- Machlin, L. (1991). *Handbook of vitamins*. 2<sup>nd</sup> edition. Michigan, USA. M. Dekker.
- Miller, J, Miller, J. (2002). *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*. 4ª edición. Madrid, España. Prentice Hall.



- Nagy, S. (1980). *Vitamin C contents of citrus fruit and their products: A review*. J. Agric. Food Chem. **28**. 8-18.
- OAA. (2003). *Guía para la validación de métodos de ensayo*. 1ª Versión. Argentina.
- Pénicaud, C., Peyron, S., Bouhon, P., Gontard, N., Guillard, V. (2010). *Ascorbic acid in food: Development of a rapid analysis technique and application to diffusivity determination*. Food Res. Int. **43**. 838-847.
- Pungor, E., Szepesváry, É. (1968). *Voltammetric studies with silicone rubber-based graphite electrodes*. Anal. Chim. Acta. **43**. 289-296.
- Rumsey, S., Levine, M. (1999). *Absorption, transport, and disposition of ascorbic acid in humans*. J. Nutr. Biochem. **9**. 116-130.
- Santhanam, K., Krishnan, V. (1961). *Estimation of Ascorbic Acid by Controlled Potential Coulometry*. Anal. Chem. **33**. 1493-1495.
- Sies, H., Stahl, W., Sundquist, A. (1992). *Antioxidant functions of vitamins. Vitamins E and C, beta-carotene, and others carotenoids*. Ann. N. Y. Acad. Sci. **669**. 7-20.
- Skoog, D., West, D. (2005). *Fundamentos de química analítica*. 8ª edición. México. Thomson.
- Skoog, D., Holler, F., Crouch, S. (2001). *Principios de Análisis Instrumental*. 5ª edición. Madrid, España. McGraw-Hill.
- VanderJagt, D., Garry, P., Hunt, W. (1986). *Ascorbate in plasma as measured by liquid chromatography and by dichlorophenol indophenol colorimetry*. Clin. Chem. **32**. 1004-1006.
- Worsfold, P., Townshend, A., Poole, C. (2005). *Encyclopedia of Analytical Science*. 2<sup>nd</sup> edition. Vol. 3. Michigan, USA. Elsevier. Academic Press.
- Zare, H., Nasirizadeh, N. (2010). *Simultaneous determination of ascorbic acid, adrenaline and uric acid at a hematoxylin multi-wall carbon nanotube modified glassy carbon electrode*. Sensor. Actuat. B-Chem. **143**. 666-672.
- Zempleni, J. (2007). *Handbook of vitamins*. 4<sup>th</sup> edition. USA. CRC.



## 8. ANEXOS.

### 8.1. ANEXO A: NORMALIZACIÓN DE LOS REACTIVOS UTILIZADOS.

- a) Normalización de la disolución de tiosulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) para la determinación de ácido ascórbico con yodo.

La normalización del tiosulfato se basa en la reacción de éste con dicromato de sodio patrón primario en medio ácido.

Es posible notar que la curva de valoración (Gráfico 8.1) presenta un gran salto de potencial (de 200 mV), lo que significa que la constante de equilibrio de la reacción entre el  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$  y  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  es muy grande, y está termodinámicamente favorecida. Esto hace posible identificar el punto final de la valoración, que corresponde al punto de inflexión de la curva de valoración, el cual es representado por el máximo obtenido en la primera derivada de la curva de titulación (Gráfico 8.2).

Con este volumen final de 20,25 mL y con los moles de dicromato con los que se inició, se determina la concentración del tiosulfato que es de 0,1003 M.

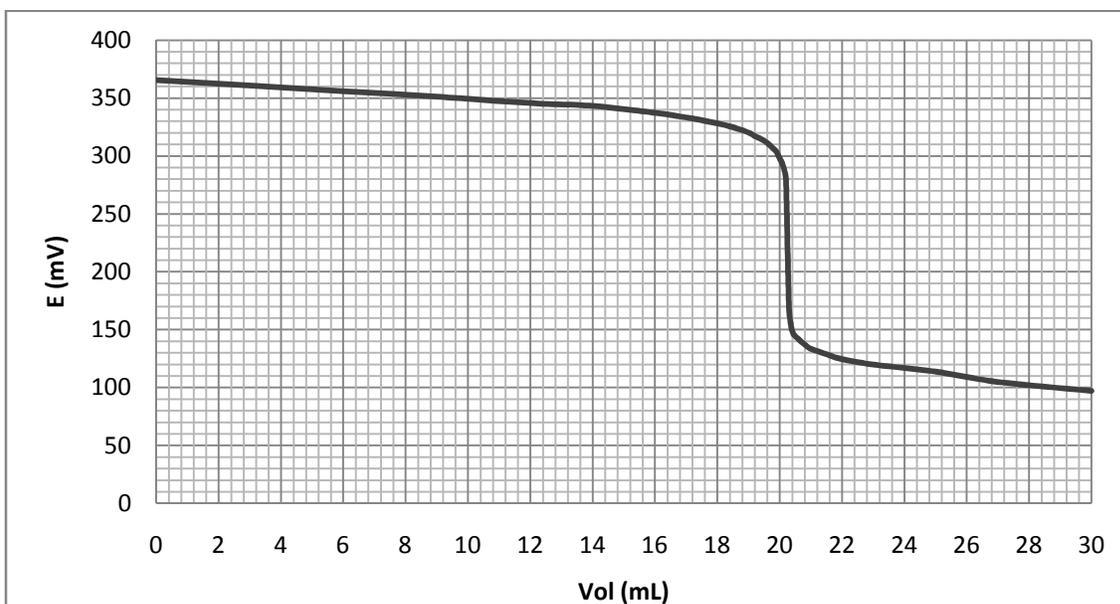


Gráfico 8.1. Valoración potenciométrica del dicromato con tiosulfato. Normalización del tiosulfato.

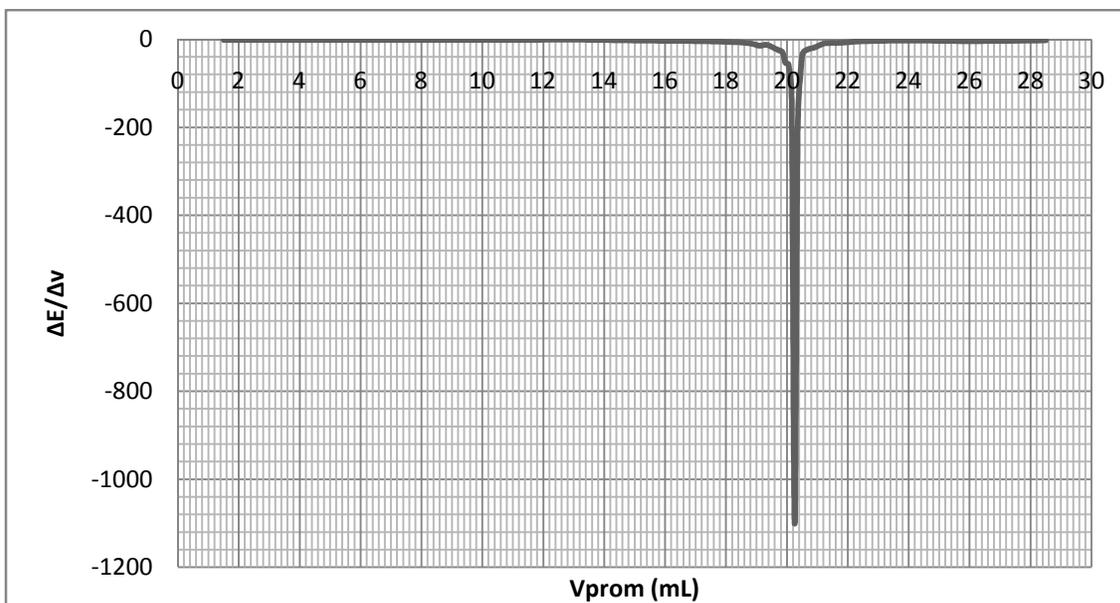


Gráfico 8.2. Primera derivada de la valoración del dicromato con tiosulfato. Normalización del tiosulfato.

- Cálculos.

Masa de  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  (g): **0,1009**  
Volumen de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  gastado (mL): **20,25**

$$[\text{S}_2\text{O}_3^{2-}] = \left( \frac{0,1009 \text{ g Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7}{298,034 \text{ g/mol}} \right) \left( \frac{6 \text{ mol S}_2\text{O}_3^{2-}}{1 \text{ mol Cr}_2\text{O}_7^{2-}} \right) = \left( \frac{2,03 \times 10^{-3} \text{ mol S}_2\text{O}_3^{2-}}{0,02025 \text{ L}} \right) = \mathbf{0,1003 \text{ M}}$$

b) Normalización de la disolución de  $\text{ClO}^-$  (Clorox).

La normalización del hipoclorito se hace por medio de una valoración por retroceso, en donde se titula el yodo que no reacciona con el hipoclorito con una disolución de tiosulfato de sodio. En el Gráfico 8.3 se muestra la curva de titulación potenciométrica del yodo con tiosulfato, la cual presenta un salto de potencial de 180 mV, lo que significa que la reacción posee una constante de equilibrio muy grande ( $K_{\text{eq}} = 10^{14.67}$ ), es muy cuantitativa y es termodinámicamente espontánea. Debido a este salto es posible determinar con facilidad a través de la primera derivada de la curva de titulación (Gráfico 8.4) el punto de inflexión, que corresponde al punto final de la valoración. El volumen de tiosulfato gastado para alcanzar el punto final de la titulación es de 12,7 mL.

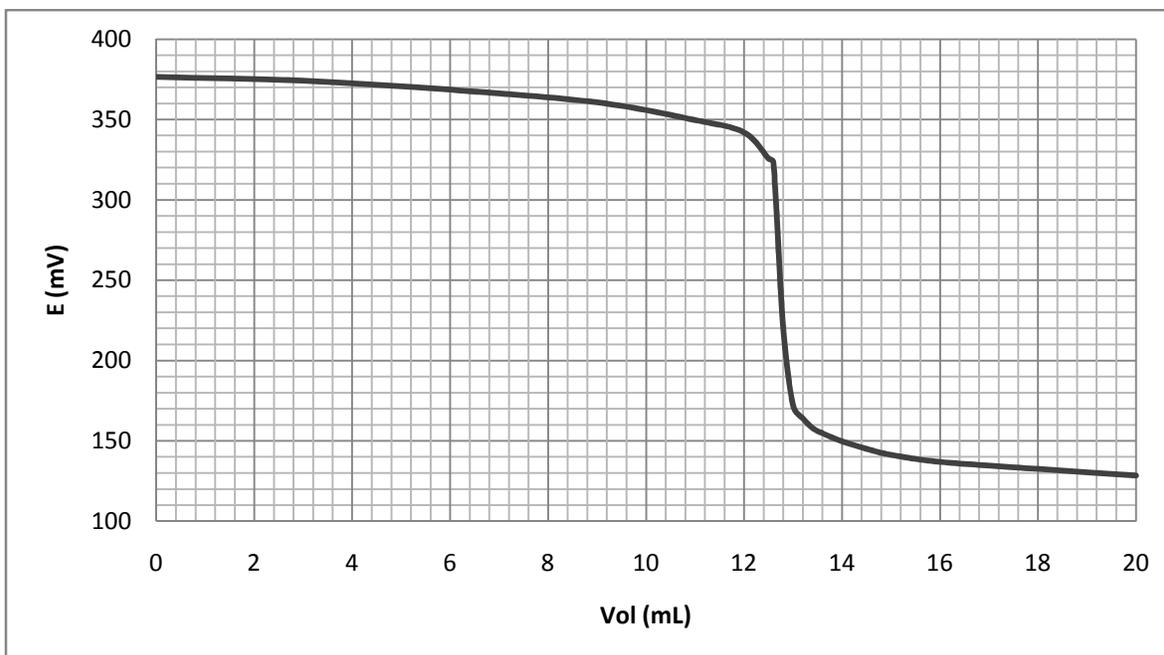


Gráfico 8.3. Valoración potenciométrica de yodo con tiosulfato para normalizar el hipoclorito.

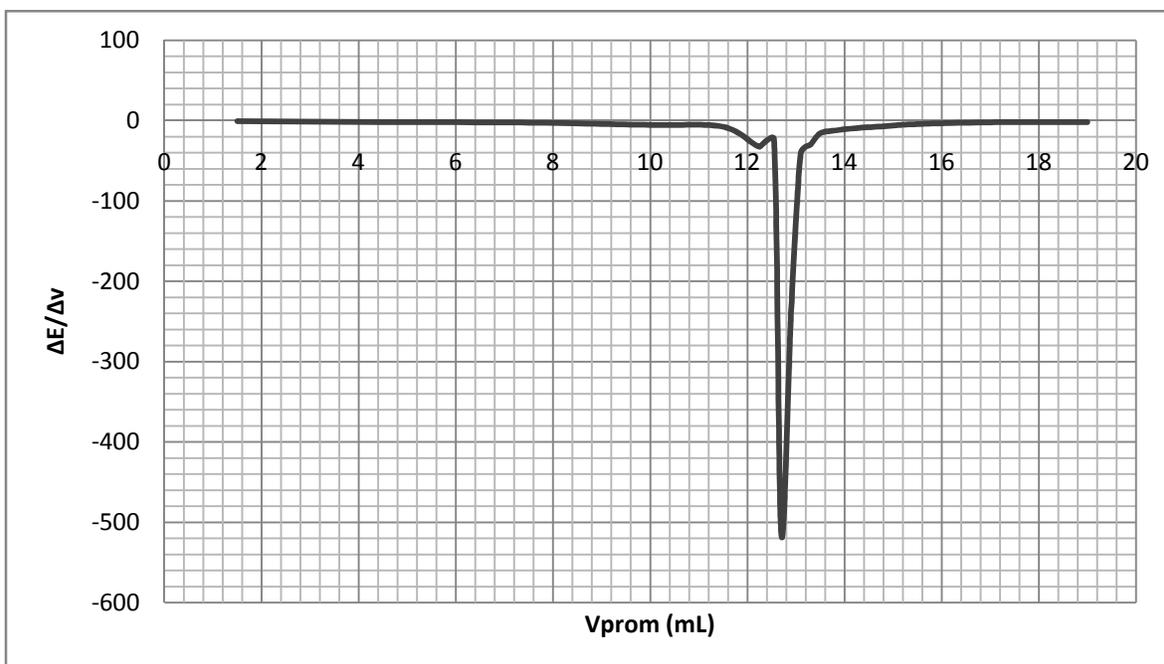


Gráfico 8.4. Primera derivada de la valoración de yodo con tiosulfato para la normalización de hipoclorito.

Con el volumen de tiosulfato gastado en el punto final de la valoración se calcula indirectamente la concentración de hipoclorito en el limpiador (Clorox) que es 0,6370 M.



- Cálculos.

Alícuota de clorox (mL): **1**  
Masa de KI (g): **2**  
Concentración de tiosulfato (M): **0,1003**  
Volumen gastado de tiosulfato (M): **12,7**

$$I_2 \text{ producido} = 12,7 \text{ mL} \left( \frac{0,1003 \text{ mol } S_2O_3^{2-}}{1000 \text{ mL}} \right) \left( \frac{1 \text{ mol } I_2}{2 \text{ mol } S_2O_3^{2-}} \right) = 6,37 \times 10^{-4} \text{ mol } I_2$$

$$[ClO^-] = 6,37 \times 10^{-4} \text{ mol } I_2 \left( \frac{1 \text{ mol } ClO^-}{1 \text{ mol } I_2} \right) = \frac{6,37 \times 10^{-4} \text{ mol}}{0,001 \text{ L}} = \mathbf{0,6370 \text{ M}}$$



## 8.2. ANEXO B: CÁLCULOS PARA DETERMINAR LA CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO ASCÓRBICO.

### 8.2.1. Métodos volumétricos.

a) Determinación de ácido ascórbico por valoración con 2,6-diclorofenol indofenol.

- Cantidad analizada de ácido ascórbico.

Concentración inicial de AA (mg/mL): **1**  
Volumen analizado de AA (mL): **0,5**

$$\text{Cantidad de AA inicial} = 0,5 \text{ mL}(1 \text{ mg/mL}) = \mathbf{0,5 \text{ mg}}$$

- Cantidad calculada de ácido ascórbico a partir de la valoración potenciométrica.

Concentración del DCPIP (M):  **$3,45 \times 10^{-4}$**   
Volumen gastado de DCPIP (mL): **8,55**

$$\begin{aligned} \text{Cantidad de AA} &= 8,55 \text{ mL DCPIP} \left( \frac{3,45 \times 10^{-4} \text{ mol}}{1000 \text{ mL}} \right) \left( \frac{1 \text{ mol AA}}{1 \text{ mol DCPIP}} \right) \left( \frac{176,17 \text{ g AA}}{1 \text{ mol AA}} \right) \\ &= \mathbf{0,5193 \text{ mg AA}} \end{aligned}$$

- Cantidad calculada de ácido ascórbico a partir de la valoración con indicador.

Concentración del DCPIP (M):  **$3,45 \times 10^{-4}$**   
Volumen gastado de DCPIP (mL): **8,9**

$$\begin{aligned} \text{Cantidad de AA} &= 8,9 \text{ mL DCPIP} \left( \frac{3,45 \times 10^{-4} \text{ mol}}{1000 \text{ mL}} \right) \left( \frac{1 \text{ mol AA}}{1 \text{ mol DCPIP}} \right) \left( \frac{176,17 \text{ g AA}}{1 \text{ mol AA}} \right) \\ &= \mathbf{0,5409 \text{ mg AA}} \end{aligned}$$

b) Determinación de ácido ascórbico por valoración con  $\text{I}_2$ .

- Titulación potenciométrica.

Cantidad inicial de AA (g): **0,1069**  
Masa de  $\text{KIO}_3$  (g): **0,1061**  
Masa de KI (g): **2**  
Concentración de  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  (M): **0,1003**



Volumen gastado de  $S_2O_3^{2-}$  (mL): **17,45**

$$\text{Moles iniciales de } I_2 = \left( \frac{0,1061 \text{ g KIO}_3}{214,01 \text{ g/mol}} \right) \left( \frac{6 \text{ mol } I_2}{2 \text{ mol KIO}_3} \right) = 1,49 \times 10^{-3} \text{ mol } I_2$$

$$\begin{aligned} \text{Moles de } I_2 \text{ que reaccionan con el AA} &= 1,49 \times 10^{-3} - \left[ 17,45 \text{ mL} \left( \frac{0,1003 \text{ mol}}{1000 \text{ mL}} \right) \left( \frac{1 \text{ mol } I_2}{2 \text{ mol } S_2O_3^{2-}} \right) \right] \\ &= \mathbf{6,12 \times 10^{-4} \text{ mol de } I_2} \end{aligned}$$

$$\text{Cantidad de AA determinado} = 6,12 \times 10^{-4} \text{ mol} \left( \frac{1 \text{ mol de AA}}{1 \text{ mol de } I_2} \right) \left( \frac{176,17 \text{ g AA}}{1 \text{ mol AA}} \right) = \mathbf{0,1078 \text{ g AA}}$$

- Titulación con indicador.

Cantidad inicial de AA (g): **0,1069**  
Masa de  $KIO_3$  (g): **0,1061**  
Masa de KI (g): **2**  
Concentración de  $S_2O_3^{2-}$  (M): **0,1003**  
Volumen gastado de  $S_2O_3^{2-}$  (mL): **17,7**

$$\text{Moles iniciales de } I_2 = \left( \frac{0,1061 \text{ g KIO}_3}{214,01 \text{ g/mol}} \right) \left( \frac{6 \text{ mol } I_2}{2 \text{ mol KIO}_3} \right) = 1,49 \times 10^{-3} \text{ mol } I_2$$

$$\begin{aligned} \text{Moles de } I_2 \text{ que reaccionan con el AA} &= 1,49 \times 10^{-3} - \left[ 17,7 \text{ mL} \left( \frac{0,1003 \text{ mol}}{1000 \text{ mL}} \right) \left( \frac{1 \text{ mol } I_2}{2 \text{ mol } S_2O_3^{2-}} \right) \right] \\ &= \mathbf{6,023 \times 10^{-4} \text{ mol de } I_2} \end{aligned}$$

$$\text{Cantidad de AA determinado} = 6,12 \times 10^{-4} \text{ mol} \left( \frac{1 \text{ mol de AA}}{1 \text{ mol de } I_2} \right) \left( \frac{176,17 \text{ g AA}}{1 \text{ mol AA}} \right) = \mathbf{0,1062 \text{ g AA}}$$

c) Determinación de ácido ascórbico por valoración con  $ClO^-$ .

Cantidad inicial de AA (g): **0,1037**  
Concentración de hipoclorito (M): **0,0503**  
Volumen gastado de hipoclorito (mL): **11,5**

$$\text{Cantidad de AA} = 11,5 \text{ mL} \left( \frac{0,0503 \text{ mol } ClO^-}{1000 \text{ mL}} \right) \left( \frac{1 \text{ mol AA}}{1 \text{ mol } ClO^-} \right) \left( \frac{176,17 \text{ g AA}}{1 \text{ mol AA}} \right) = \mathbf{0,1019 \text{ g AA}}$$



### 8.3. ANEXO C: CÁLCULOS DE INCERTIDUMBRE DEL MÉTODO POLAROGRÁFICO.

- Modelo Matemático.

El cálculo involucrado en la determinación de la concentración de ácido ascórbico en una muestra utilizando el método polarográfico está dado por la siguiente ecuación:

$$C_{AA} = \frac{C_{CC} \times Vol \times PM_{AA}}{m_{Muestra}}$$

en donde:

$C_{AA}$  = concentración de ácido ascórbico presente en la muestra (mg/g)

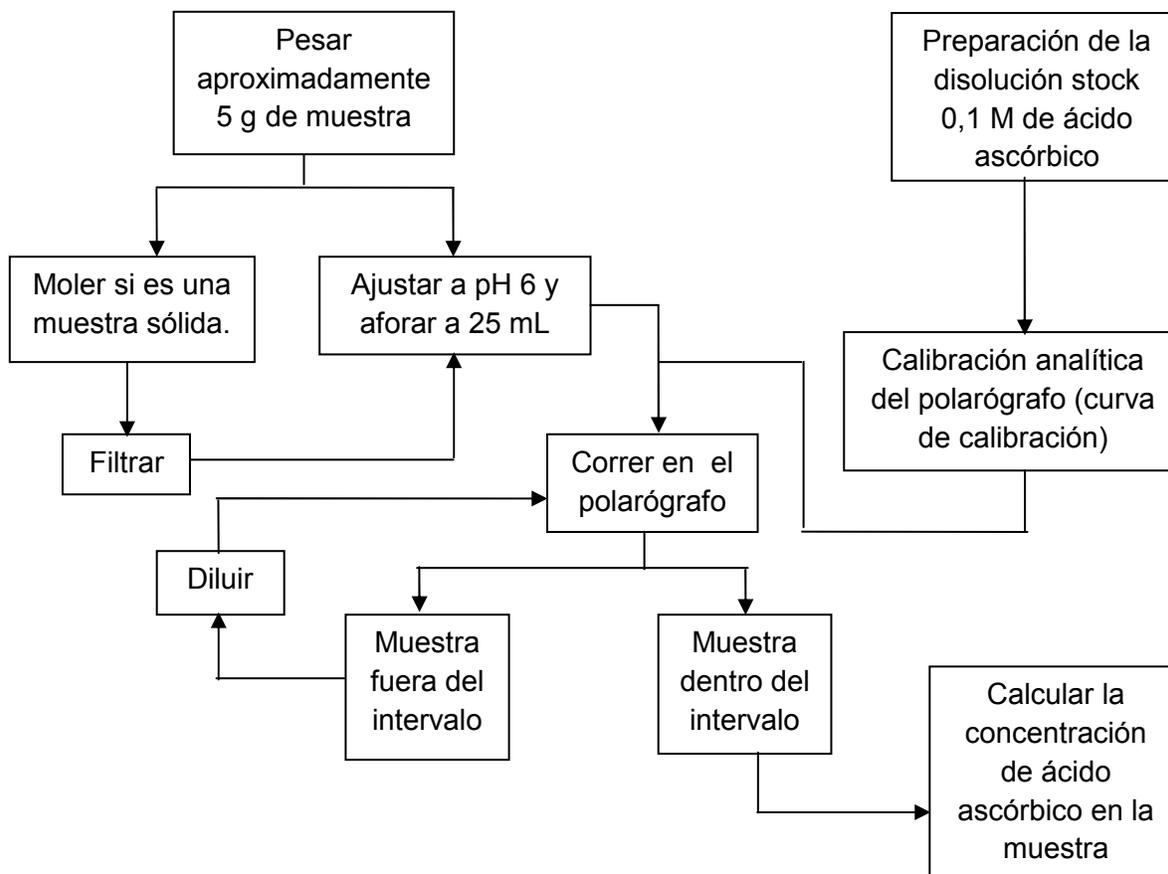
$C_{CC}$  = concentración de ácido ascórbico determinada por la curva de calibración (M)

Vol = volumen de aforo de la muestra analizada (mL)

$m_{Muestra}$  = masa de la muestra a analizar (g)

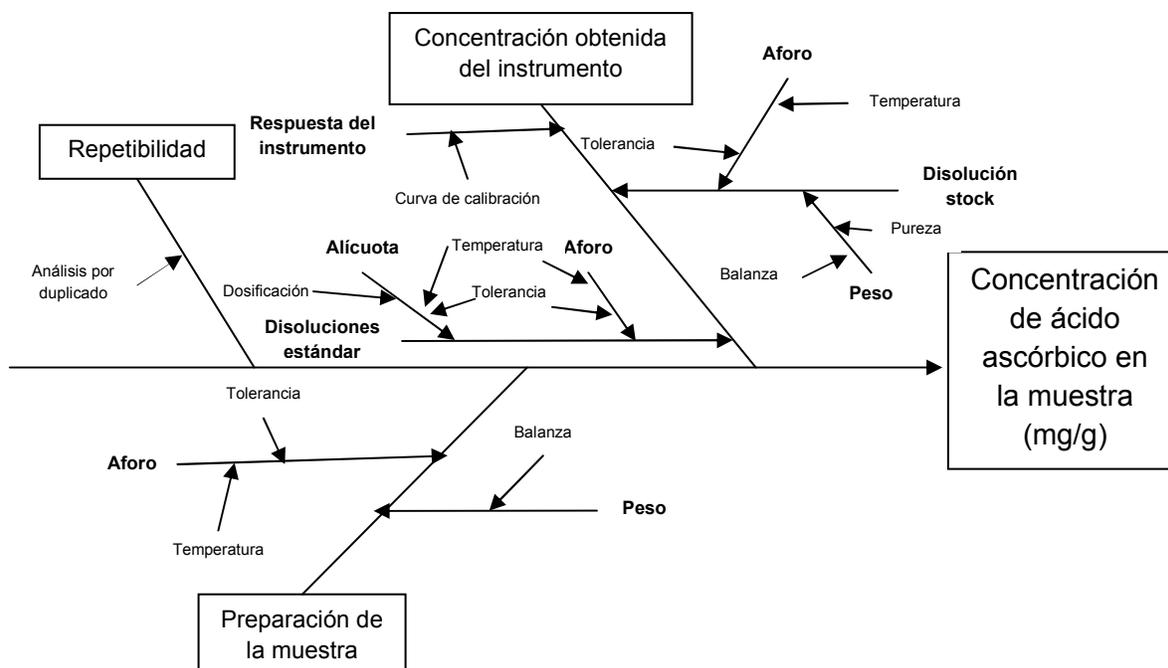
$PM_{AA}$  = peso molecular del ácido ascórbico (g/mol)

Diagrama de flujo del procedimiento experimental para determinación de ácido ascórbico.



- Identificación de las fuentes de incertidumbre del método.

Las fuentes de incertidumbre identificadas se plasman a continuación en un diagrama de espina de pescado.



- Cálculo de la incertidumbre combinada relativa del método polarográfico ( $u_{CAA}$ ).

Ya identificadas las fuentes de incertidumbre se prosigue a los realizar los cálculos correspondientes.

- Incertidumbre de la concentración obtenida por la curva de calibración ( $u_{CC}$ )

La incertidumbre relacionada con la concentración de ácido ascórbico obtenida por la curva de calibración se debe a 3 factores, la incertidumbre proveniente de la curva de calibración, la incertidumbre de la preparación de la disolución stock de ácido ascórbico y la incertidumbre que corresponde a los estándares hechos para los puntos de la curva de calibración.

- a) Incertidumbre por curva de calibración ( $u_{CC}$ ).

La incertidumbre debida a la curva de calibración se basa en el algoritmo matemático de mínimos cuadrados.



La ecuación empleada para determinar la concentración de ácido ascórbico por medio de la curva de calibración corresponde a la ecuación de una línea recta, como se muestra a continuación,

$$i = mC_{CC} - b$$

en donde:

$i$  = intensidad de corriente obtenida por el equipo (mA)

$C_{CC}$  = concentración de ácido ascórbico obtenida mediante la curva de calibración (M)

$m$  = pendiente de la recta de regresión

$b$  = ordenada al origen

La incertidumbre por la curva de calibración se calcula con la siguiente fórmula:

$$u_{CC} = \frac{S_{y/x}}{m} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(X_i - \bar{X})^2}{S_{xx}}}$$

en donde:

$S_{y/x}$  = desviación estándar residual del cálculo de regresión lineal, que se obtiene con la siguiente fórmula:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum(Y_{obt} - Y_{corr})^2}{N - 2}}$$

en donde:

$Y_{obt}$  = es el valor de Y obtenido para los distintos puntos de la curva

$Y_{corr}$  = es el valor de Y resultante de la regresión para los puntos de la curva

$N$  = número de puntos en la curva de calibración

$n$  = número de puntos en la curva de calibración multiplicado por el número de réplicas de cada punto



$X_i$  = concentración determinada de una muestra cualquiera (M)

$p$  = número de repeticiones de la muestra  $X_i$

$\bar{X}$  = valor promedio de la concentración de los puntos de la curva (M)

$S_{xx}$  = suma de cuadrados de las concentraciones de los puntos de la curva de calibración

En la siguiente tabla se presentan los datos necesarios para el cálculo de la incertidumbre:

Concentración (M)	$Y_{obt}$	$Y_{corr}$
0,0004	0,8667	0,9886
0,0008	1,9667	2,1352
0,0012	3,2833	3,2818
0,0016	4,4333	4,4284
0,0020	5,8000	5,5749
0,0024	6,5667	6,7215

Sustituyendo se tiene que:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{0,1179}{6-2}} = \mathbf{0,1717}$$

$$u_{cc} = \frac{0,1717}{2849,7} \sqrt{\frac{1}{3} + \frac{1}{18} + \frac{5,4760 \times 10^{-6}}{0,3040}} = \mathbf{3,0459 \times 10^{-5} M}$$

Por lo que la incertidumbre relativa de la concentración es:

$$u_{cc \text{ rel}} = \frac{3,0459 \times 10^{-5} M}{2,1400 \times 10^{-3} M} = \mathbf{0,01423}$$

b) Incertidumbre por la preparación de la disolución stock de ácido ascórbico ( $u_{stock}$ ).

El cálculo de la concentración de la disolución stock de ácido ascórbico está dado por la siguiente ecuación.



$$C_{AA \text{ stock}} = \frac{m_{AA}}{\frac{PM_{AA}}{Vol}}$$

Por lo que la incertidumbre relacionada con la preparación de la disolución stock conlleva la incertidumbre de la masa de ácido ascórbico, la incertidumbre del peso molecular de ácido ascórbico y la incertidumbre del aforo; sin embargo, se despreciará la incertidumbre por el peso molecular, ya que se sabe que no es significativa en relación a las otras dos incertidumbres.

- Incertidumbre de la masa de ácido ascórbico.

Esta incertidumbre corresponde a la incertidumbre combinada de la incertidumbre de la pureza del reactivo y de la incertidumbre de la balanza.

$$u_{\text{pureza}} = \frac{100 - \% \text{ pureza}}{\sqrt{12}} = \frac{100 - 100}{\sqrt{12}} = 0$$

$$u_{\text{balanza}} = \frac{U_{\text{exp}}}{2} = \frac{0,00012 \text{ g}}{2} = 0,00006 \text{ g}$$

$$u_{\text{masa}} = 6 \times 10^{-5} \text{ g}$$

- Incertidumbre del volumen de aforo.

La incertidumbre del aforo está dada por la incertidumbre por tolerancia y por la incertidumbre por temperatura.

$$u_{\text{tolerancia}} = \frac{\pm \text{tol}}{\sqrt{6}} = \frac{\pm 0,02}{\sqrt{6}} = 8,1650 \times 10^{-3} \text{ mL}$$

$$u_{\text{temp}} = \frac{V(T - T_{20})C}{\sqrt{3}} = \frac{10 \text{ mL}(23 - 20)^{\circ}\text{C} (2,1 \times 10^{-4} \text{ }^{\circ}\text{C}^{-1})}{\sqrt{3}} = 3,6373 \times 10^{-3} \text{ mL}$$

$$u_{\text{aforo}} = \sqrt{(u_{\text{tol}})^2 + (u_{\text{temp}})^2} = \sqrt{(8,1650 \times 10^{-3})^2 + (3,6373 \times 10^{-3})^2} = 8,9385 \times 10^{-3}$$

- Incertidumbre de la concentración stock de ácido ascórbico.



$$u_{\text{rel stock}} = \sqrt{(u_{\text{rel masa}})^2 + (u_{\text{rel aforo}})^2} = \sqrt{\left(\frac{6 \times 10^{-5}}{0,1762}\right)^2 + \left(\frac{8,9385 \times 10^{-3}}{10}\right)^2} = \mathbf{9,5652 \times 10^{-4}}$$

c) Incertidumbre de los estándares ( $u_{\text{est}}$ )

El siguiente modelo matemático describe el cálculo para determinar la concentración de los estándares.

$$C_{\text{est}} = C_{\text{stock}} \left( \frac{\text{Vol}_{\text{alícuota}}}{\text{Vol}_{\text{aforo}}} \right)$$

Por lo que la incertidumbre por los estándares está conformada por la incertidumbre de la concentración de la disolución stock, de la alícuota y del aforo.

- Incertidumbre de la alícuota.

La incertidumbre de la alícuota depende de la incertidumbre por tolerancia, de la incertidumbre por la temperatura y la incertidumbre por dosificación. Se ha demostrado que la incertidumbre para cada concentración estándar es prácticamente la misma, por lo que se puede tomar la incertidumbre de una sola concentración como representativa para las demás.

$$u_{\text{tolerancia}} = \frac{\pm 0,003}{\sqrt{6}} = \mathbf{1,2247 \times 10^{-3} \text{ mL}}$$

$$u_{\text{temp}} = \frac{0,100 \text{ mL}(23 - 20)^{\circ\text{C}}(2,1 \times 10^{-4} \text{ }^{\circ\text{C}}^{-1})}{\sqrt{3}} = \mathbf{4,1569 \times 10^{-5} \text{ mL}}$$

$$u_{\text{dosificación}} = S_{\text{dosificación}} = \mathbf{0,005700 \text{ mL}}$$

$$u_{\text{ali}} = \sqrt{(u_{\text{tol}})^2 + (u_{\text{temp}})^2 + (u_{\text{dosi}})^2} = \sqrt{(1,2247 \times 10^{-3})^2 + (4,1569 \times 10^{-5})^2 + (0,005700)^2} \\ = \mathbf{5,8302 \times 10^{-3}}$$



- Incertidumbre del aforo.

$$u_{\text{tolerancia}} = \frac{\pm 0,03}{\sqrt{6}} = \mathbf{0,01225 \text{ mL}}$$

$$u_{\text{temp}} = \frac{25 \text{ mL}(23 - 20)^{\circ}\text{C} (2,1 \times 10^{-4} \text{ }^{\circ}\text{C}^{-1})}{\sqrt{3}} = \mathbf{9,0933 \times 10^{-3} \text{ mL}}$$

$$u_{\text{aforo}} = \sqrt{(0,01225)^2 + (9,0933 \times 10^{-3})^2} = \mathbf{0,01526 \text{ mL}}$$

- Incertidumbre de la concentración del estándar.

$$\begin{aligned} u_{\text{rel est}} &= \sqrt{(u_{\text{rel stock}})^2 + (u_{\text{rel ali}})^2 + (u_{\text{rel aforo}})^2} \\ &= \sqrt{(9,5652 \times 10^{-4})^2 + \left(\frac{5,8302 \times 10^{-3}}{0,100}\right)^2 + \left(\frac{0,01526}{25}\right)^2} = \mathbf{0,05831} \end{aligned}$$

- d) Incertidumbre de la concentración obtenida por la curva de calibración.

Teniendo la incertidumbre de la curva de calibración, de la disolución stock y del estándar se calcula la incertidumbre combinada correspondiente a la concentración obtenida por la curva de calibración.

$$\begin{aligned} u_{\text{CCc}} &= \sqrt{(u_{\text{CC}})^2 + (u_{\text{stock}})^2 + (u_{\text{est}})^2} \\ &= \sqrt{(3,0459 \times 10^{-5})^2 + (9,5652 \times 10^{-5})^2 + (2,3324 \times 10^{-5})^2} = \mathbf{1,0306 \times 10^{-4} \text{ M}} \end{aligned}$$

- Incertidumbre del volumen de aforo de la muestra analizada ( $u_{\text{vol}}$ ).

La incertidumbre del volumen de la muestra analizada se compone de la incertidumbre por la tolerancia y de la incertidumbre por la temperatura.

$$u_{\text{tolerancia}} = \frac{\pm 0,03}{\sqrt{6}} = \mathbf{0,01225 \text{ mL}}$$

$$u_{\text{temp}} = \frac{25 \text{ mL}(23 - 20)^{\circ}\text{C} (2,1 \times 10^{-4} \text{ }^{\circ}\text{C}^{-1})}{\sqrt{3}} = \mathbf{9,0933 \times 10^{-3} \text{ mL}}$$

$$u_{\text{Vol}} = \sqrt{(0,01225)^2 + (9,0933 \times 10^{-3})^2} = \mathbf{0,01526 \text{ mL}}$$



- Incertidumbre del peso molecular del ácido ascórbico.

La incertidumbre del peso molecular de cualquier sustancia generalmente es pequeña en comparación con las otras fuentes de incertidumbre, por lo que se puede despreciar. En este caso se despreciará esta incertidumbre.

- Incertidumbre de la masa de la muestra analizada ( $u_{\text{muestra}}$ ).

La incertidumbre de la masa de la muestra sólo proviene de la incertidumbre por la balanza.

$$u_{\text{balanza}} = \frac{0,00012 \text{ g}}{2} = \mathbf{0,00006 \text{ g}}$$

$$u_{\text{muestra}} = \mathbf{6 \times 10^{-5} \text{ g}}$$

- Incertidumbre combinada relativa para la concentración de ácido ascórbico ( $u_{\text{CAA}}$ ).

$$u_{\text{CAA}} = \sqrt{(u_{\text{rel Ccc}})^2 + (u_{\text{rel Vol}})^2 + (u_{\text{rel muestra}})^2}$$
$$u_{\text{CAA}} = \sqrt{(0,04816)^2 + (6,1040 \times 10^{-4})^2 + (1,2 \times 10^{-5})^2} = 0,04816 (100) = \mathbf{4,816 \%}$$

Lo anterior significa que para la concentración determinada de ácido ascórbico ( $2,1400 \times 10^{-3} \text{ M}$ ) se tendrá una incertidumbre del 4,816 % sobre este valor.