



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA
DETERMINACIÓN DE CO₂ EN MUESTRAS DE
LABORATORIO Y BEBIDAS CARBONATADAS POR
POTENCIOMETRÍA USANDO UNA SONDA SENSIBLE A
GASES.

Tesis

Que para obtener el título de:

Químico

Presenta:

Adrián Ricardo Hipólito Nájera

Asesores:

**Dra. María del Rosario
Moya Hernández**

**Dr. Rodolfo Gómez
Balderas**

Cuautitlán Izcalli,

Edo. de Méx.

2013



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.

Validación de un método analítico para la determinación de CO₂

Adrián Ricardo Hipólito Nájera



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE



ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el Art. 28 del Reglamento de Exámenes Profesionales nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: TESIS

“Validación de un método analítico para la determinación de CO₂ en muestras de laboratorio y bebidas carbonatadas por potenciometría usando una sonda sensible a gases”

Que presenta el pasante: Adrián Ricardo Hipólito Nájera
Con número de cuenta: 30409096-7 para obtener el Título de: Químico

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU”
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 22 de noviembre de 2012.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	QFB. Delia Reyes Jaramillo	
VOCAL	Dra. María Gabriela Vargas Martínez	
SECRETARIO	Dra. María del Rosario Moya Hernández	
1er SUPLENTE	Q. Pablo Hernández Matamoros	
2do SUPLENTE	Q. Lidia Elena Ballesteros Hernández	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 120).
HHA/pm

AGRADECIMIENTOS.

Para llegar hasta este punto en mi vida, ocurrieron muchas cosas y circunstancias que me han convertido en la persona que ahora soy; algunas fueron buenas y otras malas, y sin querer se han quedado en mi memoria por lo que he aprendido de ellas.

En algunas de estas experiencias me he encontrado rodeado de personas que de alguna u otra manera me han dejado compartirlas con ellas; por esto, quiero agradecerles a aquellas personas que tienen un lugar especial y que sin ellas no habría podido siquiera llegar a esta nueva etapa.

En primer lugar agradezco infinitamente el apoyo de mi madre; María del Carmen Nájera Baños, pues con todo su apoyo, esfuerzo, entrega y amor, me ha permitido seguir con mis estudios. Al principio de la carrera me preguntaste, mamá, que si le iba a echar ganas y yo te conteste que sí, pero que yo lo tomé como una promesa y ahora quiero que sepas que cada día que asistía a la universidad era porque no quería decepcionarte pues todas las energías surgían de esta promesa. Te agradezco mamá por guiarme siempre por un buen camino y me quedo con todas tus enseñanzas que siempre intento reflejar; tú sabes bien que este logro está dedicado completamente para ti, ¡lo logramos! TE AMO. Siempre serás mi ejemplo.

También agradezco a parte de mi familia que hemos compartíamos el día a día, y que siempre nos hemos apoyado mutuamente y hablo de mi abuela Alica Baños Ortiz, pues su coraje, entrega y amor me demostró todo lo que se puede lograr, también de mis primos Gilberto Zinain Chayres Nájera y de Irene Nantzin Chaires Nájera, pues sé que en cualquier momento pudo confiar en ustedes y que al igual que conmigo tengo su apoyo

Agradezco también enormemente a mis amigas y amigos que fueron parte de toda esta etapa y que compartimos muchas experiencias escolares y de vida, agradezco a Martha Elena García Aguilera, Leslie Velázquez López, Cecilia Yañez Puga, Jorge Núñez Villanueva, Andrea Julieta Troncoso Morales, Fernando Cruz Legaspi, Rogelio Sotelo Valencia, David Cruz, Dulce Carolina García de Acevedo; a los compañeros del laboratorio 10 de la UIM y todos aquellos que me permitieron ser parte de su equipo en prácticas de laboratorio y con los que estuve compartiendo proyectos a lo largo de 4 años y medio, ustedes saben quiénes son.

Agradezco a todas aquellas personas que me formaron y que comparto gracias a todos ustedes el cariño por la química y hacerme ver lo maravilloso de ella, hablo sin duda de mis profesores, que de los cuales me siento orgulloso de haber sido su estudiante, principalmente agradezco a mis asesores de tesis; Dra. María del Rosario Moya Hernández y Dr. Rodolfo Gómez Balderas por su enorme apoyo, confianza, paciencia y orientación, al igual que agradezco a M. en C. Juan Carlos Rueda Jackson y Dra. María Guadalupe Pérez

Adrián Ricardo Hipólito Nájera

Caballero, Dr. Alberto Rojas Hernández por su ayuda y asesoramiento para el desarrollo de este trabajo.

Un profundo agradecimiento a la Universidad Nacional Autónoma de México por la formación que me ha brindado y por el esfuerzo que realiza día con día para que los alumnos tengan las mejores condiciones para su desarrollo profesional, es un orgullo ser estudiante de esta casa de estudios.

Por mi raza hablará el espíritu.

ÍNDICE.

RESUMEN	8
Capítulo 1: OBJETIVOS	10
OBJETIVOS PARTICULARES	11
Capítulo 2: ANTECEDENTES	12
2.1 HISTORIA DE LOS ELECTRODOS SELECTIVOS DE IONES	13
2.2 FUNCIONAMIENTO Y PRINCIPIOS FÍSICOQUÍMICOS DE LOS ISEs	26
2.2.1 El electrodo de vidrio para medidas de pH	26
2.2.2 Electrodo de Vidrio para Medir Otros Iones que no son el Ion Hidrógeno	29
2.2.3 Sensores o sondas sensibles de gases	30
2.2.4 Electrodo de Estado Sólido	32
2.2.5 Electrodo policristalino o de precipitados de estado sólido	32
2.2.6 Electrodo de estado sólido de un solo cristal	33
2.2.7 Electrodo de Membrana de Intercambio de Iones Líquido	34
2.2.8 Electrodo Basado en Enzimas	36
2.2.9 Interfaces Iónicas, Bloqueadas y Electrónicas	38
2.3 IMPORTANCIA DE CUANTIFICAR GASES POTENCIOMÉTRICAMENTE	39
2.3.1 Algunas Aplicaciones para el Sensor o Sonda Selectiva a CO₂	40
2.4 EL CO₂ EN EL AGUA Y EL AIRE	43
2.5 EL CO₂ Y SU USO EN BEBIDAS	48
2.6 DETERMINACIÓN DE CO₂ POR OTROS MÉTODOS	51
2.6.1 Determinación Directa En soluciones Acuosa Usando Láseres de Cascada Cuántica (QCL) que Emiten en el Infrarojo Medio (MIR)	51
2.6.2 Determinación de CO₂ en Diferentes Muestras de Gas Mediante el Uso del Aparato de Orsat	52
2.6.3 Medición del Flujo de CO₂ en Suelo	53
2.7 VALIDACIÓN DE MÉTODOS	54
2.7.1 ¿Por qué es necesaria la validación del método?	58
2.7.2 Parámetros de Desempeño	59

2.8 CURVA DE ADICIONES PATRÓN EN UNA SONDA SELECTIVA A GASES.	64
Capítulo 3: MATERIALES, REACTIVOS QUÍMICOS Y METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	67
3.1 MATERIALES	68
3.2 REACTIVOS QUÍMICOS	69
3.4 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	72
3.4.1 Validación del Método	72
3.3.2 Aplicación Del Método Validado (Curva De Calibración)	85
3.3.3 Método De Adiciones Patrón	88
Capítulo 4: RESULTADOS EXPERIMENTALES Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	90
4.1 VALIDACIÓN DEL MÉTODO	91
4.2 RESULTADOS PARA LA DETERMINACIÓN DE CO₂ USANDO EL MÉTODO VALIDADO (CURVA DE CALIBRACIÓN)	109
4.3 RESULTADOS EXPERIMENTALES Y ANÁLISIS DE RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE CO₂ UTILIZANDO EL MÉTODO DE ADICIONES PATRÓN	113
Capítulo 5: CONCLUSIONES	141
BIBLIOGRAFÍA	143
Anexos	152
ANEXO 1. Validación	153
ANEXO 2 Cuantificación por el método validado (Curva de Calibración)	159
ANEXO 3 Cuantificación por el método de adiciones patrón	160

RESUMEN

Una de las técnicas muy utilizada por los Químicos Analíticos para la determinación de una especie en solución acuosa es la potenciometría que hace uso de instrumentos llamados Electrodo Selectivo a Iones (ISE's) que debido a su simplicidad, bajo costo, precisión, aplicabilidad a las condiciones extremas o inusuales, y la puntualidad, fueron y siguen siendo reconocidos como herramientas útiles de análisis.

El presente trabajo muestra el desarrollo de la validación de un método para la determinación y cuantificación de CO₂ por curva de calibración, la aplicación de este método en muestras de diferentes marcas comerciales de bebidas carbonatada (refrescos) y el desarrollo de un método para cuantificación de CO₂ por curva de adiciones patrón a volumen constante, todo esto utilizando un ISE selectivo a CO₂ ó mejor llamado Sonda Sensible a Gases.

Para la validación de este método se utilizaron los parámetros: Linealidad, Límite de Detección, Límite de Cuantificación, Sensibilidad, Precisión, Exactitud, Robustez, Especificidad, de los cuales cada parámetro mostró valores adecuados a los criterios de aceptación establecidos en diversas guías de validación. Con la metodología validada se logró determinar la concentración de CO₂ de las muestras comerciales de refresco.

El método desarrollado para la cuantificación de CO₂ por adiciones patrón a volumen constante, mostró ser adecuado para la determinación de la concentración de CO₂ por la baja incertidumbre que este presenta a las concentraciones de trabajo a diferencia de otros métodos *clásicos* de adiciones patrón.

Este trabajo no tiene como fin ser una guía de validación para sondas selectivas a gases o para ISE's, pero sí que sea una ayuda para estudiantes de licenciatura en áreas afines a la química como una introducción hacia la validación de métodos dejando en claro que los métodos se validan según el propósito que se requieren. Además los procedimientos aquí mostrados pueden ajustarse como prácticas de laboratorio a nivel licenciatura en las áreas de química analítica o fisicoquímica por la sencillez y rapidez de su desarrollo.

Capítulo 1: OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL.

- Desarrollar, implementar y validar una metodología para el uso de una sonda selectiva de dióxido de carbono y su aplicación en la cuantificación de esta especie en muestras reales.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- Validar mediante parámetros establecidos generales mínimos necesarios un método para la determinación de CO₂ con una sonda sensible a este gas.
- Aplicar el método validado en la determinación y cuantificación de esta especie en muestras de laboratorio o muestras comerciales (Ej. Bebidas carbonatadas).
- Desarrollo de un método de adiciones patrón para la cuantificación de CO₂ en muestras con matrices complejas.

Capítulo 2:

ANTECEDENTES

2.1 HISTORIA DE LOS ELECTRODOS SELECTIVOS DE IONES.

Los métodos electroanalíticos han tenido una larga historia de desarrollo. Hoy, los estudios de transferencia energética y cinética de iones individuales en las interfaces—cristalina iónica insoluble, de sitios móviles o fijos de polímero plastificado, y de electrolitos inmiscibles líquido-líquido—están a la vanguardia de las investigaciones físicas y electroanalítica químicas (Buck, 2001).

La potenciometría es una técnica bien conocida por los químicos, surgió a finales del siglo XIX. Una pequeña parte del área de los métodos electroanalíticos son los electrodos selectivos a iones (*ISEs*) y los transductores de efecto de campo selectivos a iones (*ISFETs*) (Bastos, 2001). Las membranas de procesos iónicos faradaicos también se han prestado para el desarrollo de electrodos de iones selectivos (*ISEs*, por sus siglas en inglés; *ion-selective electrodes*).

A continuación se describen algunos descubrimientos, eventos y personas que hicieron posible, desde la investigación de las celdas de membranas separadas hasta el desarrollo de los *ISEs*.

Durante el periodo de 1900 a 1930, cuatro aspectos de la electroquímica surgieron, crecieron y maduraron. Primero el desarrollo y exploración de electrodos (medias celdas) de cero [zeroeth] (*metal inerte|par redox*), primero ($M|M^+$), segundo ($M|MX|X$) y tercer orden ($M|MX|NX|N^+$). (M es metal, M^+ y N^+ son cationes, X representa aniones, MX y NX son sales apenas solubles de los respectivos cationes y aniones). Segundo, el usar estas celdas sin electrolitos de unión para calcular sus propiedades termodinámicas, capturaron el interés de los científicos. Desde Berlín hasta Berkeley, las escuelas de los fisicoquímicos Walter Nernst (dando las bases de la potenciometría [Nernst, 1888]), Gilbert N. Lewis, y Wendell Latimer fueron enfocadas en la termodinámica electroquímica de celdas reversibles (Buck, 2001). El tercer aspecto fue perturbaciones de celdas con corrientes pequeñas. Estudios de transporte fueron formulados usando corriente alterna *CA* o corriente directa *CD* a través de regiones de electrolito uniforme, los cuales fueron bien aislados de los electrodos de trabajo, y se lograron determinar los números de transferencia.

En estas tres áreas de investigación, los científicos de la universidad de Yale: Lars Onsager, John Kirkwood, Raymon Fuoss, Herbert Harned, and Benton Owen y los australianos Robert A. Robinson y Robert H. Stokes (Buck, 2001) hicieron las contribuciones más importantes y transmitieron muchos conceptos para la posteridad. Reacciones de celdas en red siempre involucraban reacciones con sólo especies neutras. Reacciones redox de media celda fueron construidas. Las diferencias de potencial (*ddp*) de media celda o electrodos individuales no son medidas y por lo tanto requieren un valor de referencia (*cero*) asignado a una media celda. El coeficiente medio de actividad puede ser medido para sales, pero el coeficiente de actividad individual no puede ser medido para iones. Los números de transferencia son funciones de los coeficientes de difusión (o movibilidades) y las concentraciones. (Aunque los números de transferencia no son generalmente útiles para fenómenos sin equilibrio, pueden ser usados para cálculos de *ddp* de uniones simples.) La *relevancia* termodinámica de las mediciones es el criterio importante; sin embargo, métodos físicos y otros métodos experimentales no termodinámicos o construcciones teóricas (por ejemplo, la teoría de Debye Hückel y otras mejoras modernas) no se descartan.

La cuarta y más importante lección electroquímica aprendida fue la conexión entre la carga espacial, la *ddp* del electrodo y la capacitancia de límite de la fase entre conductores sólidos y la solución de electrolitos. Todos sabían que dos hojas de metal paralelas forman un capacitor pero la prueba de que los metales en electrolitos también tienen esta propiedad viene por el estudio del cambio de la tensión superficial de metales líquidos sobre la carga (Parsons, 1954).

Mientras la transferencia cinética de electrones de interface avanzó, la investigación de celdas de membranas pasivas (no biológicas) sufrió. Sin embargo, la *edad oscura* (1900-1910), también tuvo sus momentos. El primer sensor potenciométrico usado para medir la acidez de una solución acuosa fue el electrodo de Hidrógeno, propuesto por Nernst en 1897 (Nernst, 1897). El descubrimiento de la respuesta del pH de las membranas delgadas de vidrio en 1906, por Cremer; fue una *magia* de referencia. Además, Haber y Klemensiewicz (este último haciendo la mayor parte del trabajo) (Ruzicka, 1997) mejoraron el electrodo de vidrio hasta el punto donde se volvió de interés práctico, además anunciaron más tarde el

desarrollo en membranas de electrodos con intercambiadores de iones heterogéneos de estado sólido y líquido. Este desarrollo no era suficiente por sí solo, pues no resolvía la medición exacta de acidez de las soluciones por lo que, dos ingredientes adicionales esenciales se desarrollaron: la definición de las unidades a medir y la disponibilidad de instrumentos que debían proveer lecturas reproducibles. Así, Sorensen, trabajando para la cervecería de Carlsberg en Copenhagen, propuso la escala de pH porque él necesitaba definir la influencia de la acidez en numerosas reacciones enzimáticas (Astrup, 1986) y en el año de 1935 Beckman diseñó y comercializó el primer pH-metro en U.S.A. Curiosamente, la fabricación de instrumentos era ya una carrera muy reñida en esos primeros días, Radiometer en Dinamarca introdujo su propio pH-metro electrónico casi al mismo tiempo (*Radiometer Annual Report 1994/1995*; Copenhagen). Uno sólo puede especular que ambas compañías fueron inspiradas por el trabajo de Elder y Wright, publicado 5 años antes (Elder, 1928).

En los años de 1935 a 1980 se llevó a cabo el descubrimiento de las membranas sensor. Una membrana de intercambio de iones con un sitio fijo contiene unido covalentemente grupos funcionalizados. Muchas de estas membranas fueron desarrolladas en 1930, siguiendo el descubrimiento del primer poliestireno sulfonado.

El trabajo pionero de Tendeloo (Tendeloo, 1936), de Izaak Kolthoff y H. L. Sanders (estos 2 últimos fabricaron los primeros electrodos de disco de haluro de plata en 1937 [Kolthoff, I.M; Sanders, H. L.,1937]) e inclusive intentos posteriores de Pungor (Pungor, 1961) para producir electrodos selectivos de haluros son a menudo citados como ejemplos de primeros intentos para hacer a los *ISEs* trabajar. Aún en este contexto es justo resaltar que los cables de plata cubiertos de AgCl, AgBr, AgI o Ag₂S han sido utilizados rutinariamente como electrodos tanto indicadores como de referencia desde principios de los 30's. También, los alambres de plata cubiertos con compuestos orgánicos que contienen azufre fueron al mismo tiempo utilizados como electrodos indicadores en valoraciones potenciométricas (Cihalik, 1957) y para las mediciones de potencial directo para estimar los productos de solubilidad (Cihalik, 1959). Eisenman demostró la unión entre el (molesto) error del sodio al electrodo de pH y el rol central del mecanismo del intercambio iónico, centrándose de este modo en el mecanismo del proceso de transferencia de carga entre la superficie de la

membrana (Eisenman, 1957; Eisenman, 1962). Este trabajo abrió el campo a una investigación racional para nuevos materiales de electrodos, y su importancia puede ser apreciada contra el respaldo de varios intentos fallidos previos para crear dispositivos que deseaban medir especies iónicas selectivamente.

En resumen, la fórmula para la introducción exitosa de la tecnología *ISE* fue el trabajo realizado en 1930: (i) la cooperación entre academia e industria con el objetivo de crear tecnología nueva y (ii) la integración de conceptos de química de soluciones (buffers de pH), electroquímica (el electrodo), y electrónicos (el medidor). De esta manera la potenciometría se convirtió en un *campo maduro* enfocado en medir pH, al tiempo que fue ampliamente practicada y muy útil en el campo de las valoraciones potenciométricas (Ruzicka, 1997). Debido a su simplicidad, bajo costo, una mayor precisión, aplicabilidad a las condiciones extremas o inusuales, y la puntualidad, los *ISE* fueron reconocidos como nuevas herramientas de análisis.

Las epidemias de polio en USA y Europa a principios de los 50s enfocó la atención en la necesidad, en primer lugar para medir la presión parcial de gases fisiológicos, oxígeno y dióxido de carbono, en varias muestras de sangre de pacientes enfermos, en segundo lugar para desarrollar aparatos para la ventilación artificial de algunos pacientes.

La historia del desarrollo de estos sensores es, sin embargo, muy intermitente y, curiosamente, su diseño y principios de trabajo han cambiado muy poco durante las últimas décadas desde que Stow introdujo el primer electrodo de dióxido de carbono (desarrollado en 1953) a un público incrédulo en una conferencia de Agosto de 1954 (Stow, 1954; Stow, 1957). Al poco tiempo, este sensor potenciométrico cubierto de membrana fue mejorado dramáticamente por Severinghaus y Bradley (Severinghaus, 1958), quien desarrollo el sensor de $p\text{CO}_2$ el cual es ahora usado rutinariamente en estudios biomédicos y dentro de la instrumentación clínica de gas sanguíneo. Casi simultáneamente, Clark desarrolla el electrodo de oxígeno (Clark, 1956) completamente independiente del sensor de Stow, pero fue desprovisto de derechos de patente porque su sensor fue juzgado como un derivado de la idea de Stow. De igual manera los sensores para SO₂, NO₂ y NH₃, también se han desarrollado.

Los *ISE* de calcio y flúor (*Ca-ISE* y *F-ISE*, respectivamente) que se desarrollaron a mediados de 1960, por James Ross y Martin Frant de Investigaciones Orión (Frant, 1994), fueron el *big bang*, que inició una nueva era en el análisis potenciométrico. Acordando con Frant, Ross se dirigió a los intercambiadores de iones líquidos para aumentar la movilidad del contraión en la fase de la membrana (Frant, 1997). Tomó la sal cálcica del ácido fosfórico 2-etilhexil como el intercambiador de iones y fosfonato fenil dioctilo como disolvente, porque el fosfato y polifosfato forman complejos estables con el calcio, pero no con el sodio y el potasio. Ya que se supone que la conducción iónica es necesaria, ellos no esperaban que el electrodo basado en cristales únicos de LaF₃ operara en su estudio de las sales de flúor de baja solubilidad. Sin embargo, se realizó casi a la perfección. Más tarde, utilizaron cristales dopados con Eu²⁺ para disminuir la resistencia total (Buck, 2001). Desarrollándose un nuevo concepto de electrodos de membrana líquida y de alguna variedad de sensores de gas; que atrajo, inmediatamente, la atención y el interés de la comunidad electroanalítica tanto en la industria como en la academia; que se habían enfocado previamente a la polarografía y la voltamperometría, campos de madurez considerable (Ruzicka, 1997). De hecho, en las siguientes décadas, los centros de investigación electroquímica tales como escuelas fundadas por Heyrovsky (Checoslovaquia), Shikata (Japón), Kemula (Polonia) y Pungor (Hungría) dieron una considerable salida en el tema de los *ISE*, en un gran número de artículos y reuniones que comprendían teoría y práctica (Ruzicka, 1997). El interés en la industria fue impulsada por las aplicaciones: La fluoración del agua potable creó la necesidad para un ensayo para fluoruro rápido y seguro, el cual antes de la llegada del *F-ISE* envolvía una tediosa destilación seguida de colorimetría poco fiable. Orion enseñó a muchos científicos acerca de los *ISEs*, ayudando a establecer la importancia del nuevo método analítico. El campo de química clínica, específicamente en medidas de gas y electrolitos sanguíneo, se encontraba en extrema necesidad de medir—además de pH y oxígeno— potasio, sodio, calcio, dióxido de carbono, y con suerte magnesio e inclusive potasio. Con la excepción de las últimas especies, estas necesidades se cubrieron por la tecnología *ISE*, creando un mercado con ventas de cerca de 5000 analizadores clínicos por año (*Radiometer Annual Report 1994/1995*; Copenhagen.).

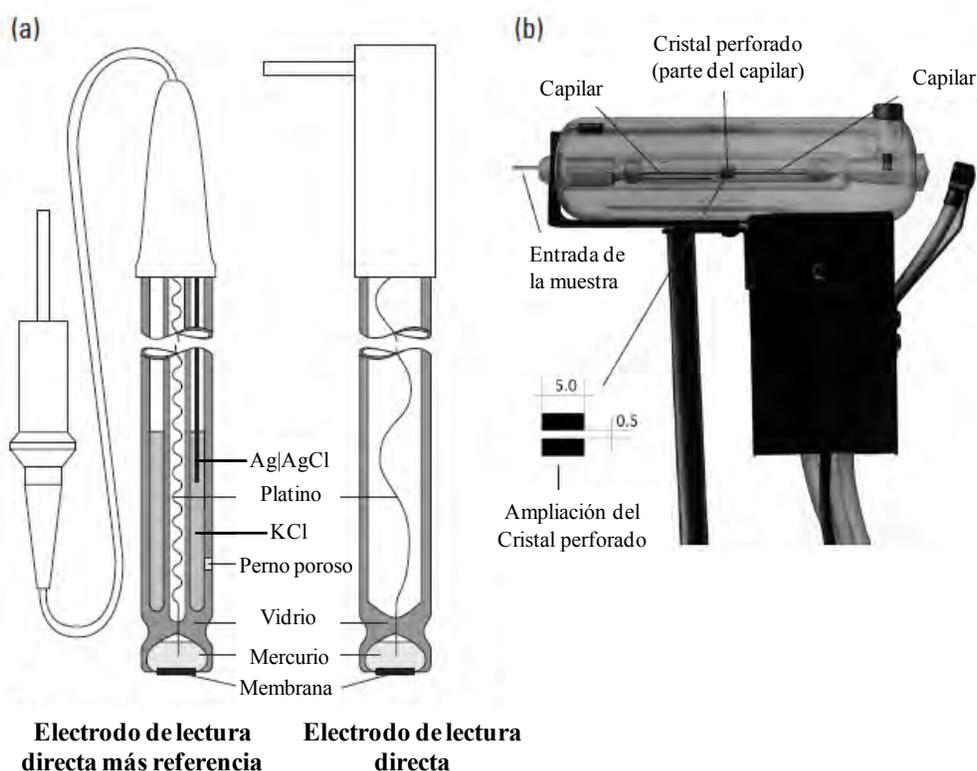


Fig. 2.1. Historia de las primeras membranas. (a) Sección transversal de un primer electrodo de membrana de silicón a base de caucho. Note que el contacto interno fue fabricado con mercurio. (b) El primer sensor de estado sólido perforado a base de cristal de flujo continuo, producido en 1971 por Radelkis Electrochemical Instruments en Hungría. Se perforó un agujero de 0.5-mm con un espesor de 5-mm dentro de una membrana de píldora prensada de AgCl o AgBr y conectada a un canal de muestreo de flujo continuo.

Esta combinación intelectual y reto económico previó un ímpetu que creo, un excitante y vigoroso campo de investigación en el cual la mayoría de los avances fueron logrados durante los 60's, un ejemplo es el de Ernő Pungor que publicó su primer artículo en electrodos basados en AgI y presentó una patente sobre membranas selectivas heterogéneas con sus compañeros de trabajo Klára Tóth, Jenő Havas y Géza Madarász, que fueron la base para los primeros *ISEs* comerciales de estado sólido (Buck, 2001) (**Fig. 2.1**).

Pungor llegó a comprender la carga espacial en los precipitados de haluros de plata por el estudio del mecanismo de los indicadores de adsorción. Él, primero usó membranas de

parafina, haciendo hincapié en los procesos de intercambio de iones del límite de la fase que se originó a partir de la teoría Nikolskii de las membranas de vidrio. El mayor logro del grupo de investigación de Pungor fue la producción de diversos electrodos fiables en un corto período de tiempo en el entorno de falta de apoyo de una economía comunista.

En los 70's, los *ISEs* florecieron aún más cuando un mayor número de artículos fueron publicados, numerosas reuniones nacionales e internacionales se celebraron e importantes monografías se escribieron por los trabajadores destacados de este campo (Durst, 1969; Moody, 1971; Cammann, 1977; Freiser, 1978). En la industria, una feroz competición entre compañías líderes (Corning, Beckman, Radiometer, Philips, Metroohm, Radelkis) tomó forma, resultando en numerosas patentes y ocasionales demandas, de las cuales una relativa al electrodo de potasio fue bastante desafortunada (Ruzicka, 1997). Al final la compañía Orion fue líder en este campo.

También durante esta década, al menos 2 desarrollos muy importantes tomaron lugar. El primero, en Inglaterra, que fue el procedimiento más importante para componer, fundir, secar y montar sensores de membranas de poli (cloruro de vinilo) o PVC (del inglés *poly [vinyl chloride]*) desarrollado por J. D. Ron Thomas y Gwylm J. Moody en 1970 (Moody, 1970). Aunque la idea de incorporar todos los ingredientes de la membrana en una matriz de PVC y de controlar el sitio de la densidad vino de la obra de René Bloch, Adam Shatkay y H. A. Sharoff en 1967 (Buck, 2001).

Estos sobreplastificados *electrodos de membrana de solventes poliméricos* proporcionan una membrana interior casi líquida, pero una membrana seca y sólida al tacto. Antes de este material el único material polimerizable de alguna utilidad era la goma de silicón (Pungor, 1967), la cual nunca cumplió la función esperada. El continuo trabajo de Thomas (Thomas, 1994) permitió el amplio uso de *ISEs* producidos *en casa* tan buenos como los utilizados industrialmente, ya que era utilizados hasta en laboratorios de recursos limitados (Ruzicka, 1997). De esta manera la tecnología y la investigación *ISE* fue ampliamente practicada como un importante aspecto de formación y educación en análisis instrumental. Por estos años H. Freiser propuso el electrodo de alambre recubierto (CWE, por sus siglas en inglés: *Coated Wire Electrode*) que comprende un alambre de Pt recubierto por una capa

de PVC que sirvió como membrana. Este audaz enfoque eliminó la solución y el electrodo de referencia y fue subsecuentemente sujeto a crítica de teóricos y experimentales debido a que los CWEs estaban sujetos a desviarse. Un desarrollo adicional de los CWE, sin embargo, condujo a la introducción de sistemas internos de referencia redox de estado sólido, los cuales hicieron estos dispositivos más fiables (Ruzicka, 1997).

El segundo desarrollo importante tomó lugar en Suiza, donde Guillermo Simón, un eminente químico orgánico en la ETH (Escuela Politécnica Federal, por sus siglas en alemán: *Eidgenössische Technische Hochschule*) de Zürich, descubrió la aptitud de los polipéptidos como materiales electroactivos y exitosamente siguió la investigación en este totalmente nuevo grupo de ligandos electroactivos, los llamados transportadores neutros. El trabajo inicial de Simon con Stefanec (Stefanec, 1966; Stefanec 1967) se enfocó en los materiales de origen natural, nonactinas, que eran conocidas por facilitar el transporte de iones de metales alcali a través de membranas lipídicas, ya que en 1964, Cyril Moore y Berton C. Pressman observaron que los antibióticos neutros macrocíclicos inducían la penetración de iones en las mitocondrias (Buck, 2001). Este trabajo llevó a descubrir el electrodo de valinomicina para potasio, el *ISE* de selectividad sin precedente, ya que; aunque la respuesta fue lenta, el electrodo medía K⁺ en presencia de un exceso de 5,000 veces de Na⁺ al utilizar los extractos de hongos venenosos conteniendo el depsipéptido valinomicina disuelto en una membrana líquida intercambiadora de iones (Buck, 2001).

El perdurable impacto de este trabajo de investigación puede ser juzgado por el hecho de que el K-*ISE* en una matriz de PVC es el *caballo de batalla* de todos los analizadores clínicos comercializados. *The College of American Pathologists Comprehensive Chemistry Survey* en 1980, por ejemplo, mostró que solo el 22% de los laboratorios participantes están realizando potenciometría para medir Na⁺ o K⁺. Para 1991, por otro lado, *The Chemistry Survey* listó el 96% de 6041 laboratorios participantes que usan analizadores *ISE* para Na⁺ y sólo el 4% usa espectrometría de emisión atómica de flama (Bakker, 1997). Se estima que en los Estados Unidos unos 200 millones de los ensayos clínicos de K⁺ se hacen cada año con *ISE* a base de valinomicina (D'Orazio, 1994).

Los estudios sobre las relaciones estructura-selectividad de muchos ionóforos sintéticos, plastificantes y aditivos, permitió fabricar *ISEs* nuevos (Ammann, 1983). En el curso de este trabajo, se descubrió el compuesto más exitoso; ETH1001, (Amman, 1975) convirtiéndose en una base de la alta sensibilidad del Ca-*ISE*, el cual hoy es usado en muchos analizadores clínicos. (Mientras tanto, los instrumentos de Radiometer, los cuales cuentan con la tercer parte del mercado mundial, usa Ca-octilfenilfosfato [Ruzicka, 1973] en sus Ca-*ISEs*). El trabajo intuitivo y sistemático del grupo de investigación de Simon y de otros en el diseño de nuevos ionóforos altamente selectivos hizo de los sensores de membrana líquida basados en ionóforos la clase más exitosa entre los *ISEs* (Bühlmann, 1998).

Recordando que Sorensen sentó las bases para el concepto de pH, fue por lo tanto natural considerar los conceptos de *pM* y de buffers de metal en el contexto del trabajo de Bjerrum y Ringbom—los padres de la química de formación de complejos; haciendo uso de estas definiciones en el trabajo eficiente de los *ISEs* (Ruzicka, 1973; Hansen, 1972). Mientras la analogía con el concepto de pH fue tan obvia, el concepto de buffers de metal no fue aceptado amablemente, por que en los 60's los *ISEs* de iones metálicos (como el cobre, plomo, cadmio) fueron promovidos como alternativas a la medición en absorción atómica y por lo tanto eran a menudo calibrados por dilución de sales solubles de esos metales en agua destilada. Hoy todos los *ISEs* de metales pesados son parte de la historia, mientras el uso de buffer de metal es aceptado como apropiado (Hulanicki, 1980; Hulanicki, 1990). Este, y la pronta penetración de Frant y Ross dentro de la importancia de introducir TISAB (por sus siglas en inglés: *total ionic strength adjustment buffer*) para medidas de fluoruro (Frant, 1968) documenta la importancia primordial de la comprensión entre el mecanismo de la respuesta del sensor y su interacción con la solución que se mide.

La variedad de analitos que se pueden evaluar con dispositivos potenciométricos creció cuando las capas finas, inertes o reactivas fueron colocadas sobre la superficie del sensor.

Mark Meyerhoff tomó una dirección diferente y desarrolló electrodos diferenciales de CO₂, que se utilizan en la mayoría de clínicas analizadores de gases en sangre con electrodos microfabricados (Meyerhoff, 1990).

El grupo de George Guilbault fue el primero para inmovilizar enzimas purificadas, al estabilizar el tampón y los elementos traza en la capa externa de los electrodos potenciométricos (Guilbault, 1969). El analito se difunde en la capa de reacción y provoca la reacción catalizada por la enzima. El producto de reacción se detecta como se difunde en la superficie del sensor base. El grupo de Garry Rechnitz más tarde amplió esta idea a todas las células vivas, que proporcionan la enzima deseada (Rechnitz, 1977).

Hoy en día hay muchas aplicaciones de los *ISE*. De hecho se dice (Frant, 1994) que por 1990 más de 7000 artículos habían sido publicados sobre este tema. También se han usado *ISEs* en solventes no acuosos que fueron revisados por Coetzee (Coetzee, 1990), los cuales fueron importantes por que permitían la calibración de electrodos de vidrio en medios no acuosos.

La investigación sobre *ISEs* resultó en numerosas ramas o caminos, algunos de los cuales tienen un impacto duradero en la ciencia analítica. Por ejemplo, la invención del análisis de inyección de flujo fue iniciada mientras se trataba de estabilizar la velocidad de respuesta del también llamado electrodo *air-gap* para amonio, el cual fue generado por la inyección de cloruro de amonio, dentro de una corriente de hidróxido de sodio. En el proceso de estudiar este gas-*ISE* se dieron cuenta de que la integridad de las inyecciones individuales se conservaban, mientras la velocidad y la reproducibilidad de la medida era tan remarcable que una técnica nueva de manejo de solución pudo ser conceptualizada (Ruzicka, 1975).

Otra rama derivada de la investigación de los *ISEs* fue el desarrollo de *CHEMFETs* (por sus siglas en inglés *Chemical Sensitive Field-Effect Transistors*) (Bergveld, 1970) e *ISFETs* (por sus siglas en inglés; *Ion-Selective Field-Effect Transistors*) (Moss, 1975), tecnologías de microfabricación que han entrado al campo de los sensores de iones. Los electrodos de tres dimensiones han sido dramáticamente reducidos en tamaño a dos dimensiones, arreglos multicapa (**Fig. 2.2**) (Lindler, 2000) la integración de sensores microfabricados, con sistemas de separación, manejo de líquidos, y procesado bioquímico, conducen a sistemas completos de análisis químico sobre la superficie de un dispositivo plano. La microfabricación también ofrece ventajas únicas variadas para aplicaciones *in vivo*. El objetivo final es para aplicarlos en tejido para condiciones agudas y crónicas (Lindler,

2000). Los sensores más pequeños en un sustrato flexible minimizan las respuestas de lesión e inflamación.

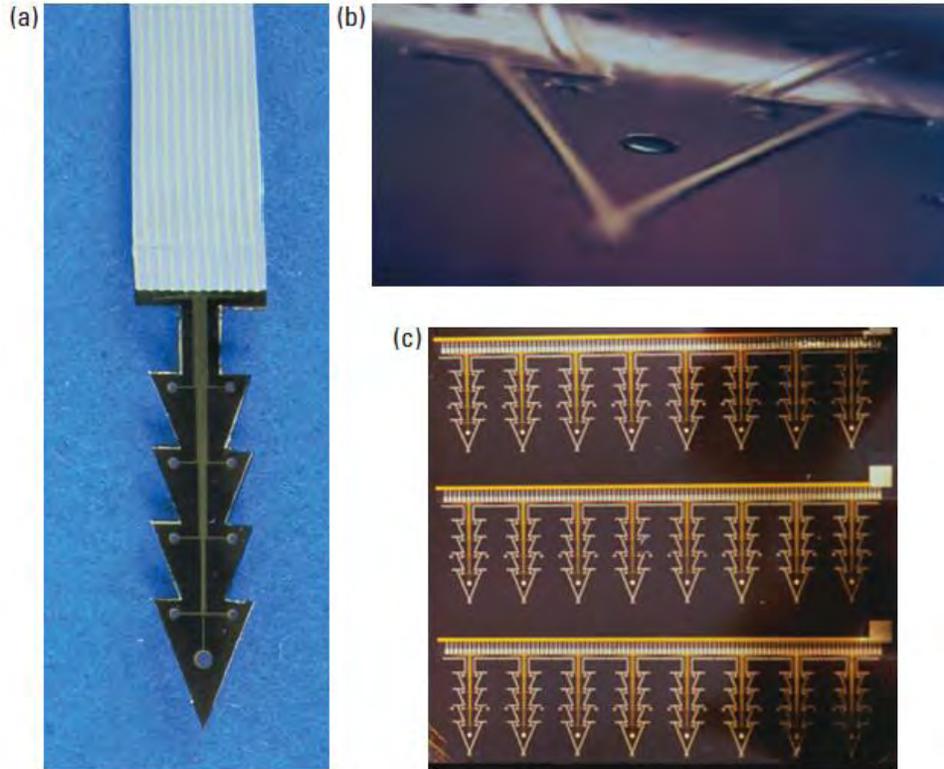


Fig. 2.2. Imágenes microscópicas de redes de sensores microfabricados usados en el monitoreo *in vivo* de actividades iónicas en el corazón palpitante de un cerdo. (a) red de sensor de 12×4 -mm en forma de árbol de navidad con nueve sitios de electrodo y un cable conector termosellado. (b) Vista ampliada de una punta de un sensor a un sitio de $100\text{-}\mu\text{m}$. (c) Redes de sensor de árbol de navidad de 3×8 en una placa de 3×3 pulgadas.

Los argumentos acerca de los principios básicos no han desaparecido completamente. Sin embargo, como se ha señalado, los principios unificadores son aquellas celdas de membranas separadas basadas en termodinámica y electrostática. Juntos con las oportunidades para los avances en química estructural y síntesis de reconocimiento de especies, especialmente en superficies, el campo debería permanecer atractivo y activo por muchos años más.

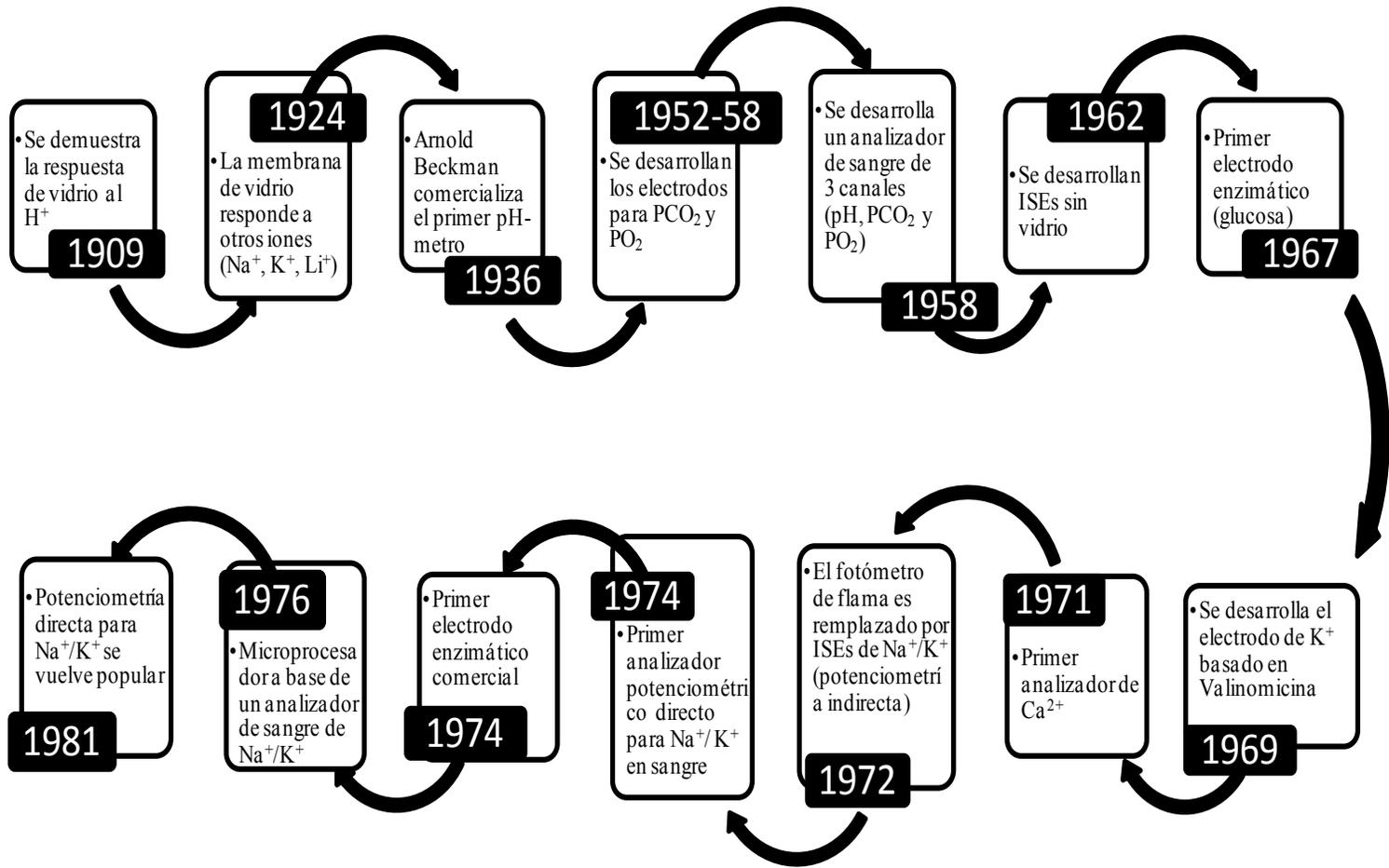


Fig. 2.3. ISEs en química clínica y su desarrollo en la historia.

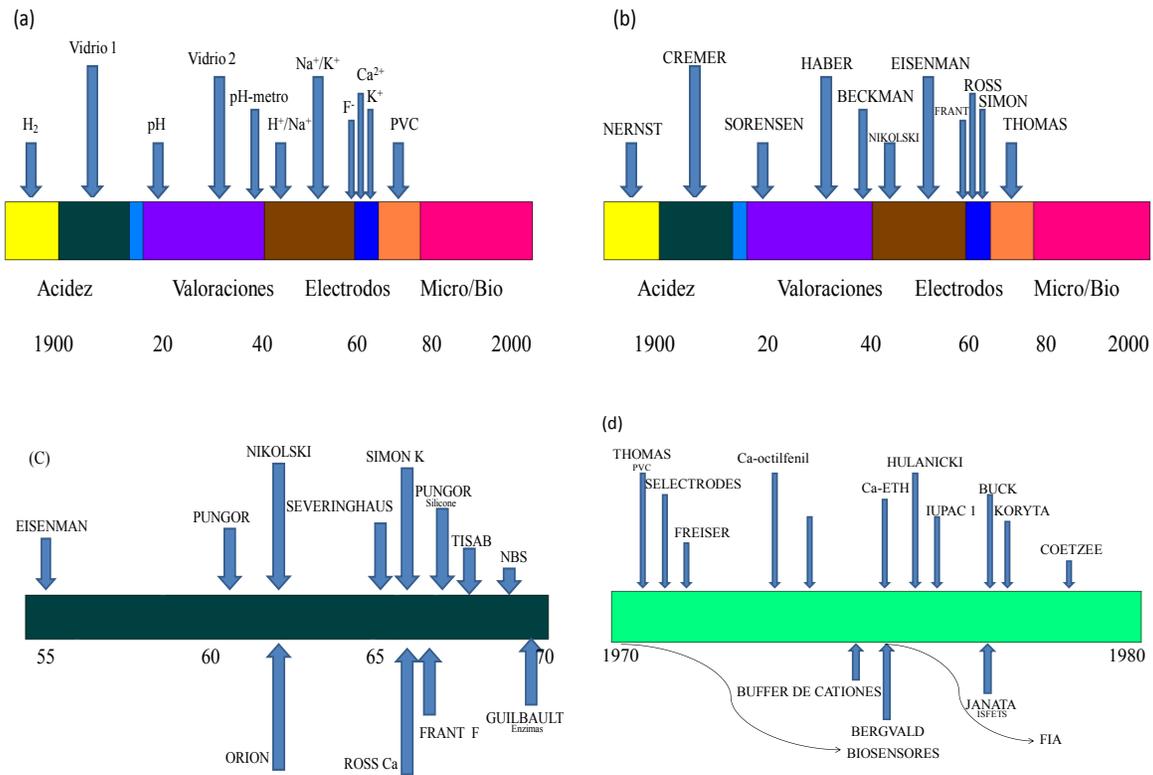


Fig. 2.4. Líneas del tiempo en el desarrollo de la potenciometría y electrodos selectivos: (a) los dispositivos, (b) los pioneros, (c) los inicios, (d) la edad de oro.

2.2 FUNCIONAMIENTO Y PRINCIPIOS FÍSICOQUÍMICOS DE LOS ISEs.

El primer electrodo selectivo a iones (ISE), fue el electrodo de membrana de vidrio que por muchos años fue el único práctico. La posibilidad de usar un electrodo de este tipo para las medidas de pH fue reconocido a principios de 1900 y la posibilidad comenzó a ser práctica durante la década de 1930, con el desarrollo de voltímetros con características de entrada de resistencia suficientemente altas (Fischer, 1974).

Junto con un entendimiento menos empírico del uso y una mejora del electrodo de vidrio para medidas de pH; ha venido el desarrollo de electrodos de vidrio para las medidas de algunos otros iones además de una particular importancia a la introducción y uso de algunos otros tipos de electrodos de iones selectivos (*ISEs*).

2.2.1 El electrodo de vidrio para medidas de pH.

En uso para medir pH, la membrana de vidrio separa dos fases líquidas. La fase dentro del electrodo es típicamente una solución 0.1 M de ácido clorhídrico (**Fig. 2.5**). La otra fase líquida es la solución de prueba dentro de la cual se sumerge el electrodo. Dos electrodos de referencia se utilizan, uno en cada una de las soluciones la diferencia en potencial entre los dos electrodos de referencia se mide por medio de un voltímetro electrónico, las lecturas del dispositivo son comúnmente calibradas directamente en unidades de pH.

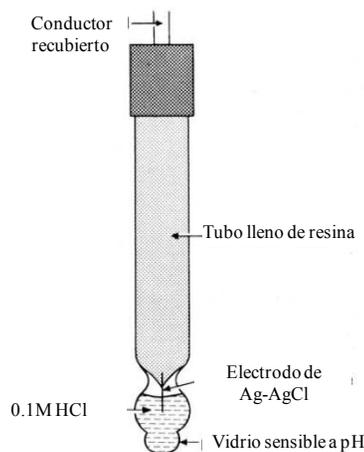


Fig. 2.5. Electrodo de membrana de vidrio para medir pH

Las discusiones en libros de texto del funcionamiento del electrodo de membrana de vidrio para medidas de pH han sido frecuentemente basadas sobre el postulado que los iones hidrógeno fluyen selectivamente a través de la membrana de vidrio desde la solución más concentrada a la menos concentrada. En algunos casos estas explicaciones se han elaborado con un alto grado de firmeza, aunque estas nunca han sido realmente justificadas. Este tipo de explicaciones pueden ser ilustradas por las siguientes citas de libros de texto que se han citado en un artículo de Robert B. Fischer sobre ISE's: *...una membrana, la cual es permeable sólo a iones hidrógeno, hidroxilos y agua...* (1955); *Los iones hidrógeno pueden moverse a través de la pared de vidrio* (1957); *El electrodo de vidrio es una membrana que es selectivamente permeable sólo a iones hidrógeno—esto es, que permite a los iones hidrógeno difundirse libremente, pero no permite el paso de otros cationes o aniones* (1963). *La parte esencial del electrodo de vidrio es una membrana muy delgada de vidrio la cual es permeable sólo a iones hidrógeno; los poros del vidrio son tan pequeños como para permitir el paso de otros cationes o aniones* (1966) (Fischer, 1974).

Otros autores de libros de texto, reconocen que cualquier mecanismo de estado basado sobre el paso de los iones hidrógeno a través de la membrana, están bajos en fundamentos o son muy simples; se han referido a la membrana de vidrio como *perceptivo a pH* o *sensible a pH* y han entonces propuesto unas bases empíricas a las declaraciones o discusiones cuantitativas de la relación observable entre potencial y pH (Fischer, 1974).

Cualquiera que sea el mecanismo químico o físico propuesto de la respuesta del electrodo; el hecho ha sido largamente reconocido y la respuesta de la membrana del electrodo de vidrio se puede describir por medio de un tipo común de la ecuación de Nernst. Una diferencia de diez veces la concentración (o actividad) de iones hidrógeno, corresponde a una diferencia de potencial de 59 mV, bajo una amplia gama de condiciones experimentales comúnmente encontradas.

Se han realizado una serie de experimentos que se llevaron a cabo usando iones hidrógeno marcados isotópicamente como iones tritio, para comprobar si algún ión hidrógeno pasa o no a través de la membrana de vidrio. Se concluyó definitivamente que ningún ión es

transportado a través de la membrana, ni siquiera cuando se trató de forzarlos a través de electrolisis.

La composición de un vidrio típico puede ser representado como Na₂O•Al₂O₃•SiO₂. Considerando por un momento sólo la porción de SiO₂, el vidrio consiste de una red tridimensional al azar de tetraedros de SiO₄ (**Fig. 2.6**). Sin embargo, algunos átomos de oxígeno no están completamente unidos a átomos de silicio. Cuando estas condiciones ocurren, un *sitio* negativo existe en el espacio que debe ser, de otra manera, ocupado por un átomo de silicio. A lo largo del vidrio, considerando sólo la porción de SiO₂, hay sitios y espacios negativos. En un vidrio actual, mucho de estos espacios son ocupados por iones Na⁺, lo que explica la porción de Na₂O de la fórmula química, pero cada Na⁺ no está necesariamente unido a un lugar en particular. Por lo tanto, el vidrio incluye algunos sitios sobre átomos de oxígeno parcialmente enlazados, junto con los iones sodio los cuales se encuentran flotando en torno a la estructura (Fischer, 1974).

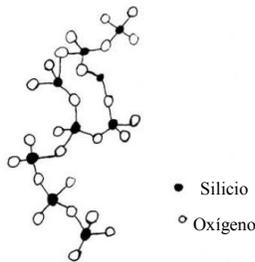


Fig. 2.6. Diagrama de tetraedros de SiO₄.

Un electrodo de membrana de vidrio no funciona apropiadamente a menos que o hasta que haya sido sumergido en agua. Presumiblemente el medio acuoso penetra al vidrio, formando una capa hidratada, en cada interface de la membrana de vidrio, como se representa en **Fig. 2.7**.

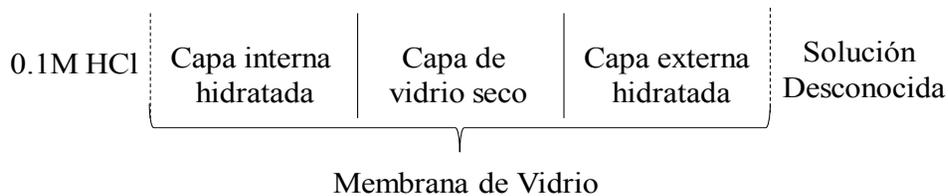


Fig. 2.7. Representación de una membrana hidratada de vidrio.

La capa hidratada de vidrio tiene un espesor de pocos cientos de *angstroms* (Å), mientras que la capa de vidrio seco puede ser del orden de 50 µm. El intercambio de cationes ocurre dentro de la capa hidratada interna y externa, entre los iones de sodio del vidrio y de los iones hidrógeno de la solución interna o externa.



Los iones hidrógeno ocupan algunos lugares negativos de la capa hidratada. La cantidad de iones hidrógeno intercambiados es proporcional a la actividad de los iones hidrógeno en la solución adyacente, el resultado se establece con un potencial de límite de fase en cada una de las dos capas hidratadas. A fin de diferenciar entre estos potenciales de estos dos límites de fase y sean medidos, debe haber alguna conductividad eléctrica a través de la capa de vidrio seco. Esto supuestamente consiste en conducción iónica que envuelve a los iones sodio los cuales pueden moverse intersticialmente. No es del todo necesario que un ion sodio dado se mueva todo el camino a través de la capa de vidrio seco, pero, más bien que muchos iones se mueven cortas distancias, cada uno para promover la red de conductividad iónica. Así, el funcionamiento de un electrodo de membrana de vidrio para mediciones de pH ahora comúnmente se considera que involucra (a) la existencia de capas de vidrio hidratadas en cada interface vidrio-solución, (b) intercambio de cationes dentro de cada una de estas interfaces entre los iones sodio del vidrio iones hidrógeno de la solución y (c) conductividad iónica que implica cationes intersticiales a través de la capa de vidrio seca. (Fischer, 1974)

2.2.2 Electrodo de Vidrio para Medir Otros Iones que no son el Ion Hidrógeno.

La selectividad del electrodo de membrana de vidrio para el ion hidrógeno es dependiente de una preferencia para el ión hidrógeno en la reacción intercambio-cación. Esta preferencia proviene del carácter ácido débil de los sitios negativos los cuales existen en átomos de oxígeno enlazados de forma incompleta. La selectividad no es perfecta. Si hay relativamente pocos iones hidrógeno comparada con algunos otros cationes, el intercambio puede ser mucho más con otro ion. Por ejemplo, en una solución de alto pH, la lectura es más baja a la esperada (esto es, que la concentración aparente del ion hidrógeno es muy

alta), simplemente por el intercambio apreciable de los cationes los cuales están presentes en concentración más alta significativamente que los iones hidrógeno.

El grado de selectividad a favor del ion hidrógeno es apreciablemente dependiente de la composición de vidrio. Por ejemplo, si algunos de los átomos de silicio enlazados completamente en una configuración tetraédrica representada en la **Fig. 2.6** son reemplazados por átomos de aluminio, las cargas negativas de los cuatro átomos de oxígeno adyacentes están compensadas por las tres cargas negativas en lugar de cuatro. Así los sitios negativos sobre átomos de oxígeno completamente enlazados están relativamente más negativos, y la preferencia por intercambio con iones hidrógeno se disminuye. Esto resulta, de hecho, en un electrodo de membrana de vidrio la cual responde cuantitativamente a algunos cationes que no son iones hidrógeno. Un electrodo de membrana de vidrio selectiva a sodio es uno en el cual la membrana de vidrio es relativamente alta en contenido en aluminio (Fischer, 1974).

2.2.3 Sensores o sondas sensibles de gases.

Este tipo de dispositivos usan una membrana permeable a gases para aislar el analito de posibles interferencias en la muestra (**Fig. 2.8**), una delgada capa de buffer es utilizada para atrapar el analito gas y convertirlo en alguna especie iónica que puede ser detectada potenciométricamente (**Tabla 2.1**). Por ejemplo, el gas NH₃ puede ser monitoreado vía formación de NH₄⁺ (NH₄⁺-ISE) o vía el cambio en H⁺ (pH-ISE) dentro de la capa de buffer (Evans, 1987 y Fischer, 1974).

El sensor de amoníaco utiliza NH₄Cl como un electrolito *espaciador*. Los gases libres o disueltos penetran la capa y cambian el pH, que puede ser calibrado en términos de presión parcial del gas.

Los electrodos potenciométricos de gases son simples y seguros, pero estos tienden a tener una respuesta y tiempos de recuperación relativamente lentos (30 s a 5 min). El éxito comercial en el ámbito clínico ha sido limitado a las determinaciones de CO₂, aunque los sensores de NH₃ se están volviendo populares por su uso en electrodos basados en enzimas inmovilizadas.

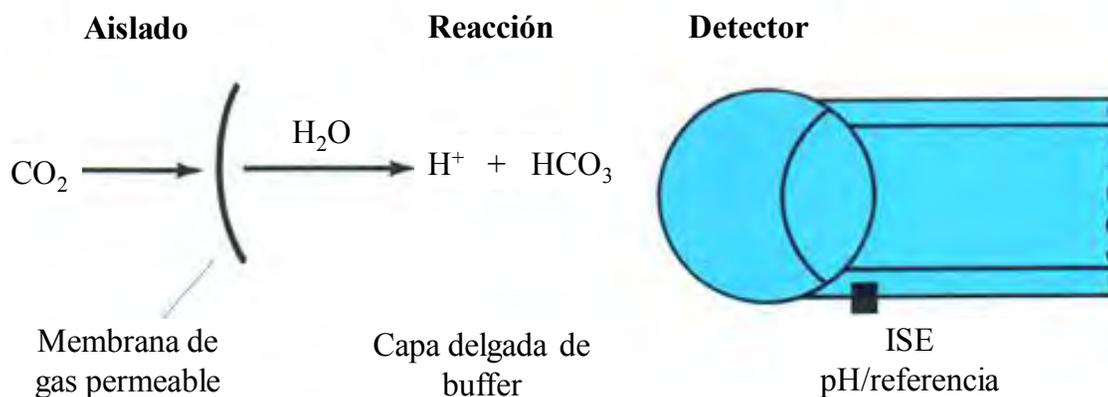


Fig. 2.8. Representación de un sensor o sonda sensible a gases. En este ejemplo se muestra que el analito, en este caso CO₂ se aísla para posteriormente transformarlo mediante una reacción química y así la sustancia iónica formada, H⁺, es detectada por un ISE de pH.

Tabla 2.1. Posibles equilibrios asociados con los electrodos sensibles a gases.

Especies que se difunden	Equilibrios	Electrodo sensor
NH ₃	$\text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{NH}_4^+ + \text{OH}^-$	H ⁺
	$x\text{NH}_3 + \text{M}^{n+} \rightleftharpoons \text{M}(\text{NH}_3)_x^{n+}$	M=Ag ⁺ , Cd ²⁺ , Cu ²⁺ .
SO ₂	$\text{SO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{HSO}_3^-$	H ⁺
NO ₂	$2\text{NO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{NO}_3^- + \text{NO}_2 + 2\text{H}^+$	H ⁺ , NO ₃ ⁻
H ₂ S	$\text{H}_2\text{S} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HS}^- + \text{H}^+$	S ²⁺
HCN	$\text{Ag}(\text{CN})_2^- \rightleftharpoons \text{Ag}^+ + 2\text{CN}^-$	Ag ⁺
HF	$\text{HF} \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{F}^-$	F ⁻
	$\text{FeF}_x^{2-x} \rightleftharpoons \text{FeF}_y^{3-y} + (x-y)\text{F}^-$	Pt (redox)
HOAc	$\text{HOAc} \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{OAc}^-$	H ⁺
Cl ₂	$\text{Cl}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons 2\text{H}^+ + \text{ClO}^- + \text{Cl}^-$	H ⁺ , Cl ⁻
CO ₂	$\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$	H ⁺
X ₂	$\text{X}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons 2\text{H}^+ + \text{XO}^- + \text{X}^-$	X=I, Br

2.2.4 Electrodo de Estado Sólido.

El vidrio no es la única sustancia que puede formar membranas de intercambio de cationes con una fase de solución adyacente y conducción iónica. A continuación se consideran algunas membranas conocidas como membranas de electrodos selectivos a iones del tipo estado sólido (Fischer 1974).

2.2.5 Electrodo policristalinos o de precipitados de estado sólido.

Una primera forma del electrodo de estado sólido fue desarrollada y estudiada en el laboratorio de Robert B. Fischer (Fischer, 1974) en la década de los 50's. El electrodo consistía de una membrana de una sustancia precipitada, como sulfato de bario, integrada en una matriz de parafina montada al final de un tubo de vidrio de 1.0 cm de diámetro. Se supone que la parafina no *humedece* las superficies de los cristales inorgánicos, entonces una red de trabajo de pequeños poros o canales existen a lo largo de la membrana en los límites de cristal-parafina. Cuando cada superficie de la membrana está en contacto con una solución acuosa, la solución tiende a penetrar la membrana y los iones son absorbidos dentro de las superficies del cristal. La selectividad en la capa primaria de adsorción esta descrita por la regla de Paneth-Fajans-Hahn (Fischer, 1974) y otros factores pertinentes, mientras la conducción eléctrica a través de la membrana implica los contraiones de carga opuesta. Aunque la selectividad perfecta y la respuesta Nernstiana no se había logrado con estos electrodos de membrana, era posible correlacionar el potencial con la composición de la solución e incluso usar estos electrodos en valoraciones potenciométricas bajo algunas condiciones. El diagrama en la **Fig. 2.9** es generalmente aplicable a todos los electrodos de membrana de estado sólido. El más extenso desarrollo práctico hasta la fecha del electrodo policristalino o de precipitado de estado sólido se ha logrado con goma de silicona como la matriz de incrustación. Estas membranas están típicamente formadas al mezclar las partículas precipitadas, usualmente de 5-10 μm en tamaño, con el monómero de silicona, seguido de polimerización. Los electrodos de este tipo están comercialmente disponibles con un número de sustancias precipitadas diferentes, cada una con su propia selectividad distintiva.

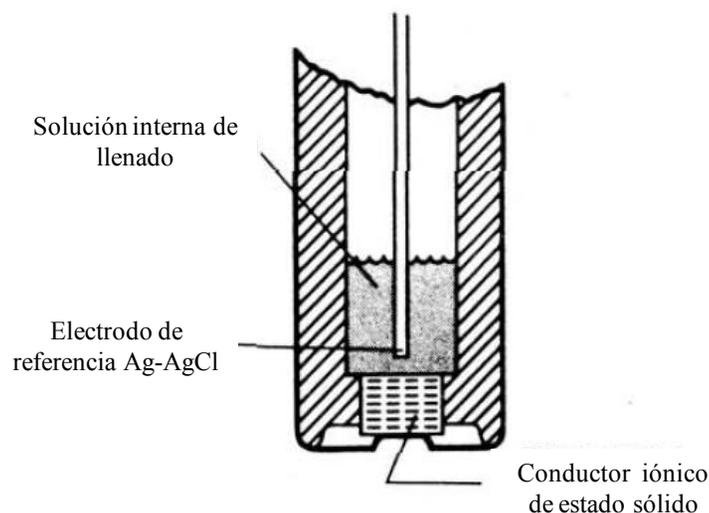


Fig. 2.9. Electrodo de membrana de estado sólido.

Una membrana de este tipo se supone exhibe adsorción preferencial dentro de las superficies de las pequeñas partículas de algún ión el cual está en común con el precipitado. Así, por ejemplo, un electrodo con una membrana de partículas de yoduro de plata en una matriz de goma de silicona es selectiva para el ión yoduro. Este electrodo en particular es análogo, en medida a lo que la determinación potenciométrica de yoduro se refiere, al electrodo de alambre de plata recubierto de yoduro de plata. Mientras tanto, este último es susceptible a interferencias provenientes de otros sistemas redox, mientras que el electrodo de membrana no lo es.

Los electrodos de membranas con otras partículas precipitadas son selectivos para otros iones. Curiosamente, un electrodo de yoduro de plata de estado sólido puede cambiarse a un electrodo indicador de cianuro, al sumergirlo por un tiempo en una solución de cianuro. Se supone que las capas superficiales de las partículas del yoduro de plata se convierten a cianuro de plata (Fisher, 1974).

2.2.6 Electrodos de estado sólido de un solo cristal.

Considerados como el siguiente tipo de electrodos en los cuales la membrana consiste de una capa fina de un solo cristal de sulfato de plata de igual manera que en la **Fig. 2.9**. La estructura reticular y el tamaño relativo de los iones plata y sulfuro son tales que hay algunos *sitios positivos*, esto es, algunos vacíos donde los iones plata faltan de lo que sería

una red completa, cristalina perfecta. Hay correspondientemente alguna libertad de movimiento de los iones plata dentro de la red o la estructura reticular. La consecuencia neta es un electrodo indicador de ion plata, con intercambio de iones plata a través de las interfaces entre la membrana, la solución interna y externa y la conducción iónica a través del único cristal delgado.

Otros prácticos ejemplos del uso del electrodo de membrana de estado sólido de un solo cristal son los electrodos indicadores de yoduro y fluoruro, en los cuales la membrana consiste de un cristal delgado de yoduro de plata o fluoruro de litio, respectivamente. En el último, la estructura del cristal consiste de capas alternadas de iones fluoruro y litio, con algunos agujeros en la capa de fluoruro. El movimiento iónico total consiste de muchos pequeños movimientos, en cada uno de los cuales un ion fluoruro se desplaza de su posición a un agujero adyacente. El fluoruro de lantano puede ser *dopado* con un poco de Europio(II), el cual parece disminuir la resistencia eléctrica y aumentar el transporte iónico el cual es esencial para hacer determinaciones potenciométricas con rapidez de respuesta razonable (Fischer, 1974).

2.2.7 Electrodo de Membrana de Intercambio de Iones Líquido.

Para un ion divalente que se somete a intercambio requiere en efecto que haya dos sitios de intercambio localizados en una relación espacial adecuada entre sí. Un electrodo de estado sólido tiene, por supuesto, muchos sitios de intercambio disponibles, pero todos están en lugares que difícilmente pueden esperarse que coincidan en pares con iones calcio (Ca²⁺), por ejemplo. Sin embargo, si la membrana no consiste de partículas sólidas rígidamente situadas, sino más bien de un intercambiador de iones líquido, los sitios de intercambio están libres para moverse. El tipo de electrodo selectivo de intercambiador de iones líquido está representado en la **Fig. 2.10**. La membrana no se soporta así misma, como lo es la membrana sólida, pero fácilmente puede mantenerse en su lugar por una delgada capa de vidrio o plástico. Como con otro tipo de electrodos de membrana, una solución suele usarse internamente, la muestra de prueba constituye la solución exterior, y se mide el potencial entre los dos electrodos de referencia, cada uno de los cuales se encuentra en cada una de las soluciones (Fischer, 1974).

Los extractores de iones (R^+X^- y M^+R^-) están atrapados por su propia solubilidad en polímeros hidrofóbicos y son normalmente plastificados para permitir movilidad interna de

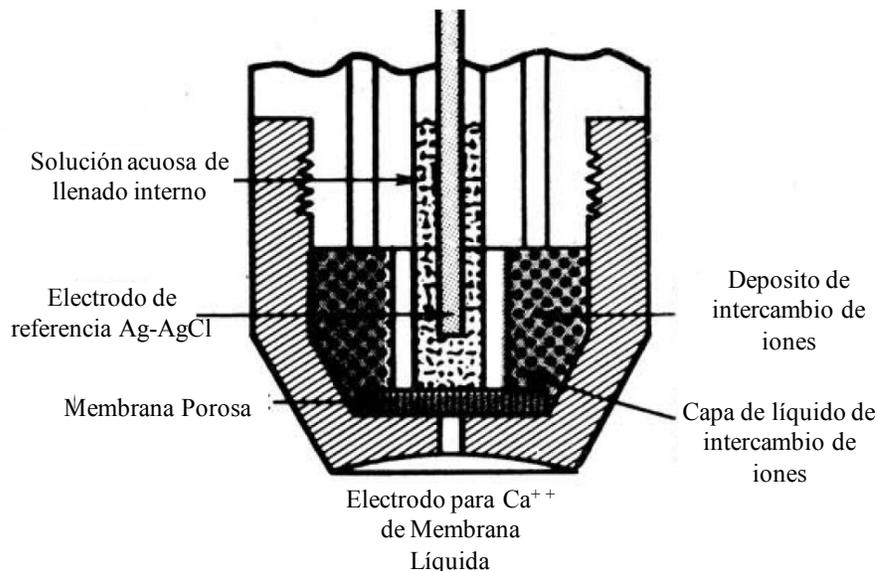


Fig. 2.10. Electrodo de membrana de intercambiador de ion líquido.

los extractores disueltos (PVC plastificado). R^- denota iones solubles en aceite y M^+ y X^- son iones inorgánicos para ser medidos por la celda de la membrana. Sales de cationes de cadena larga, ácidos orgánicos hidrofóbicos y sales de aniones de aminas orgánicas de cadena larga protonada o cuaternizada son utilizadas como intercambiadores de iones. El más bajo límite de medición de la actividad de un ion desconocido está determinado por la baja solubilidad intrínseca de la sal intercambiadora de ion en electrolito acuoso. Un sensor basado en un intercambiador de iones líquido permitirá medir la actividad del cambiador de ion atrapado si está presente en solución. Esta es la base de muchos sensores de drogas (Buck, 2001).

Compuestos de intercambio de ion R^+ o R^- disueltos en plastificantes hidrofóbicos no poseen especificidad para iones particulares M^+ y X^- . En el caso del diéster del ácido fosfórico, Mg^{2+} y Ca^{2+} en mezclas no son totalmente distinguibles cuando la disociación completa en la fase de la membrana es promovida por el uso de un plastificante de constante dieléctrica alta. Un electrodo de dureza del agua mide ambos iones (total) con igual selectividad (Buck, 2001). Daniel Ammann y colegas desarrollaron muchos agentes

complejantes selectivos (ionoforos o transportadores neutros de iones) (Ammann, 1983; Bühlmann, 1998). Las bases teóricas para el diseño, desarrollado por Pretsch, es una combinación de cálculos de mecánica cuántica y datos de espectroscopia RMN e IR. Muchos transportadores han hecho electrodos muy selectivos para cationes mono y divalentes incluyendo Mg²⁺ en presencia de Ca²⁺.

Las membranas porosas, tales como el acetato de celulosa, se empapan de un intercambiador de iones líquidos disuelto en un solvente líquido. Originalmente, nitrobenzeno, bromobenzeno, y después *o*-nitrofenil octil éter se seleccionaron como solventes porque estos son casi insolubles en agua y todavía tienen una constante dieléctrica suficientemente alta para disolver el compuesto intercambiador de ion. Las membranas originales de intercambiador de ion líquido eran heterogéneas.

Por el momento este electrodo fue investigado, mayor cantidad de información ya había sido recogida acerca de varios tipos de materiales de intercambio de iones y sus selectividades para varios iones.

Esta reserva de datos sobre los intercambiadores de iones fue directamente aplicable al desarrollo de electrodos selectivos de iones útiles, particularmente para iones multivalentes. Un número de electrodos de este tipo están ahora comercialmente disponibles. La aplicación para aniones ha quedado atrás pero es un campo activo.

2.2.8 Electrodo Basado en Enzimas.

De nuevo el concepto es usar una membrana para aislar y transformar el analito deseado en especies que pueden ser monitoreadas potenciométricamente o amperométricamente. Generalmente, las membranas son compositos multicapa que contienen una o más enzimas inmovilizadas, cuando se ponen en contacto con la enzima sustrato (analito), la membrana cataliza la descomposición del sustrato para formar productos electroactivos (e.g., H₂O₂) y/o para consumir reactivos electroactivos (e.g., O₂). El ejemplo clásico es la determinación de glucosa usando glucosa oxidasa (GOD) inmovilizada combinada con detección amperométrica de H₂O₂ u O₂ y con la presencia de peróxidasa de rábano (HRP, por sus siglas en inglés; *horseradish peroxidase*) (**Fig. 2.11**).

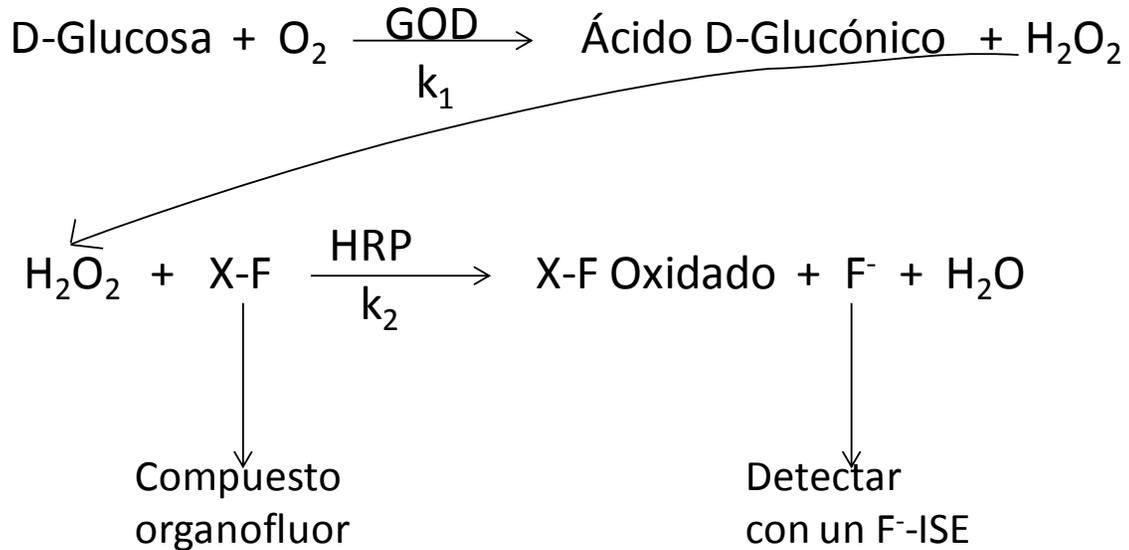


Fig. 2.11. Ensayo de glucosa vía F⁻ ISE. La glucosa reacciona con oxígeno en presencia de GOD para formar peróxido (H₂O₂) que a su vez reaccionará con un compuesto órgano fluorado en presencia de HRP para generar F⁻ libre.

Puesto que la enzima que se inmoviliza es reutilizable. Los datos pueden ser tomados vía estado estacionario (30 s a 3 min) o modo de calificación (10-30 s). El concepto del electrodo es más bien versátil y ha sido aplicado a una serie de analitos (**Fig. 2.12**). Científicos japoneses han estado especialmente activos en esta área en los pasados 5 años y han estado obteniendo muchas patentes (Czaban, 1985).

A pesar de alta cantidad de interés de investigación, la comercialización en gran escala no se ha logrado aún. En el campo clínico, el sensor de glucosa ha estado disponible por algún tiempo, pero el número de ensayos realizados por electrodo es pequeño comparado al número realizado por el método espectrofotométrico convencional. El lento progreso aquí puede ser similar al que se ha experimentado para los análisis de Na⁺ por ISE. Es razonable predecir que tan pronto como los dispositivos prácticos se desarrollen para una multitud de metabolitos clave, la comercialización de electrodos basados en enzimas ocurrirá rápidamente.

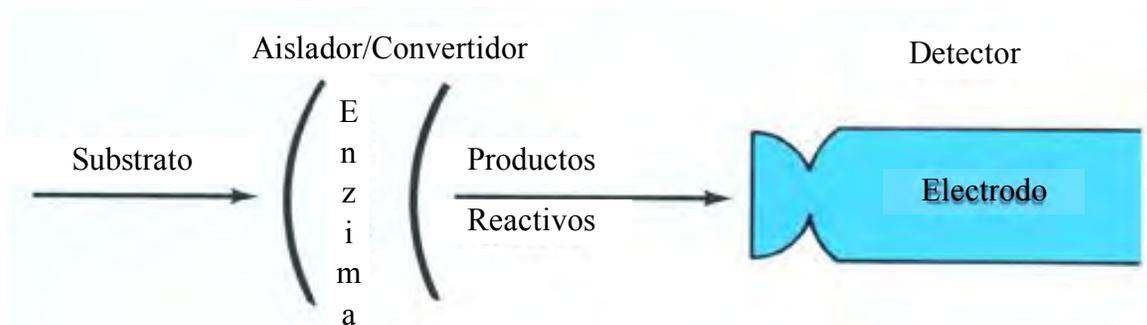


Fig. 2.12. Electrodo basado en enzima. La característica clave de este tipo de electrodo es una membrana multicapa (que contiene una o más enzimas inmovilizadas), la cual aísla el analito substrato y lo convierte en una especie electroactiva.

2.2.9 Interfaces Iónicas, Bloqueadas y Electrónicas.

La membrana convencional (**Fig. 2.13**) es utilizada para construir ISEs. Tiene interfaces intercambiadoras de ion y una membrana gruesa separando dos soluciones –la de muestra y la de referencia. Los intentos para eliminar la solución de referencia por el remplazo con metales inertes u otros sólidos, materiales de electrones conductores fueron esencialmente fallidos. No hay una diferencia de potencial (*ddp*) interfacial formada estable –es un desajuste entre las fases ion conductor y electrón conductor. Ordinariamente esta interface es puramente capacitiva. No está en equilibrio porque no hay un proceso de intercambio de carga que establezca una *ddp* interfacial reversible. Esta es una interface *bloqueada* esencialmente como si la membrana estuviera contactando un aislante, tal como la sílica. Janata demostró como estabilizar y usar interfaces bloqueadas como parte de los transistores de efecto de campo de iones selectivos (*ISFETs* por sus siglas en inglés; *Ion Sensitive Field Effect Transistor*) (Stock, 1989).

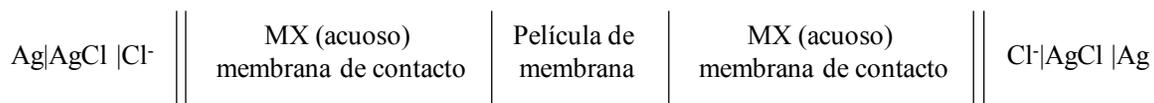


Fig. 2.13. Clásica celda de membrana separada con contacto iónico.

Michael Sharp mostró que un sistema ISE puede ser fabricado de una *membrana* de un radical libre de una sal insoluble de un metal inerte (Astrup, 1986), el intercambio de electrón reversible ocurre en un metal, y el intercambio de ion reversible ocurre en la interface de la membrana de prueba del electrolito. Fred Anson y compañeros de trabajo subsecuentemente mostraron que las membranas de intercambio de iones pueden estar cargadas parcialmente con pares de iones positivos redox como cationes complejos Ru(II/III) o aniones ferro/ferrocianuro en el caso de intercambiador de anión o catión respectivamente (Naegli, 1986). El par redox creó y estabilizó temporalmente la *ddp* en el metal inerte y el intercambio de ion con las especies medidas ocurrió en la interface de la membrana de prueba de la solución. La teoría y las ecuaciones para las *ddp* de intercambio de ion interfacial no redox (Nernst-Donnan), iones redox tratados como intercambiadores de electrones en metales inertes (*ddp* de Nernst) y iones redox como intercambiadores de ion en interfaces de ion fueron establecidas por Buck and Vanysek (Buck, 1990). La novedad es la prueba que la *ddp* es la misma (como debe ser) si el sistema es tratado como una interface de intercambio de ion o una interface de intercambio de electrón.

2.3 IMPORTANCIA DE CUANTIFICAR GASES POTENCIOMÉTRICAMENTE.

En décadas pasadas los *ISEs* que se basan en dispositivos sensibles a gases, habían probado ser herramientas analíticas atractivas para la detección de gases disueltos (e.g., NH₃, CO₂, NO₂, SO₂, etc.) en muestras complejas incluyendo sangre (Arnold & Meyerhoff, 1984; Arnold & Solsky, 1986; Solsky, 1988; Bailey & Riley, 1975). Además, cuando se utilizan en conjunción con enzimas inmovilizadas y células intactas, estos sensores de gases pueden proveer medidas indirectas simples para cuantificar un amplio rango de biomoléculas vía configuraciones biosensibles modernas (Rechnitz, 1981; Guilbault, 1984; Karube & Suzuki, 1984).

En la actualidad las sondas (o electrodos) sensibles a gases comerciales que están disponibles (para CO₂, NH₃, NO_x, etc.) (Ross *et al.*, 1973) se basan generalmente en el diseño introducido por Severinghaus & Bradley (Severinghaus & Bradley, 1958). Este diseño, que se ha analizado anteriormente (**Fig. 2.8**), en el cual el gas analito se difunde a través de la membrana permeable a gases (típicamente goma de silicón o teflón microporoso) a una delgada capa de electrolito en contacto con una membrana de vidrio de

un electrodo de pH. En la delgada capa de electrolito el gas participa en una reacción de equilibrio con agua y electrolitos apropiados. Cuando la presión parcial del gas es igual en ambos lados de la membrana permeable, un equilibrio en valor de pH se mide en la membrana de vidrio del electrodo de pH.

Las mediciones con sondas a gases se llevan a cabo usando la misma base de los métodos analíticos empleados con *ISEs*; se realizan ajustes al pH para liberar a las especies a medir, y en vez de un ajustador de fuerza iónica (*ISA*) se utiliza un ajustador de fuerza osmótica (*OSA*, por sus siglas en inglés: *Osmotic Strength Adjuster*)¹ (Ross, 1973).¹

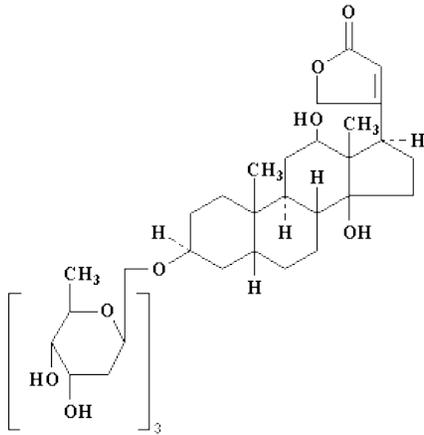
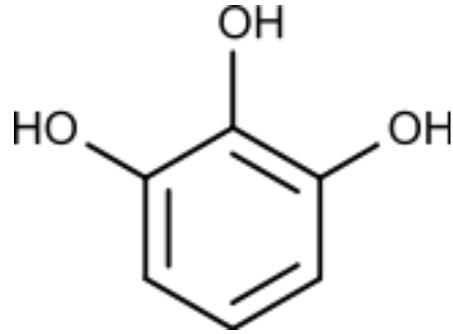
2.3.1 Algunas Aplicaciones para el Sensor o Sonda Selectiva a CO₂.

Las mediciones para las que el electrodo de CO₂ es utilizado son principalmente:

2.3.1.1 Mediciones en Sangre:

Se han realizado frecuentes mediciones de niveles del gas y pH en sangre (P_{O_2} , P_{CO_2} , pH) que constituyen una manera para evaluar el estado de enfermedades críticas y pacientes quirúrgicos para el diagnóstico y decisiones terapéuticas. (Lane & Walker, 1987; Shapiro *et al.*, 1989). Consecuentemente, ha habido un crecimiento en el interés de monitorear gases sanguíneos continuamente usando sensores químicos invasivos. Un acierto en el desarrollo de estos sensores es la incorporación de sensores multielementos por sondas implantadas Thompson & Vanderberg, (1986) Collison *et al.* (1989) ha demostrado la viabilidad de preparar un catéter sensor dual potenciométrico ion/ P_{CO_2} . Estos sensores se basan en el mismo principio de Severinghaus además de que se les agregan sensores químicos para los iones (e.g., Valinomicina para K^+) (Meyerhoff, 1998). La potenciométrica de gases por sensores ha sido utilizada como la base de muchos sistemas sensores de enzimas además de la medición directa del gas.

¹ Utilizada en algunos modelos de sondas sensibles.

Fig. 2.14. Digoxina (C₄₁H₆₄O₁₄).Fig. 2.15. Pirogalol (C₆H₆O₃).

2.3.1.5 Medición en Bebidas Carbonatadas.

Una cantidad de agua destilada se vierte en un vaso de precipitados adicionando una solución amortiguadora de 1 mol/dm³ de citrato de sodio, pH 4.5-5. Se adiciona una pequeña cantidad de bebida carbonatada recién abierta a pH mayor a 10; formándose de esta manera CO₂ (Fig.2.16). La sonda se sumerge dentro de esta solución, el CO₂ atraviesa la membrana sensible a gases, dentro, otra reacción se lleva a cabo (Ec. 2.6) se determina el potencial de la muestra por el electrodo de pH interno. Usando una curva de calibración se obtiene la concentración de CO₂ de la bebida, tomando en cuenta los factores de dilución (Kocmur, 1999).

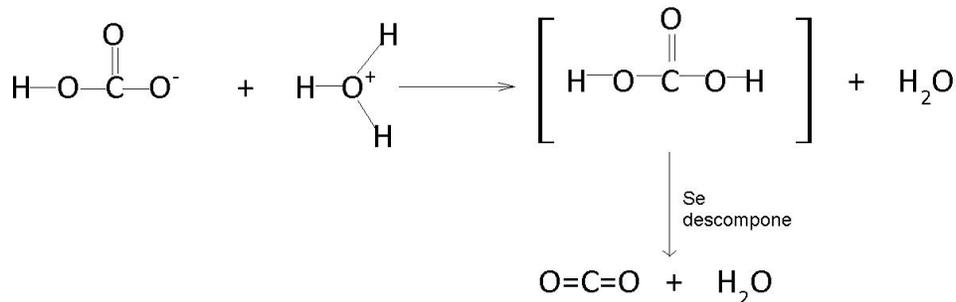
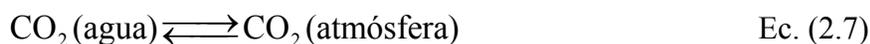


Fig. 2.16. Mecanismo de reacción supuesto para la muestra. El CO₂ formado atraviesa la membrana sensible a gases el cual la reacción subsecuente (Ec. (2.6)) produce la repuesta de potencial en el electrodo interno de pH.

2.4 EL CO₂ EN EL AGUA Y EL AIRE.

El ácido débil más importante en el agua es el dióxido de carbono, CO₂. Debido a la presencia de dióxido de carbono en el aire y su producción a partir de la degradación microbiana de la materia orgánica, el CO₂ disuelto está presente virtualmente en todas las aguas naturales y residuales (Manahan, 2007). La lluvia, aún en una atmósfera completamente no contaminada, es ligeramente ácida debido a la presencia de CO₂ disuelto. El dióxido de carbono y los productos de su ionización, el ión bicarbonato (HCO₃⁻) y el ión carbonato (CO₃²⁻) tienen una influencia sumamente importante en la química del agua. Muchos minerales se depositan como sales del ión carbonato. Las algas en el agua utilizan el CO₂ disuelto y el (HCO₃) en la síntesis de la biomasa. El equilibrio del CO₂ disuelto con el dióxido de carbono gaseoso en la atmósfera



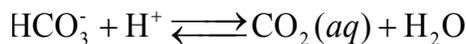
Y el equilibrio del ión CO₃²⁻ entre la solución acuosa y los minerales carbonatados sólidos



Tienen un fuerte efecto amortiguador (buffer) sobre el pH del agua.

En la atmósfera, el dióxido de carbono se encuentra a una concentración de sólo 0.037% en volumen de aire seco normal. Como consecuencia del bajo nivel de CO₂ atmosférico, el agua en equilibrio con la atmósfera, totalmente libre de alcalinidad (capacidad de neutralizar H⁺), contiene sólo un nivel muy bajo de dióxido de carbono. Sin embargo, la formación de HCO₃⁻ y CO₃²⁻ incrementa grandemente la solubilidad del dióxido de carbono. Las concentraciones altas de dióxido de carbono libre en el agua pueden afectar de manera adversa la respiración y el intercambio de gases de los animales acuáticos. Puede causar incluso la muerte y no debe exceder niveles de 25 mg/L en el agua (Manahan, 2007).

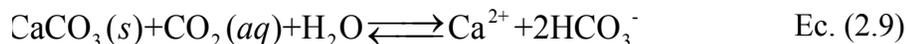
Una gran parte del dióxido de carbono encontrado en el agua es producto de la degradación de la materia orgánica por las bacterias. Incluso las algas, que utilizan CO₂ en la fotosíntesis, lo producen mediante sus procesos metabólicos en ausencia de luz. A medida que el agua se introduce a través de las capas de materia orgánica degradada mientras se infiltra en el suelo, puede disolver gran cantidad de CO₂ producido por la respiración de los



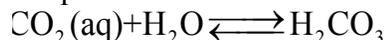
Validación de un método analítico para la determinación de CO₂

CO₂ (agua) ↔ CO₂ (atmósfera) Nájera

organismos en el suelo. Luego, al pasar el agua por las formaciones de caliza, disuelve el carbonato de calcio debido a la presencia del CO₂ disuelto:



Éste es el proceso por el que se forman cavidades en la roca caliza.



La concentración de CO₂ gaseoso en la atmósfera varía según el lugar y la estación y está

aumentando aproximadamente una parte por millón (ppm) por volumen por año. Para los

propósitos de cálculo, la concentración de CO₂ atmosférico se tomará aquí como 370 ppm

(0.0370%) en el aire seco. A 25°C (agua en eq. (atmósfera))

contiene 370 ppm de dióxido de carbono, tiene una concentración de CO₂(aq) de

1.211 × 10⁻⁵ M (Manahan, 2007). $\text{H}^+ = [\text{HCO}_3^-] = (1.211 \times 10^{-5} \times 4.45 \times 10^{-7})^{1/2} = 2.32 \times 10^{-6}$ $\text{pH} = 5.63$

!MCO₃ (sal carbonatada ligeramente soluble) ↔ M²⁺ + CO₃²⁻

Aunque el CO₂ en el agua se representa a menudo como H₂CO₃, la constante de equilibrio para la reacción



Es solamente de alrededor de 2 × 10⁻³ a 25°C, o sea, que solo una pequeña fracción del dióxido de carbono disuelto está en realidad presente como H₂CO₃.

Las especies predominantes formadas por el CO₂ disuelto en el agua dependen del pH. Esto se muestra mejor en un diagrama de distribución de especies, con el pH como variable principal, tal como se ilustra en la **Fig. 2.17**.

Este diagrama muestra a las especies más importantes presentes en solución como función del pH. Para el CO₂ en solución acuosa, el diagrama es una serie de gráficas de las fracciones presentes como CO₂, HCO₃⁻, y CO₃²⁻ como función del pH.

La distribución del diagrama de especies de la **Fig. 2.17** muestra que el ión bicarbonato HCO₃⁻ es la especie predominante en el intervalo de valores de pH que tienen la mayor parte de las aguas, con el CO₂ predominando en las aguas más ácidas.

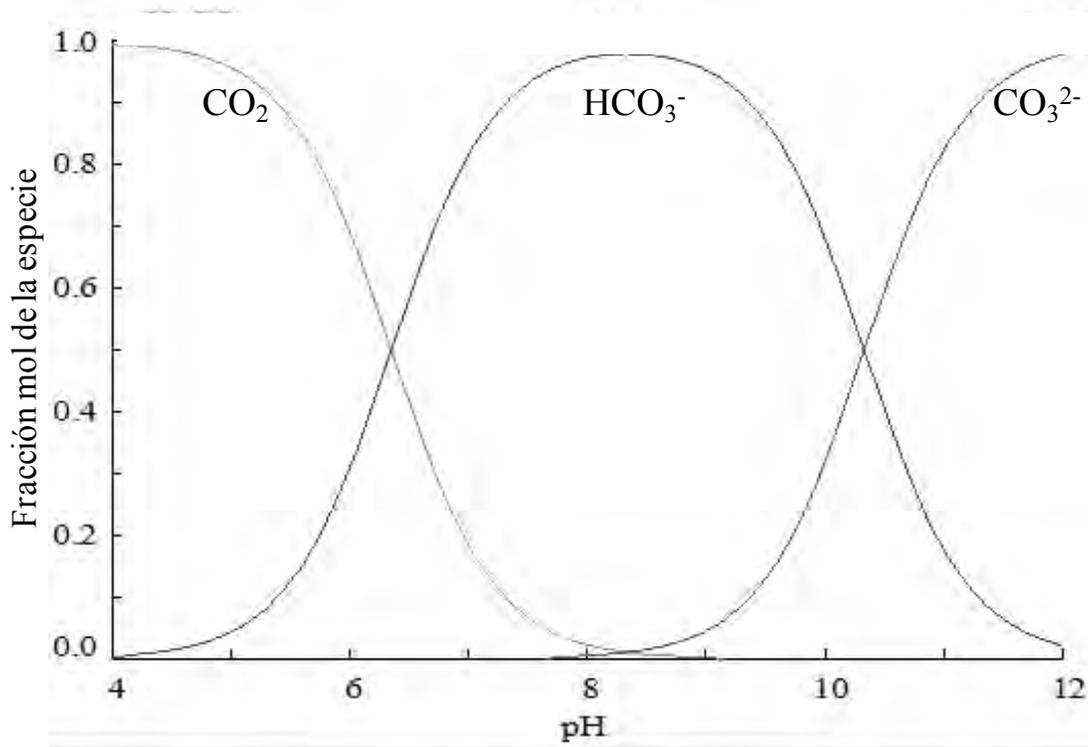
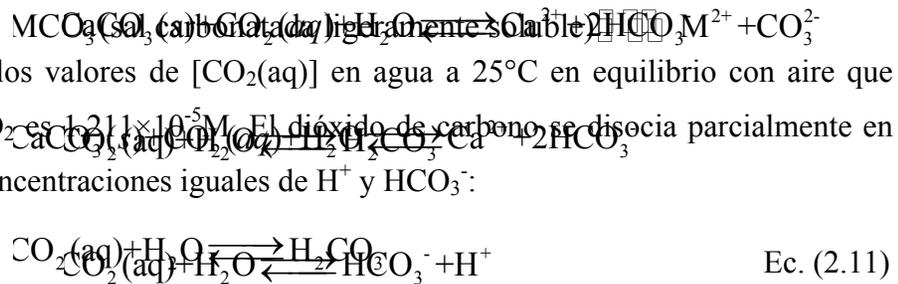


Fig. 2.17. Diagrama de distribución de especies de CO₂ en agua. El dióxido de carbono se disocia parcialmente en agua para producir concentraciones iguales de H⁺ y HCO₃⁻:



Como se mencionó, los valores de [CO₂(aq)] en agua a 25°C en equilibrio con aire que tiene 370 ppm de CO₂ es 1.211 × 10⁻⁵ M. El dióxido de carbono se disocia parcialmente en agua para producir concentraciones iguales de H⁺ y HCO₃⁻:

$$\begin{aligned} \text{CO}_2(\text{aq}) + \text{H}_2\text{O} &\rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \\ [\text{H}^+] &= [\text{HCO}_3^-] = (1.211 \times 10^{-5} \times 4.45 \times 10^{-7})^{1/2} = \\ &= 2.32 \times 10^{-6} \quad \text{pH} = 5.63 \\ [\text{H}^+] &= [\text{HCO}_3^-] = (1.211 \times 10^{-5} \times 4.45 \times 10^{-7})^{1/2} = \\ &= 2.32 \times 10^{-6} \quad \text{pH} = 5.63 \end{aligned} \quad \text{Ec. (2.12)}$$

Estos cálculos explican el por qué el agua pura que está en equilibrio con una atmósfera limpia es ligeramente ácida con un pH ligeramente menor de 7 (Manahan, 2007).

El dióxido de carbono no se le suele considerar como contaminante. Sin embargo, la combustión del carbón, petróleo y gas natural, como combustibles, produce grandes cantidades de CO₂, que se añaden a las fuentes naturales de alimentación (acción de los elementos vivos y descomposición de elementos orgánicos). Con la industrialización, la quema de combustibles orgánicos, una fuente de CO₂ tradicionalmente secundaria, ha alcanzado una extraordinaria importancia. Sin embargo, los estudios con carbono radioactivo, efectuados en 1957 por Hans Suess, de la Institución Scripp de Oceanografía (*Scripp Institution Of Oceanography*), demuestran que la mayor parte del aumento del CO₂ no proviene de la quema de combustibles fósiles, sino de los materiales de la industria moderna, así como de los que se producen en la oxidación lenta de las sustancias orgánicas de los pantanos, y en la combustión de hierbas y maleza realizada para limpiar los campos destinados al cultivo. Por su parte, Edward Deevey, profesor de la universidad de Yale, en un estudio realizado en 1958, defiende que el musgo de los pantanos o el humus de los suelos constituyen las principales fuentes de CO₂ (Bryson, 1973). Prescindiendo de la importancia de las fuentes productoras de CO₂ la realidad consiste en que ha tenido lugar un excedente de producción que es motivo de gran preocupación por su incidencia no sólo sobre los seres vivos sino también sobre los climas. Se ha de tener presente que el CO₂ en altas concentraciones es un contaminante y, cuando en el aire entra en una proporción del orden del 10 por ciento el ambiente llega a ser tóxico.

La descarga de CO₂ puede considerarse inofensiva a corto plazo. Como afirma H. S. Perloff existen grandes *sumideros* como la vegetación y los océanos que reabsorben este gas (Perloff, H. S., 1973). Es evidente que, si esta producción no estuviese compensada de algún modo, la cantidad total de CO₂ existente en la atmósfera aumentaría, de una manera continuada. Se mantiene un cierto equilibrio dinámico a causa principalmente de la acción amortiguadora que principalmente realizan la fotosíntesis y los océanos. La fotosíntesis toma CO₂ atmosférico y forma materia orgánica que se deposita en el suelo al morir, transformándose en humus; de esta manera la fotosíntesis elimina aproximadamente el 3 por ciento de la producción anual total de CO₂. Pero, todavía es más importante la acción de los océanos como factor regulador natural del contenido de CO₂ en la atmósfera; se estima que absorbe cerca de la mitad del CO₂ que penetra en la atmósfera. Esta acción

amortiguadora ya fue destacada por el químico ruso D. I. Mendelèiev a finales del siglo XIX. Este afirmaba que ante una disminución de la presión parcial del gas carbónico en el aire, el agua del océano lo desprende, y si aquella aumentaba, lo absorbe. De este modo, cuando se establecen cálculos de adición de CO₂ a la atmósfera basados en las cantidades de combustible quemado, sin tener en cuenta el efecto regulador del océano se cometen errores por exceso en el aumento del contenido de CO₂ en el aire a escala global. Hasta hace poco, como afirma R. Revelle, existía un estado de equilibrio entre la formación de CO₂ y su consumo por las plantas en la fotosíntesis y por la formación de carbonato cálcico (Revelle, 1956). Ahora existe una clara evidencia de acumulación neta de CO₂ en la atmósfera; según R. G. Barry y R. J. Chorley, entre 1900 y 1935 el CO₂ aumentó 9 por ciento (Barry, 1972). Se calcula que, al quemar combustibles fósiles, el hombre lanza a la atmósfera aproximadamente unos 6000 millones de *tm* (tonelada métrica) de CO₂ al año.

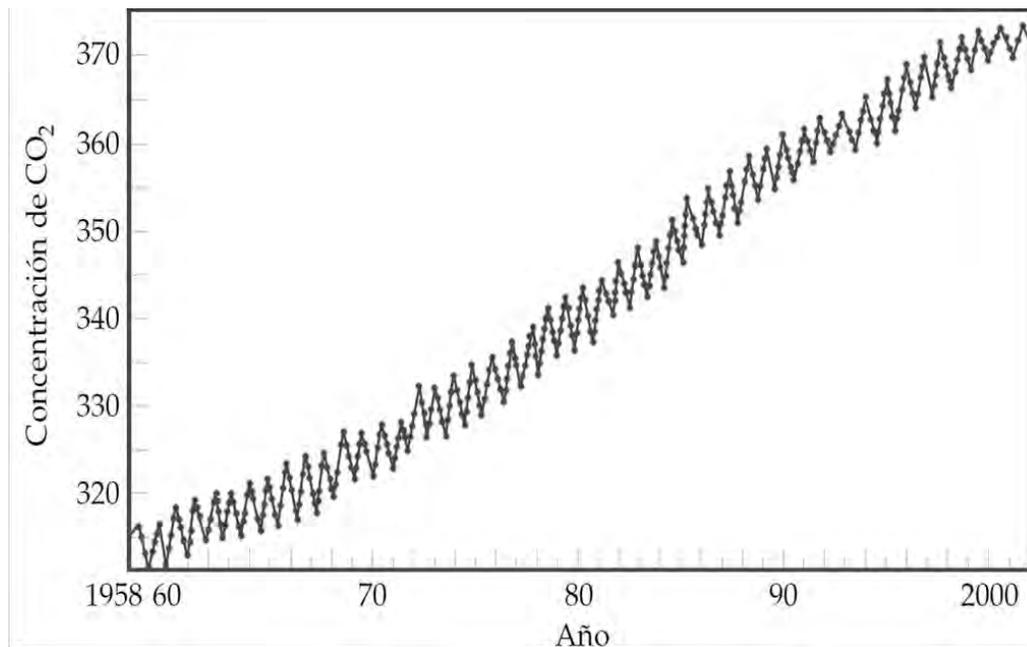


Fig. 2.18. La concentración atmosférica de CO₂ ha aumentado en más de 15% desde finales de la década de 1950. Estos datos fueron registrados en el Observatorio Mauna Loa de Hawái midiendo la absorción de radiación infraroja. La forma de dientes de sierra de la gráfica se debe a las variaciones estacionales regulares de la concentración de CO₂ a lo largo de cada año. La concentración de CO₂ se da en partes por millón. (Brown, 2004).

2.5 EL CO₂ Y SU USO EN BEBIDAS.

Las bebidas que contienen CO₂ son; en estos días, productos muy populares. Los consumidores disfrutan *su agradable y de alta demanda* sensación, a pesar del hecho de que pueden irritar, o incluso lastimar, a algunas personas. La sensación obtenida, por la bebidas carbonatadas es por cualquiera de los dos siguiente mecanismos; debido a la cantidad de burbujas de CO₂ estimulando mecanorreceptores de la lengua, o el origen quimiogénico (efecto de un compuesto químico sobre la localización y función de las proteínas) de la formación de ácido carbónico (H₂CO₃) en una reacción catalizada por anhidrasa carbónica, la cual estimula nociceptores en la cavidad oral (Dessirier, Simons, Carstens, O'Mahony, & Carstens, 2000). Las burbujas aparecen cuando los niveles de CO₂ son de 3-5 veces más altas que el valor del equilibrio de saturación y depende de las interfaces pre-existentes gas-líquido (Lubetkin & Blackwell, 1988; Wilt, 1986). El número y el tamaño de estas burbujas también tienen un impacto sensorial en las bebidas, al aumentar el transporte de masa de CO₂ cuando las burbujas afectan sobre la lengua e incrementan la sensación de *hormigueo*. Estos factores son muy importantes para el caso del champán donde las burbujas ascendentes cuentan en la evaluación sensorial del vino. La tasa de crecimiento y velocidad ascendente de las burbujas son influenciadas por la concentración del dióxido de carbono disponible en la fase líquida y por la presencia de moléculas tensoactivas (proteínas y azúcar) en la solución y sobre la pared de las burbujas, haciéndolas crecer lenta o rápidamente (Jones, Evans, & Galvin, 1999; Odake, 2001).

Por ejemplo, en refrescos, los polisacáridos o hidrocoloides son utilizados como espesantes, estabilizadores y agentes gelificantes, así como para mejorar *la sensación en la boca* y para beneficiar la retención de la carbonatación debida al aumento de la carga de tensoactivo del líquido. La modificación de la composición de la fase líquida puede dramáticamente afectar la percepción visual o el gusto de efervescencia de una bebida (Barker et al., 2002a, Barker, Jefferson, & Judd, 2002b).

La carbonatación se puede obtener por la inyección del gas en un recipiente sellado a presión, como con carbonatación doméstica. (Barker et al., 2002a, 2002b). Como el sistema es sellado a presión, la inyección gaseosa incrementa la presión interna, y por ello la solubilidad de CO₂. Arriba de 9 g/dm³ de CO₂ puede ser disuelto, el cual es el límite de

bebidas altamente carbonatadas tales como el agua tónica. El éxito del sistema doméstico es en gran parte dependiente en su facilidad de uso por el consumo y costo total. La despresurización del sistema a concentraciones más bajas de CO₂ en el espacio superior, causa desorción de gas. El gas puede ser inyectado continuamente a través de un *venturi* en la corriente del líquido. La mezcla es mucho más eficiente y se pueden alcanzar mayores niveles de carbonatación. La fabricación de refrescos carbonatados, requiere el monitoreo eficiente de la concentración de CO₂ en el líquido durante el proceso de carbonatación y la evaluación de la influencia de aditivos que podrían modificar el mecanismo absorción/desorción.

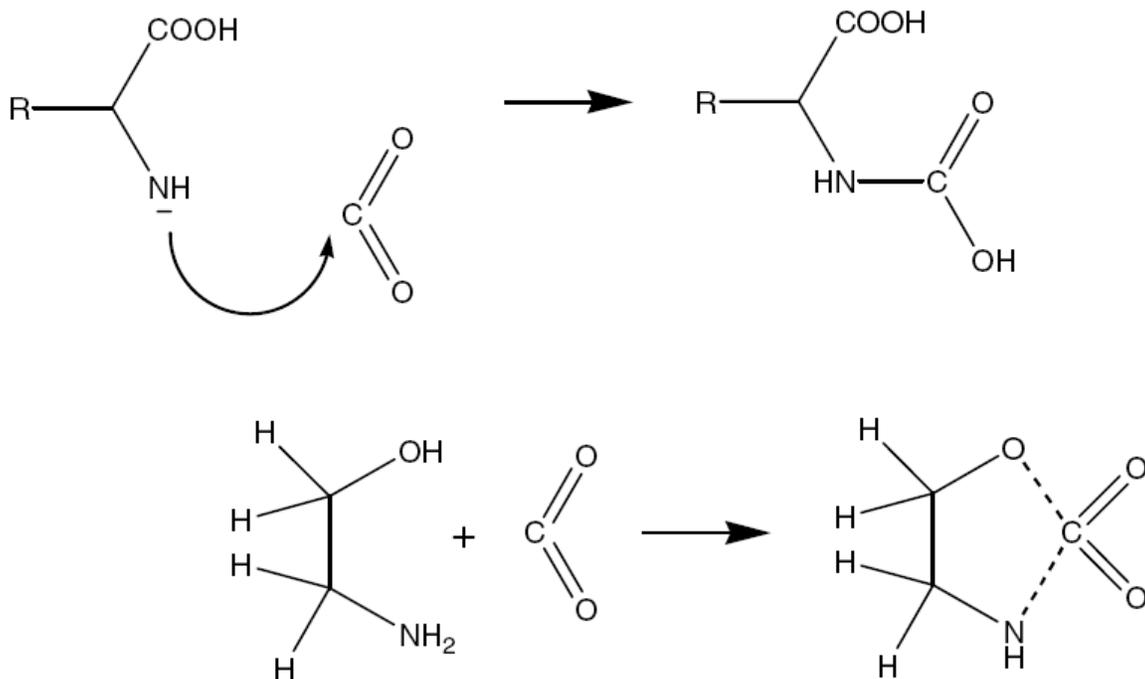
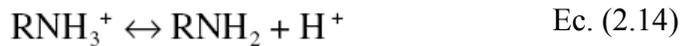


Fig. 2.19. Equilibrio de dióxido de carbono con álcali aminas y formación de carbamato. Supuesto mecanismo de reacción entre CO₂ con aminoácidos y mono etilamina.

En vinos puede haber posibles reacciones entre CO₂ y compuestos tales como nucleófilos. Esta clase de moléculas pueden involucrarse en reacciones con CO₂ gaseoso dando carbamatos (**Fig. 2.19**), e. g., etanolaminas (Danckwerts, 1979).

Por ejemplo en vinos no espumosos, la concentración de aminoácidos libres, especialmente prolina y arginina, incrementa con el tiempo de maduración y son características de algunas uvas.

La prolina está presente en grandes cantidades en *Chardonnay* y arginina en *Pinot Noir*. La serina con estructura química similar a la etanolamina y otros aminoácidos libres se espera se involucre en tales reacciones.

Los dos dispositivos más comunes que se utilizan para el monitoreo de la concentración de CO₂ son el electrodo de Severinghaus (Severinghaus & Bradley, 1958) y el detector infrarrojo. (Munkolm, Walt, & Milanovich, 1988). El electrodo tiene un tiempo de respuesta largo, típicamente de 5-15 min. El detector de absorción infrarroja produce un tiempo de respuesta rápido y el resultado es fiablemente cualitativo, pero; éste es voluminoso y caro, y sólo aplicable a CO₂ gaseoso. Otros dispositivos para medir CO₂ incluyen cromatografía de gases *CG* y espectrometría de masas *EM*. *EM* es capaz de realizar mediciones casi en tiempo real, pero su precio es prohibitivamente alto. *GC*, es más barato, requiere 10-20 min. Para completar el análisis de una muestra y no puede ser utilizado para mediciones en tiempo real. Los detectores de conductividad térmica (Hale, Stehle, & Bals, 1992) registran la diferencia en conductividad entre un gas de referencia (N₂) y CO₂ después de difusión en una cámara de medición. El tiempo de respuesta es muy conveniente para seguir cinéticas de carbonación y el equipo puede ser fácilmente montado sobre ductos de líquidos después de la cámara de mezclado (Barker, Jefferson, & Judd [1999]).

La medición de la concentración de CO₂ en tiempo real durante la carbonatación es un reto real. (Descoins, 2006).

2.6 DETERMINACIÓN DE CO₂ POR OTROS MÉTODOS.

2.6.1 Determinación Directa En soluciones Acuosas Usando Láseres de Cascada Cuántica (QCL) que Emiten en el Infrarojo Medio (MIR).

El CO₂ disuelto en agua da lugar a una fuerte y característica banda de absorción a 2342 cm⁻¹ (Fig. 2.20). Además del agua prácticamente ninguna otra sustancia que esta usualmente presente en líquidos que contienen CO₂ exhibe bandas de absorción en la región del espectro. Esto ofrece la oportunidad de desarrollar un método analítico simple para la determinación de CO₂ en soluciones acuosas basado en espectroscopia de absorción en el infrarojo medio (MIR; por sus siglas en inglés: *Mid-Infrared*). Una dificultad en medir la vibración fundamental del CO₂ para la aplicación del proceso analítico es la fuerte absorción del agua a 2342 cm⁻¹, el cual restringe el trayecto óptico para las mediciones de transmisión de unos pocos micrómetros utilizando las fuentes térmicas de luz convencionales. Siendo una posible solución realizar mediciones a reflexión total atenuada (ATR, por sus siglas en inglés: *attenuated total reflection*). Sin embargo la sensibilidad de la técnica ATR hacia la contaminación de la superficie ATR plantea problemas prácticos y por tanto es de interés en aplicaciones de procesos analíticos. Una salida a este problema sería el uso de una fuente de luz apropiada y de gran alcance que permita las mediciones de transmisión a pasos ópticos extendidos (>100 μm). Recientemente, los láseres de cascada cuántica a temperatura ambiente (QCL, por sus siglas en inglés: *Quantum Cascade Lasers*) se han hecho disponibles para este propósito. Los QCLs son láseres semiconductores que consisten en capas delgadas bien definidas de diferente composición química, dónde la generación de luz se basa en una transición *intersubbanda* dentro de la banda de conducción. El uso de QCL para espectroscopia MIR ha sido principalmente reportada en medidas en fase gas. Sin embargo, la ventaja de QCLs sobre láseres de diodos es también significativa cuando las mediciones se realizan en fase líquida, cómo en análisis de flujo de inyección (FIA) o cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Lendl, 2004).

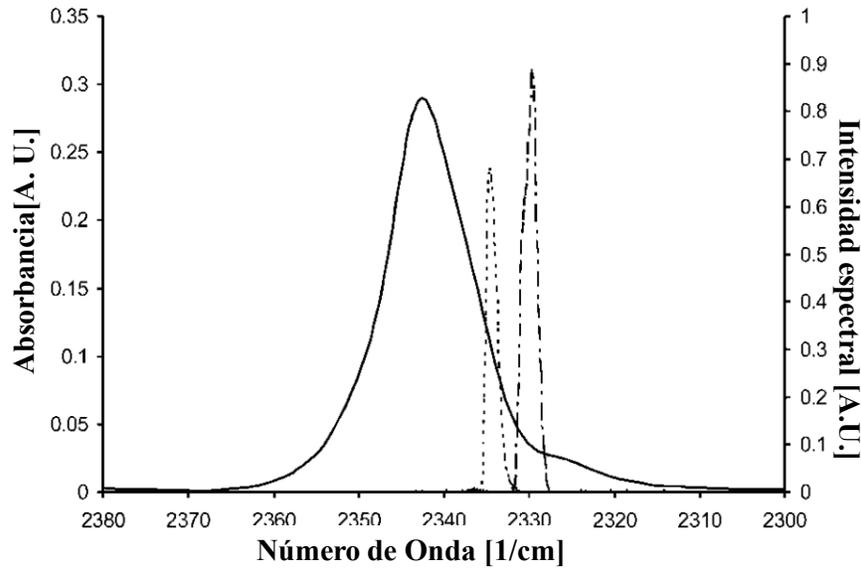


Fig. 2.20. Comparación del espectro de absorción del CO₂ acuoso (1.35g/L) medido en una celda de flujo de referencia de 41 µm contra la celda llena de agua (escala de la izquierda) y el espectro de emisión (escala derecha) del QCL disponible.

2.6.2 Determinación de CO₂ en Diferentes Muestras de Gas Mediante el Uso del Aparato de Orsat

El análisis de los gases se realiza de acuerdo con la ley de Amagat, que establece que en una mezcla gaseosa, la suma de los volúmenes de los componentes es igual al volumen total de la mezcla. Por otra parte existen reactivos químicos que absorben selectivamente, por un proceso de quimisorción, los componentes de la mezcla (Torreguitar, 1968).

Entonces para el biogás se tiene:

$$V = V_{\text{CO}_2} + V_{\text{CH}_4} + V_{\text{otros}} \quad \text{Ec. (2.15)}$$

Ahora, si por medio de un reactivo adecuado se absorbe el CO₂ tendremos:

$$\%V_{\text{CO}_2} = [V - (V_{\text{CH}_4} + V_{\text{otros}})] / V \quad \text{Ec. (2.16)}$$

En el aparato de Orsat (**Fig. 2.21**) esto se realiza sobre un volumen $V = 100 \text{ cm}^3$ que facilita la medición, leyendo directamente el volumen de gas absorbido. El resto (no absorbido) está constituido por metano (CH₄) y los otros gases que supuestamente se encuentran en mucha menor proporción (Yank, 2002).

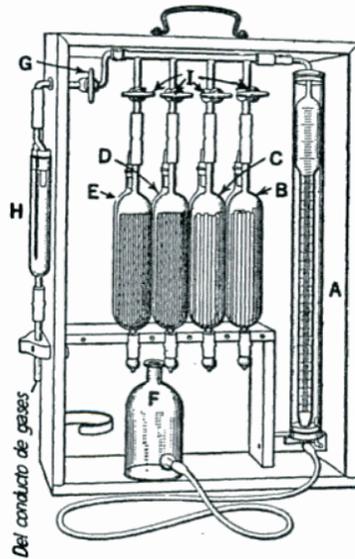


Fig. 2.21. Aparato de Orsat. Bureta de medida A; el frasco nivelador F; el filtro de gas H y las pipetas de absorción B, C, D y E, las cuales se conectan entre sí mediante llaves I (Severns, 2007).

2.6.3 Medición del Flujo de CO₂ en Suelo.

Este método se basa en la capacidad de algunos compuestos alcalinos como el hidróxido de sodio (NaOH), en reaccionar con el CO₂ del aire. Para estas determinaciones se colocan recipientes de plástico boca abajo sobre varios lugares de muestreo para actuar como *cámaras de aire* para recoger el CO₂ del suelo. Se coloca un recipiente más pequeño de NaOH dentro de cada *cámara de aire* para atrapar el CO₂. Este sistema usa las propiedades de ácido débil del CO₂ en una reacción de neutralización ácido-base que produce carbonato:

Ec. (2.17)

Mientras haya un exceso de iones OH⁻ (como resultado de la disociación de NaOH), el equilibrio se desplazará hacia la derecha, produciendo carbonato. Después de un período de incubación, se recoge el NaOH y el carbonato se precipita usando cloruro de bario (BaCl₂) en forma de carbonato de bario (BaCO₃) insoluble. La cantidad de cristales blancos formados es proporcional a la concentración de carbonato presente.



La cantidad de CO₂ absorbida por la solución alcalina se puede medir con una simple valoración (Rochette, 2005).

Tabla. 2.2 Ventajas y desventajas de algunos métodos para la determinación de CO₂. Todas las técnicas presentan diferentes condiciones de trabajo, por lo cual todas serán adecuadas, para el fin que se les requiera.

Técnica para la determinación de CO ₂	Ventajas	Desventajas
✓ Espectrometría en el Infrarrojo medio usando láseres de cascada cuántica.	Llega a medir específicamente. Permite las mediciones de transmisión a pasos ópticos extendidos (>100 μm).	La posible interferencia del agua en 2342 cm ⁻¹ . Pocas referencias en CO ₂ Líquido. Alto costo del equipo.
✓ Determinación de CO ₂ en Diferentes Muestras de Gas Mediante el Uso del Aparato de Orsat	Mide el CO ₂ producido en combustiones o gases. Permite lecturas continuas en instalaciones fijas.	El instrumental es bastante y sofisticado. La muestra puede sufrir contaminaciones dentro del aparato de Orsat (determinación indirecta). No mide CO ₂ en solución.
✓ Medición del Flujo de CO ₂ en Suelo.	Sencillez. Bajo costo	Cuantificación indirecta. Toxicidad del BaCl ₂ . Contaminación de otros carbonatos que no provienen del CO ₂ en la solución y pueden interferir.
✓ Potenciometría con sonda selectiva a gases.	Sencillez. Bajo costo. Determinación de varias muestras en corto tiempo..	Tiempo de respuesta alto. Presenta interferencias. Pretratamiento de la muestra.

2.7 VALIDACIÓN DE MÉTODOS.

Es extraordinaria la evolución tan rápida de la validación de métodos analíticos que se ha dado en la última década. En los 40's se dieron los lineamientos para poder realizar una validación de métodos analíticos y en los 60's se introdujo este concepto a nuestro país

(Lozano C. L., 1998). Desde los últimos 15-20 años, los métodos de validación han estado sujetos a muchas discusiones (Rozet, E., 2011).

La validación de un método es el proceso utilizado para confirmar que el procedimiento analítico empleado para una prueba específica es adecuado para su uso previsto. Los resultados para la validación del método pueden ser utilizados para juzgar la calidad, y consistencia de resultados; es una parte integral de cualquier práctica analítica buena.

Los métodos analíticos necesitan ser validados o revalidados

- Antes de su introducción en uso rutinario;
- Cuando las condiciones cambian por las cuales el método ha sido validado (e. g., un instrumento con diferentes características o muestras con diferente matriz);
- Cuando el método se cambia y el cambio esta fuera del alcance del método.

La validación del método ha recibido considerable atención en la literatura, de comités industriales y agencias regulatorias.

- La Administración de Alimentos y drogas de Estados Unidos (*U. S. FDA* ó *FDA*, por sus siglas en inglés: *United States Food and Drugs Administration*) (*U. S. FDA*, Code of Federal Regulations: 21 CFR 211) solicita en la sección 211.165(e) métodos para ser validados: la exactitud, sensibilidad, especificidad y reproducibilidad de las pruebas del método empleado por la empresa deberá establecerse y documentarse. Tal validación y documentación puede ser consumada de acuerdo con la Sección 211.194(a). Estos requerimientos incluyen una declaración de cada método usado en la prueba de la muestra para conocer las propiedades de los estándares o la precisión y confiabilidad, tal como se aplica al producto a prueba. La *U. S. FDA* también ha propuesto una orientación para la industria para Validación de Métodos y Procedimientos Analíticos. (*U. S. FDA*, 2000).
- La norma ISO/IEC 17025 incluye un capítulo sobre la validación de métodos (ISO/IEC 17025, 2005) con una lista de nueve parámetros de validación. La

Conferencia Internacional sobre la Armonización (*ICH*, por sus siglas en inglés: *International Conference on Harmonization*) (*ICH*, 1996a) ha desarrollado un texto de consenso sobre validación y procedimientos analíticos. El documento incluye definiciones para ocho características (parámetros) de validación; Especificidad, Linealidad, Límite de cuantificación, Límite de detección, Rango, Exactitud, Precisión (Repetibilidad, Precisión Intermedia, Reproducibilidad) y Robustez. *ICH* también desarrolló una guía con metodología detallada (*ICH*, 1996b).

- La *U. S. EPA* preparó una guía para el desarrollo y validación de métodos para la Ley de Conservación y Recuperación (*RCRA*, por sus siglas en inglés: *Resource Conservation and Recovery Act*) (*RCRA*, 1995). La Asociación Oficial de Químicos Analistas o La Asociación de Comunidades Analíticas (*AOAC* por sus siglas en inglés: *Association of Official Analytical Chemists* frecuentemente llamada también *The Association Of Analytical Communities*), la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (*U. S. EPA*, por sus siglas en inglés: *United States Environmental Protection Agency*) y otras organizaciones científicas proveen métodos que son validados mediante estudios multi-laboratorios.

La Convención de la Farmacopea de los Estados Unidos (*USP*, por sus siglas en inglés: *The United States Pharmacopeial Convention*), ha publicado guías específicas para validación de métodos para la evaluación de compuestos (*USP*, 2007). La *USP* define ocho pasos para la validación:

- Exactitud
- Precisión
- Especificidad
- Límite de detección
- Límite de cuantificación
- Linealidad y rango
- Solidez
- Robustez

La *U. S. FDA* también ha publicado una guía para la validación de métodos bioanalíticos (U.S. FDA - Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, 2001). El documento más completo es el informe de la conferencia de Washington en 1990: Validación de Métodos Analíticos: Estudios de Biodisponibilidad, Bioequivalencia y Farmacocinética, el cual fue patrocinado, entre otros; por La Asociación Americana de Científicos Farmacéuticos (AAPS, por sus siglas en inglés: *the American Association of Pharmaceutical Scientists*), la *AOAC* y la *U. S. FDA*. El informe presenta principios guías para los estudios de validación de humanos y animales. El informe también ha sido usado como una base para el documento de la guía industrial de la *U. S. FDA* (U.S. FDA - Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, 2001).

Representantes de la industria farmacéutica y química han publicado artículos de métodos de validación. Hokanson (G. C. Hokanson, 1994 parte I; G. C. Hokanson, 1994b parte II) aplicó el enfoque de ciclo de vida, desarrolló sistemas computarizados para la validación y revalidación de métodos. Green (J. M. Green, 1996) dio una guía práctica para validación de métodos, con una descripción de un conjunto de requerimientos mínimos para un método. Renger y sus colegas (B. Renger, *et al*, 1995) describieron la validación de un procedimiento analítico específico para el análisis de teofilina en una tableta usando Cromatografía en Capa Fina de Alta Resolución (HPTLC, por sus siglas en inglés: *High-Performance Thin Layer Chromatography*). El procedimiento de validación en este artículo en particular se basa en requisitos para el registro de la Unión Europea multiestatal (Huber L., 2007)

Wegscheider (Wegscheider, 1996) ha publicado procedimientos para la validación de métodos con un enfoque especial en calibración, experimentos de recuperación, comparación de métodos e investigación en solidez. Seno *et al*, (Seno S., 1997) han descrito como los métodos analíticos son validados en un laboratorio de control de calidad (QC, por sus siglas en inglés: Quality Control) japonés. La *AOAC* (AOAC, 1998) ha desarrollado un programa de validación de métodos *verificado por pares* (Peer-Verified), con guía detallada sobre cuales parámetros exactamente deben ser validados. Winslow y Meyer (Winslow P. A., 1997) recomendaron la definición y aplicación de un plan maestro para validar métodos analíticos. J. Breaux y colegas han publicado un estudio sobre el

desarrollo de métodos analíticos y validación (Breux J., 2003). El punto clave es el desarrollo de métodos para fácil validación y revalidación. Krause publicó una guía para transferir métodos analíticos, comparabilidad, mantenimiento y criterios de aceptación para la prueba de biofarmacéuticos (Krause S.O., 2006).

Este manual ofrece una revisión y estrategia para la validación de métodos analíticos tanto para desarrollo de métodos como también métodos estándar y una recomendación sobre la documentación que debe ser producida durante y en la terminación del método de validación. También describe que es importante cuando se transfiere un método.

2.7.1 ¿Por qué es necesaria la validación del método?

La validación de un método es un requisito importante en la práctica del análisis químico. Sin embargo, la percepción de su importancia, *¿por qué debe hacerse?*, *¿cuándo?*, y exactamente *¿qué necesita hacerse?*, parece ser deficiente entre los químicos analíticos. En la literatura técnica ya hay mucha información relacionada a la validación de métodos, especialmente a métodos específicos, pero muy frecuentemente es subutilizada (Eurachem, 1998). Algunos analistas ven la validación de métodos como algo que sólo puede hacerse en colaboración con otros laboratorios y por consiguiente no la realizan (Eurachem, 1998).

Muchos aspectos de la sociedad, están virtualmente apoyadas de algún modo por mediciones analíticas. Por lo tanto es importante determinar el resultado correcto y ser capaz de demostrar que lo es. La validación del método permite a los químicos demostrar que el método es *adecuado para su propósito*. Para que un resultado concuerde con el propósito requerido, debe ser lo suficientemente confiable para que cualquier decisión basada en éste pueda tomarse con confianza. Así el desempeño del método debe validarse y debe estimarse la incertidumbre del resultado a un nivel de confianza dado. La incertidumbre deberá ser evaluada y establecida de una forma que sea ampliamente reconocida, consistente de forma interna y fácil de interpretar. La mayor parte de la información requerida para evaluar la incertidumbre se puede obtener durante la validación del método (Eurachem, 1998).

Un método debe validarse cuando sea necesario verificar que sus parámetros de desempeño son adecuados para el uso en un problema analítico específico, por ejemplo; un nuevo método desarrollado para un problema específico, un método establecido usado en un laboratorio diferente o con diferentes analistas o con diferente instrumentación, etc. Siempre es apropiado algún grado de validación, aun cuando se usan métodos aparentemente bien caracterizados ya sean de referencia o publicados (Eurachem, 1998).

La aceptación o no, de los métodos validados por un solo laboratorio con propósito de normalización dependerá de los lineamientos que cubren el área de medición concerniente. Los diferentes parámetros de desempeño de un método generalmente son: 1) Límite de detección, 2) Límite de cuantificación, 3) Linealidad, 4) Exactitud, 5) Precisión, 6) Robustez, 7) Especificidad, 8) Sensibilidad; y según la aplicación analítica del método se elijen los parámetros (Eurachem, 1998).

2.7.2 Parámetros de Desempeño.

2.7.2.1 Límite de Detección (LD).

Cuando se realizan mediciones a niveles bajos del analito o de la propiedad relacionada, como en el análisis de trazas, es importante saber cuál es la concentración más baja del analito o el valor de su propiedad relacionada, que puede detectarse confiablemente por el método. Surge confusión debido a que no existe actualmente un acuerdo universal sobre la terminología aplicada.

La ISO utiliza como un término general *valor mínimo detectable de la variable de estado definida* el cual en química se traduce como la *concentración neta mínima detectable* (ISO 11843-1:1997). La IUPAC es cautelosa en el uso de *límite de detección* prefiriendo *valor (verdadero) mínimo detectable* (IUPAC Recommendations 1995).

Además la IUPAC en las recomendaciones para la nomenclatura para electrodos selectivos a iones (ISEs) (IUPAC Recommendations 1994); define al límite de detección, por analogía con las definiciones adoptadas en otros campos, cómo la concentración por la cual, bajo

condiciones especificadas, la fuerza electromotriz (*fem* o *E*) de celda, se desvía del valor de *fem* promedio en la región I (**Fig. 2.22**) por un múltiplo del error estándar de una sola medición de *fem* en esta región I. El múltiplo seleccionado depende de un nivel de significancia estadística. La fundamental diferencia en la naturaleza de la potenciometría ISE (su respuesta logarítmica) comparada a métodos lineales, justifica otro tipo de definición de LD. En aras de la conveniencia práctica, una definición más simple (y más conveniente) es recomendada en este momento, el límite de detección práctico más bajo puede ser tomado como la actividad (o concentración) de la sustancia A en el punto de intersección del rango medio extrapolado y el segmento de la curva de calibración a bajas concentraciones, como se muestra en la **Fig. 2.21**. (IUPAC Recommendations 1994.)

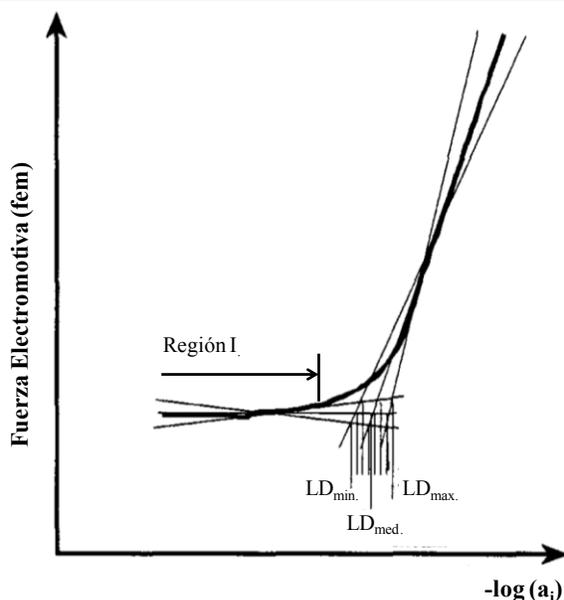


Fig. 2.22. Determinación del límite de detección (LD) de electrodos selectivos a iones por el método de punto de cruce (*cross point*). ($LD_{med.}$ es el valor más probable para el LD determinado por el punto de cruce de las líneas situadas en los segmentos lineales de la curva de *fem* contra $-\log a_i$ donde a_i denota la actividad individual del ión primario, i . El $LD_{min.}$ y $LD_{max.}$ Son el más bajo y el más alto valor determinado como el LD teniendo en cuenta el mínimo y el máximo valor de pendiente (95% de valores de confianza) de las líneas situadas al dato experimental.)

Cabe resaltar que en el compendio de tecnología química de la IUPAC de 1985 se define ‘El límite de detección, expresado como la concentración C_L , o la cantidad Q_L , se deriva de la medida más pequeña X_L , que puede detectarse con certeza razonable por un procedimiento analítico dado. El valor de X_L es dado por la ecuación:

$$X_L = X_{bl} + kS_{bl}$$

Donde X_{bl} es la media de las mediciones del blanco y S_{bl} la desviación estándar de las mediciones del blanco y k es un factor numérico elegido de acuerdo al nivel de confianza deseado. Normalmente, para propósitos de validación es suficiente proporcionar un indicativo del nivel al cual la detección resulta problemática. Para este propósito la aproximación “blanco +3S” usualmente será suficiente. (Eurachem 1998).

En este trabajo se determinará el Límite de Detección conforme lo estipulan las recomendaciones de la IUPAC para electrodos selectivos de iones.

2.7.2.2 Límite de Cuantificación (LC).

El límite de cuantificación (LC) estrictamente es la concentración más baja del analito que puede ser determinada con un nivel aceptable de precisión de repetibilidad y veracidad (Eurachem. 1998).

La habilidad para cuantificar se expresa generalmente en términos de la señal o valor (verdadero) del analito que producirá estimaciones con una desviación estándar relativa (RSD) especificada, comúnmente del 10%. Así:

$$L_Q = k_Q \sigma_Q$$

Dónde L_Q Límite de Cuantificación, σ_Q es la desviación estándar en ese punto, y k_Q es el multiplicado cuyo recíproco es igual a la RSD seleccionada y cuantificada. El valor por omisión de k_Q propuesto por la IUPAC es de 10 (Eurachem, 1998)

Para ISEs; en este caso la sonda selectiva a CO₂, el LC puede definirse como el contenido igual o mayor que el menor punto de concentración en la curva de calibración. Límite más bajo de una respuesta nernstiana (en el intervalo lineal), el cual es el menor punto útil para realizar determinaciones (Evans, 1987).

En este trabajo se determinará el límite de cuantificación como se ha recomendado para electrodos selectivos de iones.

2.7.2.3 Linealidad.

Define la habilidad del método para obtener resultados de la prueba proporcionales a la concentración del analito. Se deduce que el intervalo lineal *es el intervalo de concentración del analito dentro del cual los resultados de prueba obtenidos por el método son proporcionales a la concentración del analito.* (AOAC International, 1994).

2.7.2.4 Exactitud.

Es la proximidad de concordancia entre el resultado de una medición y el valor de referencia aceptado. El término exactitud cuando se aplica a una serie de resultados de prueba, involucra una combinación de componentes aleatorios y una componente de error sistemático o sesgo. (ISO 3534-1:1993)

La cantidad referida a las diferencias entre la media de una serie de resultados o un resultado individual y el valor el cual se acepta como valor verdadero o correcto para la cantidad medida. (IUPAC Compendium of Chemical Technology, 1987).

2.7.2.5 Precisión.

Es la proximidad de concordancia entre los resultados de pruebas independientes obtenidos bajo condiciones estipuladas. La precisión depende sólo de la distribución de los errores aleatorios y no se relaciona con el valor verdadero o valor especificado. La medida de la precisión generalmente se expresa en términos de imprecisión y se calcula como una desviación estándar de los resultados de la prueba. *Resultados de prueba independientes* significa que los resultados fueron obtenidos de tal forma que no son influenciados por cualquier otro resultado previo sobre el mismo o similar objeto de prueba. Las mediciones cuantitativas de la precisión dependen en forma crítica de las condiciones estipuladas. La *Repetibilidad* (*r*) y la *Reproducibilidad* (*R*) son series particulares de condiciones extremas (ISO 3534-1:1993).

2.7.2.5.1 Repetibilidad (r):

Precisión en condiciones de repetibilidad, es decir, condiciones según las cuales los resultados independientes de una prueba se obtienen con el mismo método, sobre objetos de prueba idénticos, en el mismo laboratorio, por el mismo operador, usando el mismo equipo y dentro de intervalos de tiempo cortos. (ISO 3534-1:1993). En resultados de mediciones es la proximidad de concordancia entre los resultados de mediciones sucesivas del mismo mensurando realizadas bajo las mismas condiciones de medición. (Eurachem, 1998). En un instrumento de medición es la aptitud de un instrumento de medición para proporcionar indicaciones muy semejantes entre sí por aplicaciones repetidas del mismo mensurando bajo las mismas condiciones de medición. (Eurachem, 1998)

2.7.2.5.2 Reproducibilidad (R).

Precisión bajo condiciones de reproducibilidad, es decir, condiciones según las cuales los resultados de prueba se obtienen con el mismo método, sobre objetos de prueba idénticos, en diferentes laboratorios, por diferentes operadores, usando diferentes equipos (dependiendo del estudio o método a validar). Una definición válida de reproducibilidad requiere que se especifiquen las condiciones de prueba modificadas. La reproducibilidad puede expresarse cuantitativamente en términos de la dispersión de los resultados. (ISO 3534-1:1993).

2.7.2.6 Especificidad.

La capacidad de un método para determinar exactamente y específicamente el analito de interés en presencia de otros componentes en una matriz de muestra bajo las condiciones de prueba establecidas (Eurachem, 1998).

2.7.2.7 Sensibilidad.

El cambio en la respuesta de un instrumento de medición dividido por el correspondiente cambio del estímulo. El estímulo puede ser por ejemplo, la cantidad del mensurando

presente. La sensibilidad puede depender del valor de estímulo. Aunque esta definición se aplica claramente a un instrumento de medición, también puede aplicarse al método analítico como un todo, tomando en cuenta otros factores tales como el efecto de los niveles de concentración (Eurachem, 1998).

La respuesta nernstiana, implica una sensibilidad ideal. La respuesta nernstiana se revela cuando una curva de la diferencia de potencial (E) de la celda del ISE (electrodo, con un electrodo de referencia exterior) contra el logaritmo de la actividad iónica de una especie dada (a_A) es lineal con una pendiente de $2.303RT/z_A F$ (59.16/ z_A mV por unidad de cambio o pa_A a 298.15K) (*Pure & appl. Chem.* 1994).

2.8 CURVA DE ADICIONES PATRÓN EN UNA Sonda SELECTIVA A GASES.

El método de adiciones patrón consiste en añadir cantidades conocidas de analito al problema, cuyo contenido en analito se quiere determinar. A partir del aumento de señal se deduce cuánto analito había en la muestra problema. Este método requiere una respuesta lineal frente al analito. La adición de patrón es especialmente apropiada cuando la composición de la muestra es desconocida o compleja y afecta a la señal analítica. Dentro del método de adiciones patrón se encuentran dos maneras para llevarla a cabo a) Volumen Constante; donde se agrega volúmenes iguales de la muestra problema y a continuación se añaden volúmenes crecientes de patrón a cada matraz, para finalmente, diluir cada matraz al enrase (**Fig. 2.23**), y b) Volumen Variable; donde se tiene un volumen de concentración desconocida de analito y a la cual se le agregan pequeñas cantidades de una solución estándar, realizando mediciones a cada adición de estándar (Harris, D. C., 1999).

Debido a que en este trabajo se hace uso de una sonda sensible a gases (la cual tiene gran similitud con un ISE), la respuesta del analito es directamente proporcional al logaritmo de la concentración, además debido a que se realizará en una matriz de la cual no se conocen sus componentes será necesario utilizar una curva de adiciones patrón.

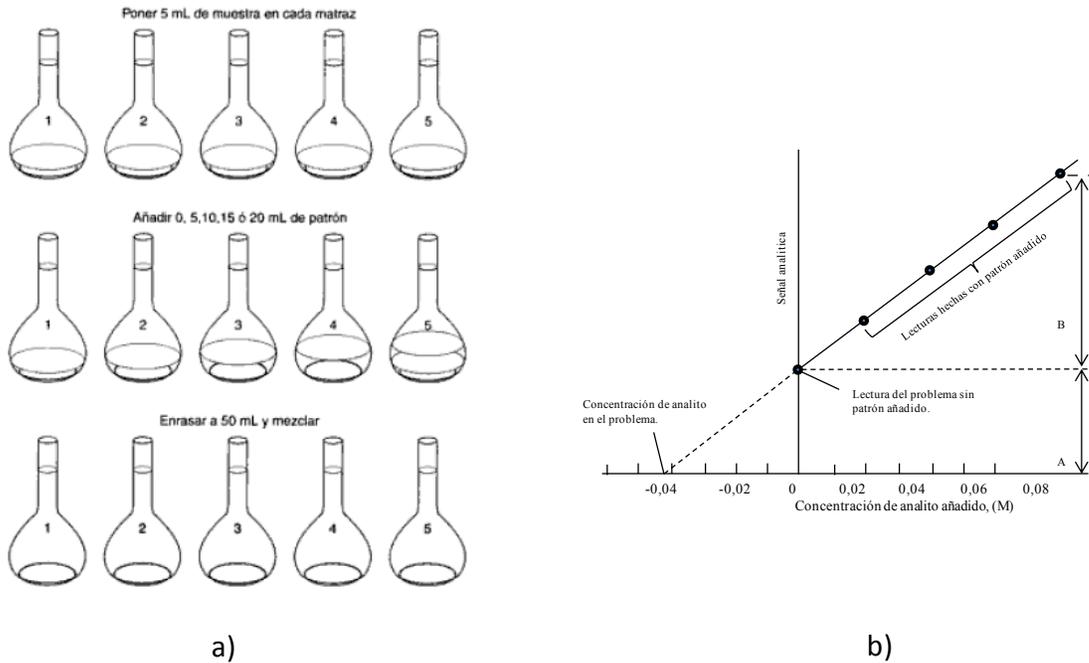


Fig. 2.23. a) Análisis aplicando el método de adiciones patrón a volumen constante. Suponga que la disolución que se añade a cada frasco contiene patrón 0.200 M. Al final del procedimiento, al frasco 1 no se añadió patrón. El frasco 2 contiene patrón 0.0200 M (es decir, 5.00 mL. diluidos a 50.0 mL). Los matraces 3, 4 y 5 contienen 0.0400, 0.0600 y 0.0800 M de patrón, respectivamente. b) Tratamiento gráfico de la experiencia de adición patrón. Las adiciones de patrón deben aumentar la señal analítica entre 1,5 y 3 veces el valor original (es decir, B= de 0,5A a 2A.).

Por lo cual el método gráfico de adiciones patrón para electrodos selectivos, en este caso una sonda, se basa en la ecuación de la respuesta de la misma (Guofeng Li; 2000 y Harris, D. C., 1999).

Se comienza con la ecuación de una curva de calibración normal para la sonda, donde; E es el potencial obtenido, S la pendiente y C es la concentración.

$$E = K + S \log C \quad \text{Ec. (2.19)}$$

Donde (C_{desc} : Concentración desconocida del analito; V_0 : volumen de alícuota; C_{std} : Concentración conocida o agregada de cada estándar; V_{std} : Volumen de estándar conocido o agregado de cada estándar)

$$C = \frac{C_{desc}V_0 + C_{std}V_{std}}{V_0} \quad \text{Ec. (2.20)}$$

Sustituyendo se tiene;

$$S = 10^{\frac{E-K}{S}} V_0 \quad \text{Ec. (2.21)}$$

Haciendo un despeje de la ecuación y aplicando antilogaritmo;

$$S = 10^{\frac{E-K}{S}} V_0 \quad \text{Ec. (2.22)}$$

$$10^{\frac{E-K}{S}} = \frac{S}{V_0} \quad \text{Ec. (2.23)}$$

$$V_0 10^{\frac{E-K}{S}} = C_{desc} V_0 + C_{std} V_{std} \quad \text{Ec. (2.24)}$$

Ahora, si se desea remover algún efecto que relaciona parte del analito, necesitamos dividir la respuesta con adición estándar por la respuesta sin adición estándar;

$$\frac{V_0 10^{\frac{E-K}{S}}}{V_0 10^{\frac{E-K}{S}}} = \frac{C_{desc} V_0 + C_{std} V_{std}}{C_{desc} V_0} \quad \text{Ec. (2.25)}$$

Nuevamente la ecuación se despeja;

$$10^{\frac{E-K}{S}} = 1 + \frac{C_{std} V_{std}}{C_{desc} V_0} \quad \text{Ec. (2.26)}$$

Ya que puede utilizarse cualquier unidad de concentración como $C_{std} V_{std}$ en el eje de las x y $C_{desc} V_0$ como la concentración del problema, en este trabajo se utilizará C_{std} y C_{desc} en partes por millón: *ppm*; respectivamente por lo que:

$$10^{\frac{E-K}{S}} = 1 + \frac{C_{std}}{C_{desc}} \quad \text{Ec. (2.27)}$$

Obteniendo finalmente una ecuación de la forma $y=b+mx$, donde E' es la respuesta de la cantidad x de estándar agregado (E es la respuesta cuando no se ha agregado estándar $C_{std}=0$). La pendiente de esta línea será $m=1/C_{desc}$. Si se desea usar el enfoque más tradicional de la adición estándar usando la intersección en el eje x , entonces cuando $y=0$, la intersección será en $x=-b/m$. (Zellmer, 1999).

Capítulo 3: MATERIALES, REACTIVOS QUÍMICOS Y METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

3.1 MATERIALES

- ❖ Electrodo para dióxido de carbono *51 341 200*. Marca Mettler Toledo.
- ❖ Kit de membranas con solución de electrolito de CO₂ de llenado. Marca Mettler Toledo.
- ❖ Potenciómetro *SevenMulti S47-dual pH/conductividad*. Marca Mettler Toledo.
- ❖ Unidad de Expansión para conductividad, para potenciómetro *SevenMulti*. Marca Mettler Toledo
- ❖ Cable de conexión tipo *AS7*, con especificaciones para el electrodo o sonda de uso. Marca Mettler Toledo
- ❖ Fuente de alimentación de 9Vdc 7W, para potenciómetro *SevenMulti*.
- ❖ Agitador magnético *LAB DISC SI*. Marca IKA.
- ❖ Barras magnéticas
- ❖ Vasos de precipitados. Marca Pyrex(30, 50, 100, 250 mL)
- ❖ Matraces aforados. Marca Pyrex(50, 100, 250 mL)
- ❖ Pipetas volumétricas. Marca Pyrex(1, 5, 10, 15 mL)
- ❖ Micropipetas. Marca Thermo Scientific (200 µL, 1000 µL, 5mL)
- ❖ Espátula
- ❖ Pizeta
- ❖ Puntas para micropipeta
- ❖ Soporte para electrodos *Seven*. Marca Mettler Toledo
- ❖ Celda termostataada
- ❖ Termómetro. Marca Brannan
- ❖ Baño Recirculador con enfriamiento
- ❖ Mangueras
- ❖ Parafilm®

3.2 REACTIVOS QUÍMICOS

NaHCO₃ (Bicarbonato de Sodio, polvo), Peso fórmula: 84.01 uma.

Ensayo: 100.3%; Marca 'Baker Analyzed'.

HOC(COONa)(CH₂COONa)₂•2H₂O (Citrato de Sodio, Dihidrato, Granular), Peso formula: 294.10 uma. Ensayo:99.2%; Marca 'Baker Analyzed'

HCl (Ácido Clorhídrico), Peso fórmula: 36.46 uma.

Ensayo: 36.5% Marca 'Química Meyer'.

NaCl (Cloruro de Sodio), Peso fórmula: 58.4 uma.

Ensayo: 100% Marca 'Reactivos y Productos Químicos Finos S. A. de C. V.'

NaOH (Hidróxido de Sodio), Peso fórmula: 40.00 uma.

Ensayo: 98.6% Marca 'Química Meyer'.

Agua desionizada

Resistividad: 18.2 MΩ•cm

Marcas de muestras comerciales de refrescos de 600 mL en plástico *PET*.

Coca-Cola, Coca-Cola Light, Coca-Cola Zero, Coca-Cola Light sin Cafeína, Pepsi, Pepsi Light, Pepsi Max, Pepsi Kick, Diet Rite Cola, Red Cola Light Pepsi Light, Red Cola, Red Cola Light, y Peñafiel sabor Fresa.

3.3 Cuidados del electrodo.

Antes de preparar el electrodo de CO₂ para su uso, preparar una solución 0.1 M de NaCl.

Remover la capa hidratante (**Fig. 3.1**) y enjuagar el electrodo integrado de pH con agua desionizada.

Rellenar el modulo de la membrana con 15 gotas o de 0.8 a 1 mL. de solución de electrolito que contiene menos del 1% de NaCl y menos del 1% de NaHCO₃, remover las burbujas adheridas a las paredes golpeando ligeramente con los dedos. Atornille el modulo de la membrana al cuerpo del electrodo (**Fig. 3.1**) y sumerja el electrodo a la solución 0.1M de NaCl al menos 30 minutos antes de trabajar para precondicionarlo entre más tiempo se deje en la solución de NaCl se esperaran mejores resultados.

La membrana permeable al gas o la membrana del electrodo integrado de pH no deben ser tocadas con los dedos.

Cuando el electrodo no esté en uso debe guardarse inmerso en una solución 0.1M de NaCl, al menos por unos días. Para periodos más largos, el modulo de la membrana se remueve y el electrodo de pH se enjuaga con agua desionizada. Llenar la tapa hidratante con agua desionizada y ajustar al electrodo de pH integrado. Se guarda posteriormente en el empaque original por tiempo indefinido.

El electrodo no debe sumergirse a una profundidad mayor que el modulo de la membrana o a más de 6 cm o menor de 2.5 cm.

Después de adicionar la solución amortiguadora el pH debe ser menor de 4.8.

Todas las mediciones deben llevarse a cabo bajo las mismas condiciones de agitación e idénticas barras magnéticas.

Cuando se calibre por primera vez al menos se deben usar 3 puntos de calibrado (*Carbon Dioxide Electrode. Instruction manual, 2011*).

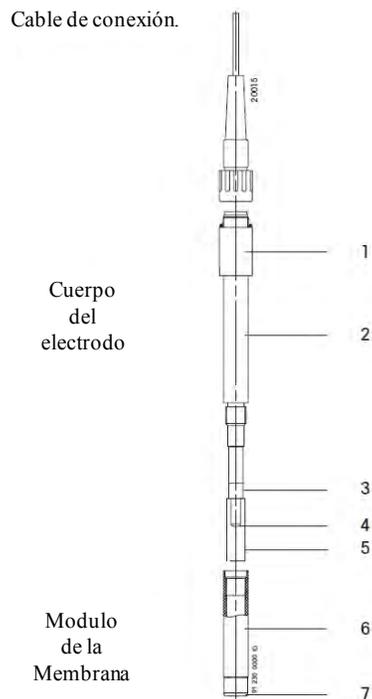


Fig 3.1. Electrodo Selectivo de CO₂, partes que lo conforman: 1. Tapón de rosca, 2. Cuerpo del electrodo de plástico, 3 y 4. Electrodo de referencia Ag/AgCl y membrana de vidrio para pH, 5. Tapa hidratante, 6. Modulo del cuerpo de plástico, 7. Membrana gas-permeable (micro-poro).

3.4 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.

3.4.1 Validación del Método

Linealidad, Límite de detección (LD) y Límite de cuantificación (LC).

Preparación de NaHCO₃ sólido a peso constante.

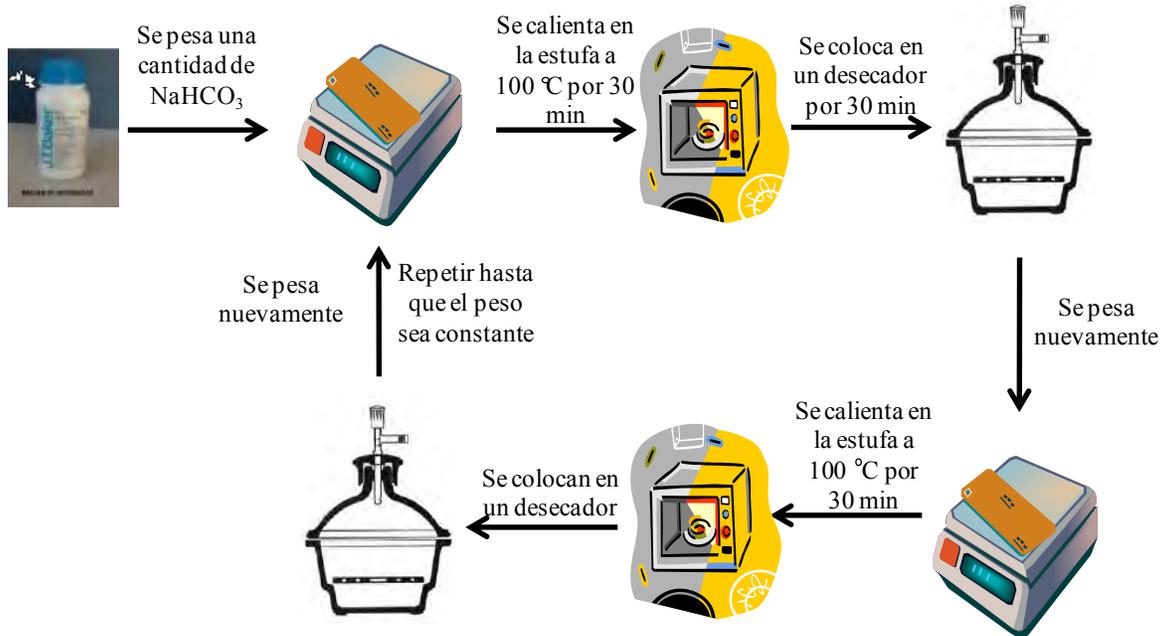


Fig. 3.2. Diagrama de flujo de cómo se llevó a peso constante el NaHCO₃.

Preparación de soluciones.

- Soluciones estándar de CO₂ a partir de NaHCO₃.

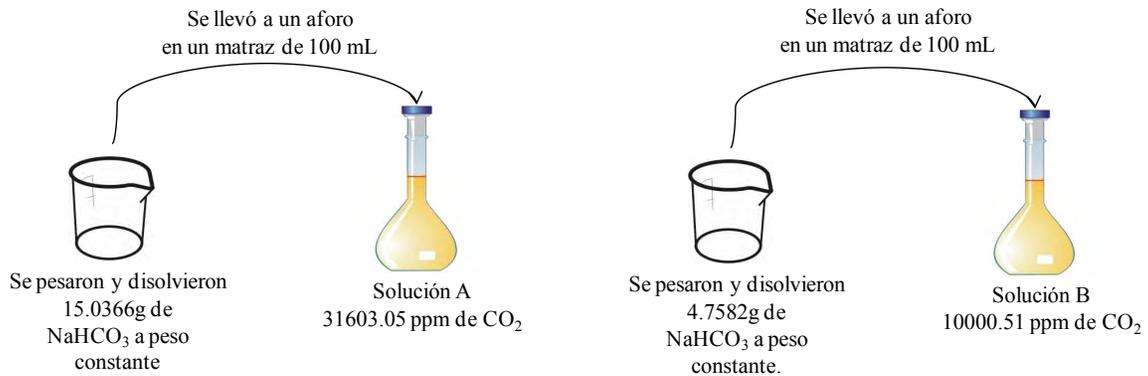


Fig. 3.3. Preparación de la soluciones *madre* (solución A y B), con las que fue posible preparar todo el conjunto de estándares. La ecuación 2.6 se utiliza para los cálculos estequiométricos.

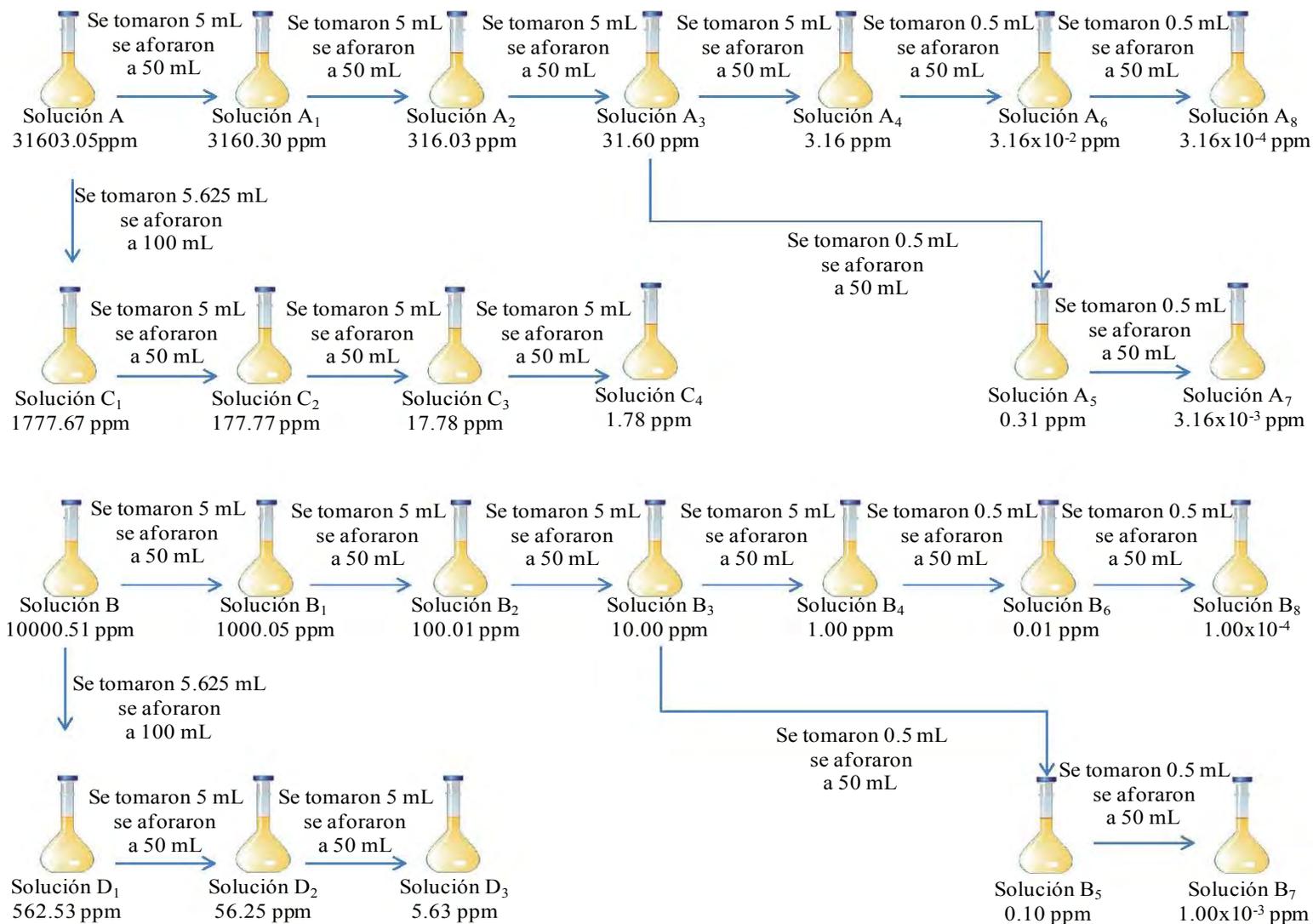


Fig. 3.4. Diagrama que muestra la preparación de cada estándar, a partir de las soluciones A y B, así como la concentración a la que fueron preparadas.

Solución amortiguadora de Citratos pH = 4.5.

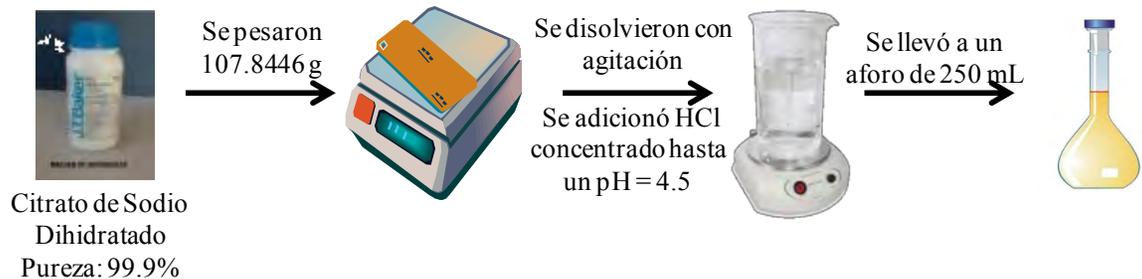


Fig. 3.5. Preparación de la solución amortiguadora de Citratos a pH = 4.5.

Determinación de la respuesta analítica.

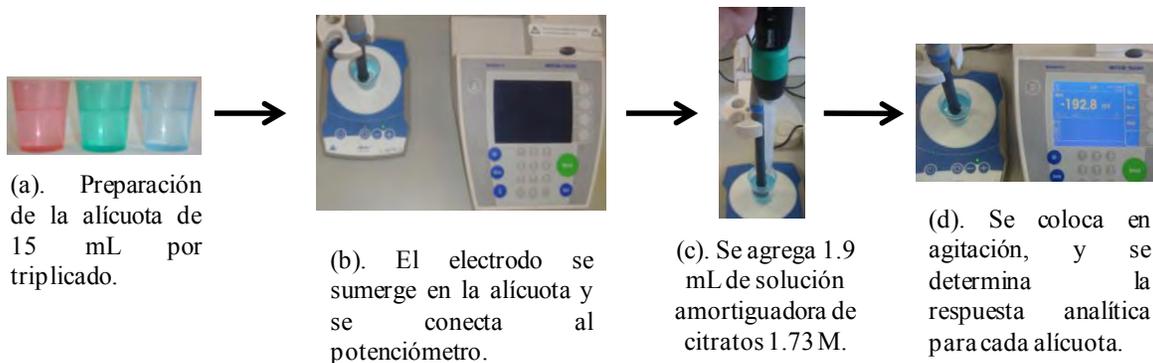


Fig. 3.6. Determinación de la respuesta analítica para cada concentración para la determinación de: Linealidad, LD y LC. Nota: Las determinaciones se realizaron de la concentración más diluida a la más concentrada por triplicado.

Precisión (Repetibilidad y Reproducibilidad).**Preparación de soluciones.**

- Soluciones estándar de CO₂ a partir de NaHCO₃
 - Se sometió una cantidad de NaHCO₃ a calentamiento (100°C) y se llevó a peso constante (**Fig. 3.2**).

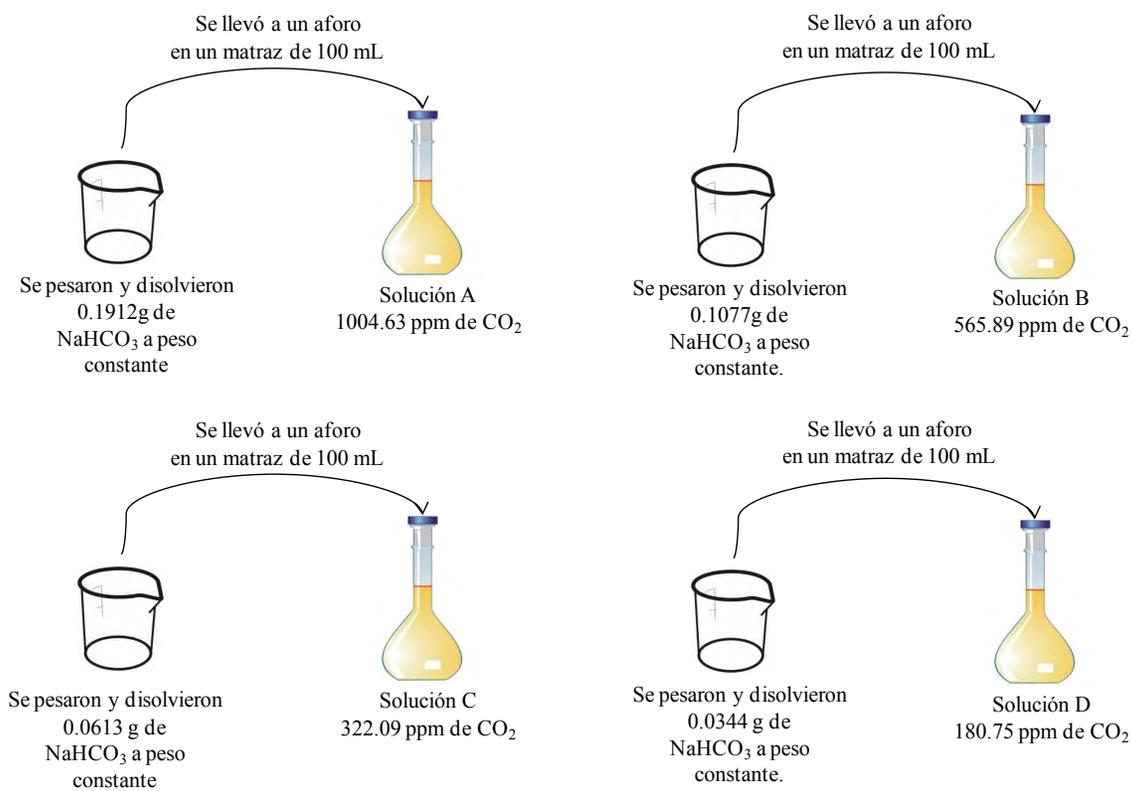


Fig. 3.7. Preparación de las soluciones madre de CO₂ en partes por millón (ppm) y por pesadas independientes, a partir de NaHCO₃ llevado a peso constante.

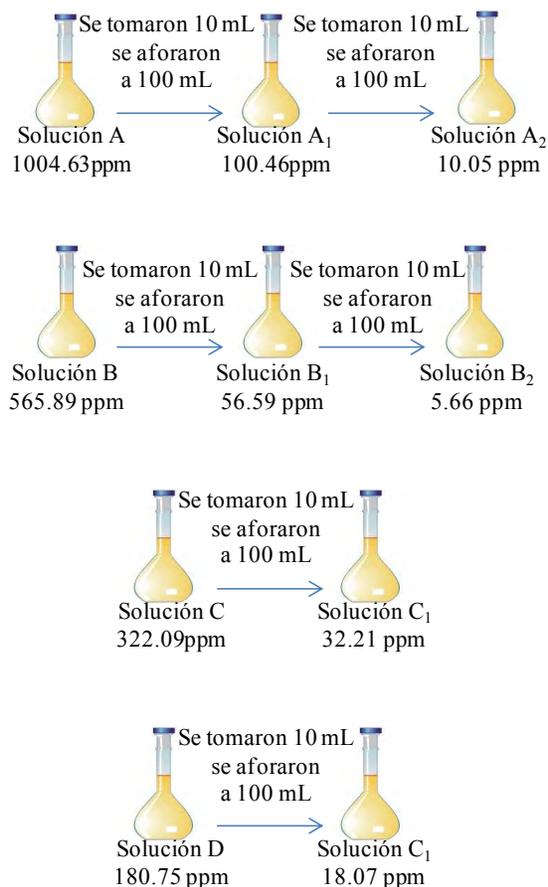


Fig. 3.8. Preparación de las soluciones de CO₂ en partes por millón (ppm) por diferentes diluciones a partir de las soluciones madre A, B, C y D. Teniendo así 10 niveles diferentes de concentración.

Determinación de la respuesta analítica.

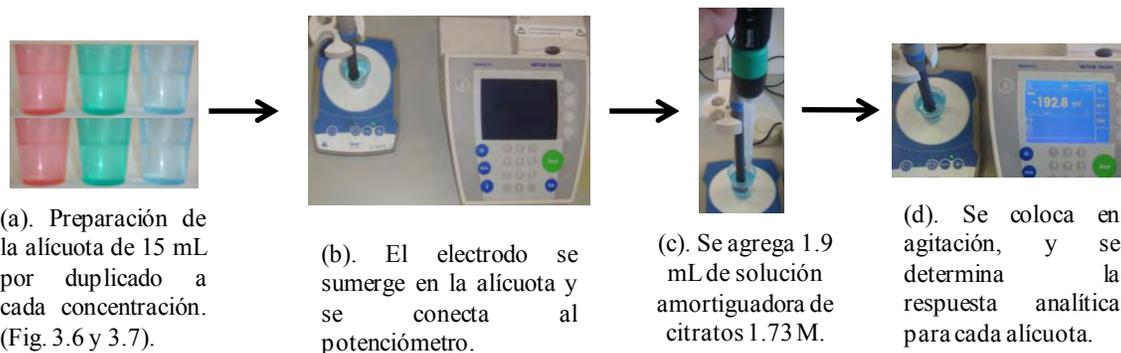


Fig. 3.9. Determinación de la respuesta analítica para la determinación de: Precisión. Nota: Las determinaciones se realizaron de la concentración más diluida a la más concentrada, por tres analistas diferentes, realizando un total de 6 determinaciones para cada estándar; 2 repeticiones de cada estándar por cada analista.

Sensibilidad.**Preparación de Soluciones.**

- Soluciones estándar de CO₂ a partir de NaHCO₃
 - Se sometió una cantidad de NaHCO₃ sólido a calentamiento (100°C) y se llevó a peso constante (**Fig. 3.2**).

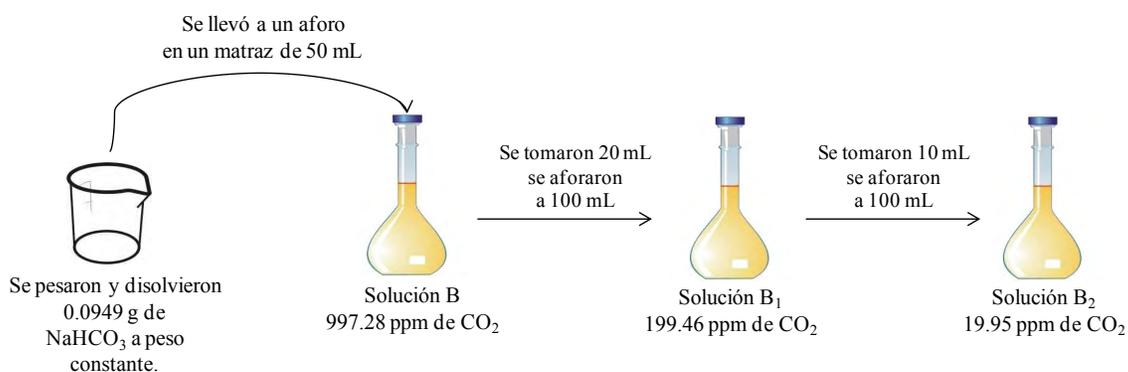


Fig. 3.10. Preparación de 2 diferentes soluciones para la prueba de sensibilidad.

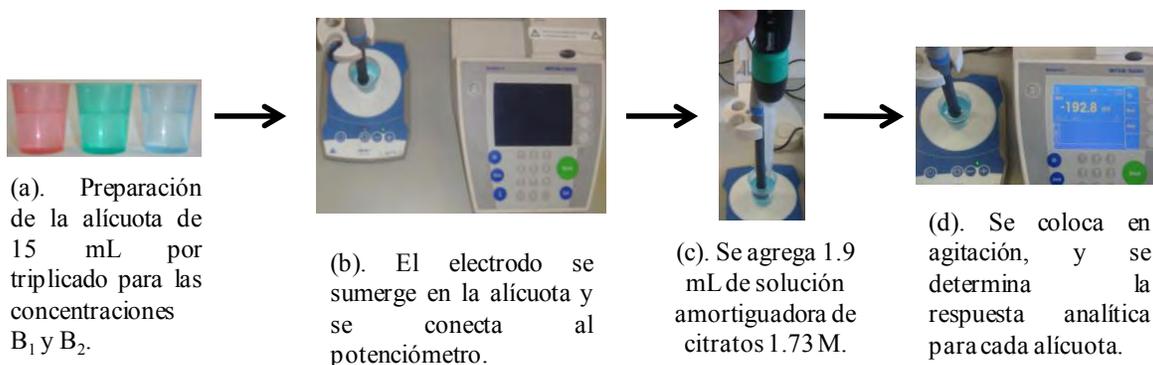
Determinación de la respuesta analítica.

Fig. 3.11. Determinación de la respuesta analítica para la determinación de: Sensibilidad. Nota: Las determinaciones se realizaron de la concentración más diluida a la más concentrada, por triplicado.

Exactitud.**Preparación de Soluciones.**

- Soluciones estándar de CO₂ a partir de NaHCO₃
 - Se sometió una cantidad de NaHCO₃ sólido a calentamiento (100°C) y se llevó a peso constante (**Fig. 3.2**).

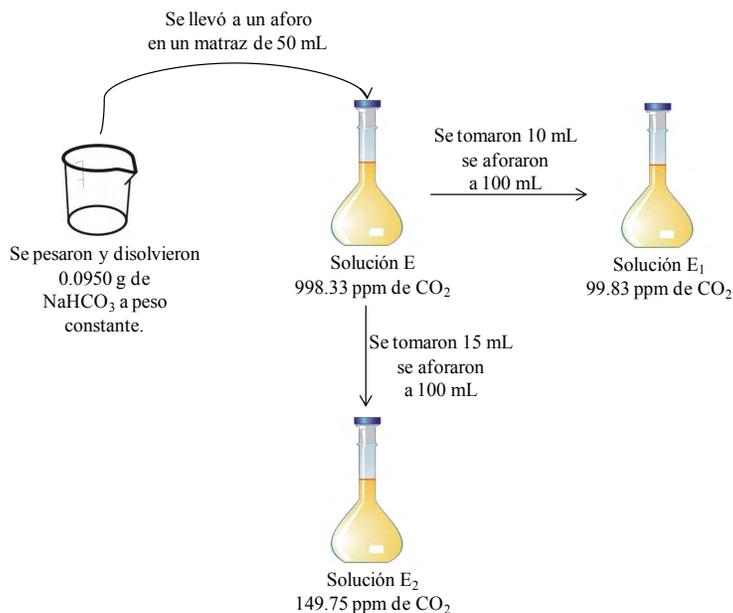


Fig.3. 12. Preparación de los dos diferentes niveles de concentración que entran dentro del intervalo lineal, para la determinación de exactitud.

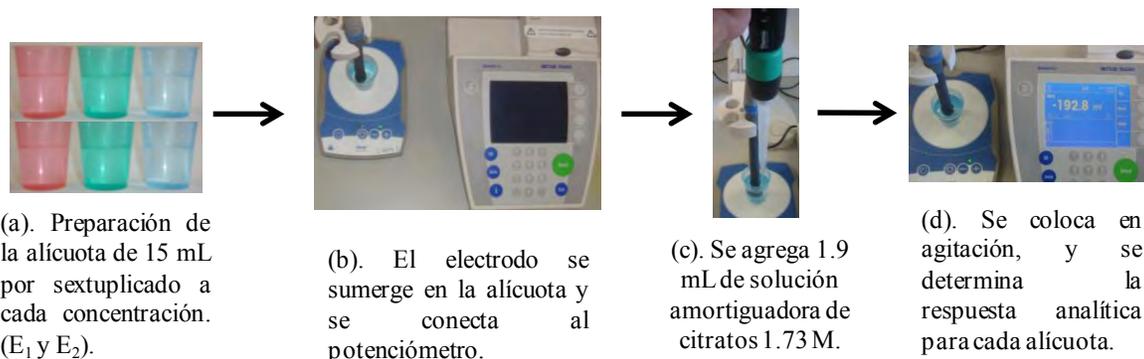
Determinación de la respuesta analítica.

Fig. 3.13. Determinación de la respuesta analítica para la determinación de: Exactitud. Nota: Las determinaciones se realizaron de la concentración más diluida a la más concentrada, por triplicado.

Robustez.**Preparación de soluciones.**

- Soluciones estándar de CO₂ a partir de NaHCO₃
 - Se sometió una cantidad de NaHCO₃ sólido a calentamiento (100°C) y se llevó a peso constante (**Fig. 3.2**).

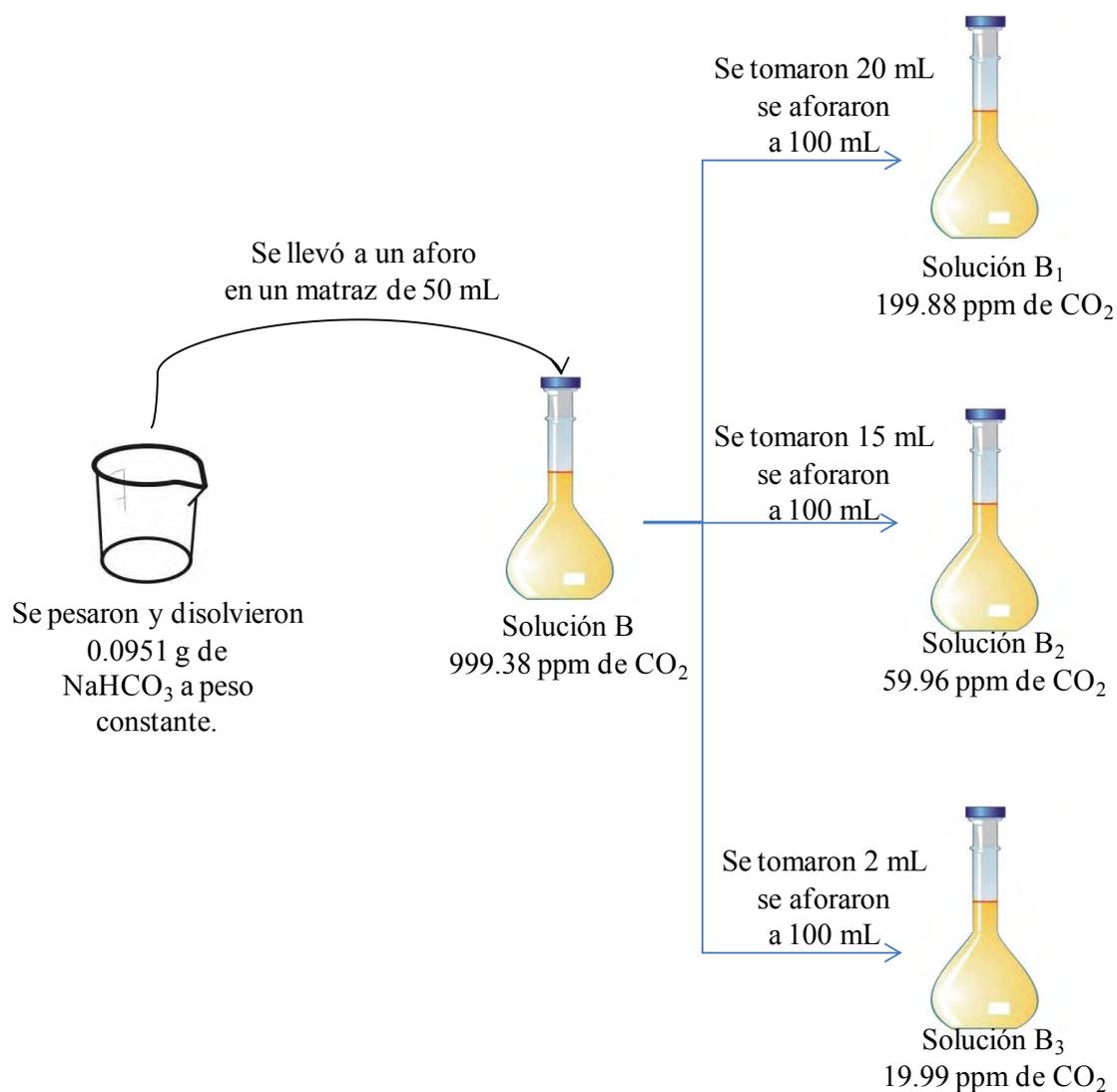
Parámetro del sistema o método a modificar: Temperatura.

Fig. 3.14. Preparación de soluciones para la determinación de robustez con el parámetro de temperatura modificado.

Parámetro del sistema o método a modificar: Sistema Cerrado.

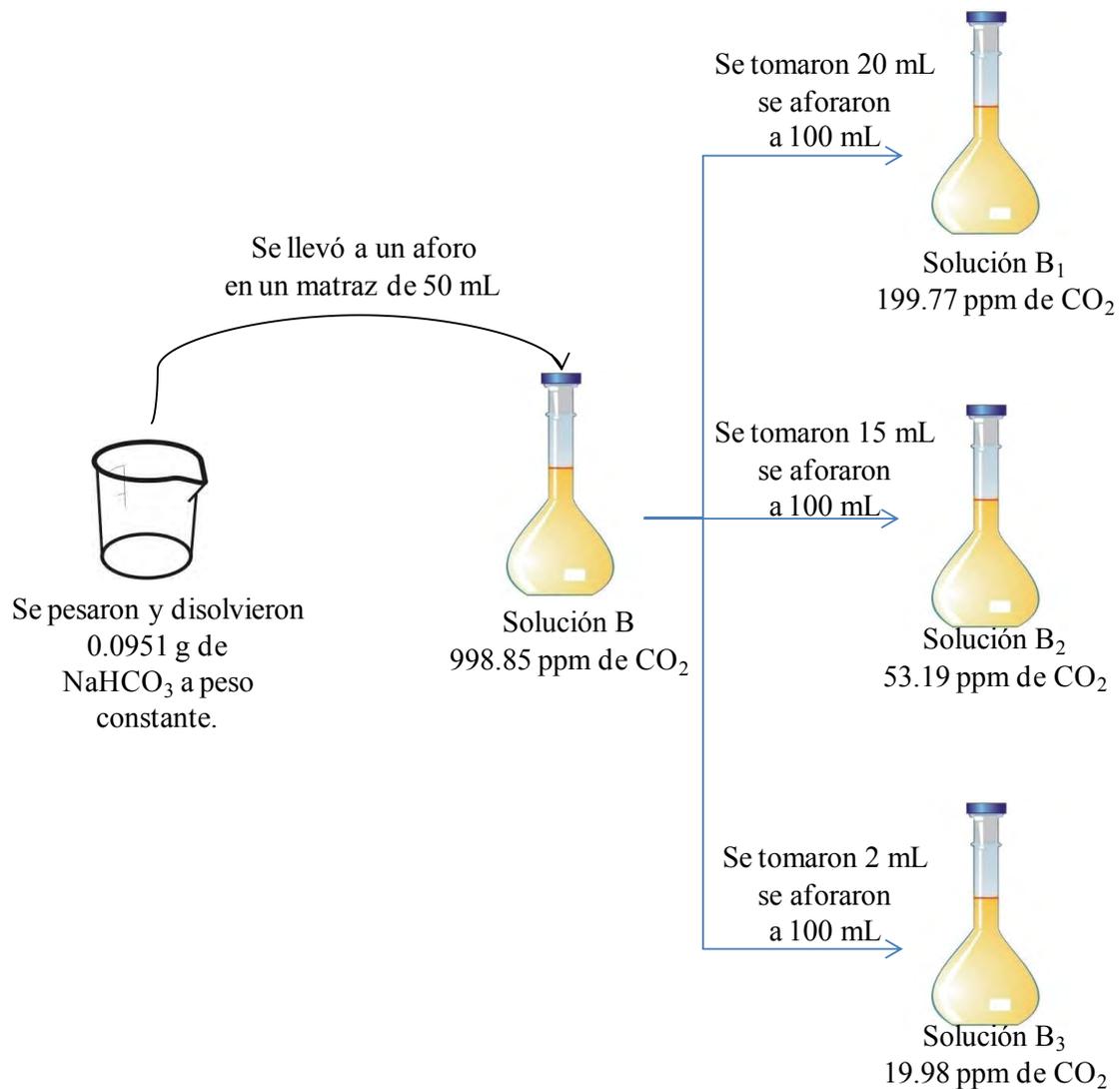


Fig. 3.15. Preparación de soluciones para la determinación de robustez con el parámetro de sistema cerrado modificado.

Parámetro del sistema o método a modificar: Solución amortiguadora de Fosfatos a pH=4.5.

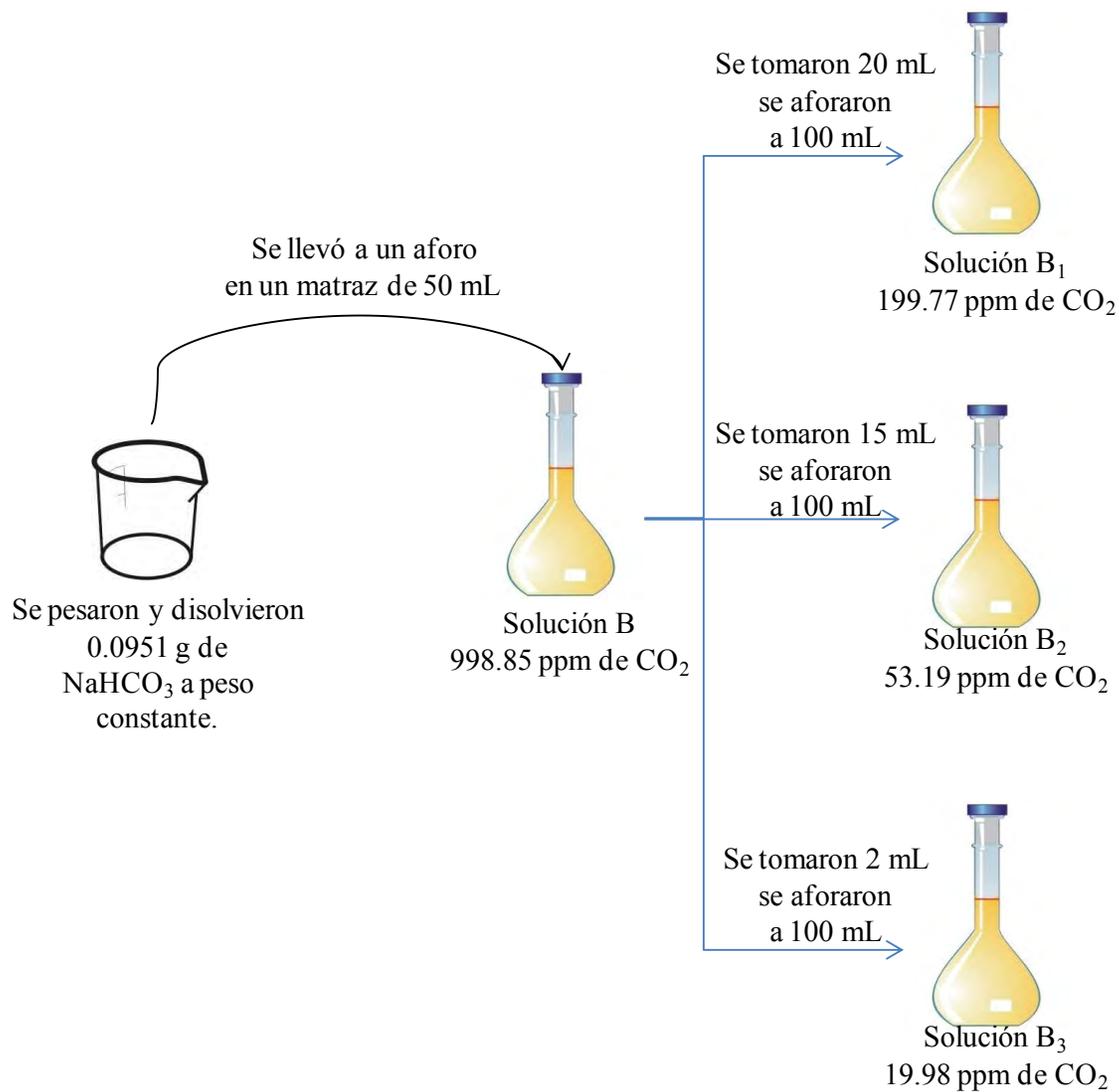


Fig. 3.16. Preparación de soluciones para la determinación de robustez con el parámetro de solución amortiguadora modificado.

Determinación de la respuesta analítica.

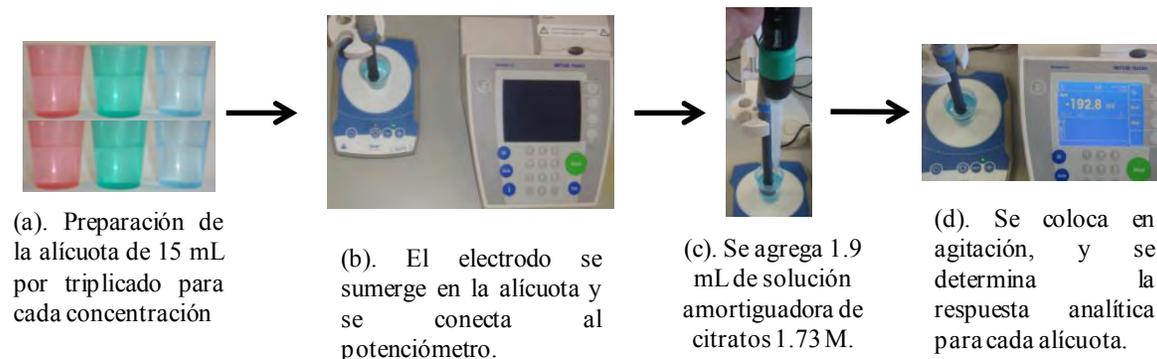


Fig. 3.17. Determinación de la respuesta analítica para la determinación de: Robustez. Nota: Las determinaciones se realizaron de la concentración más diluida a la más concentrada. Con los tres niveles de concentración se preparaba una curva de calibración para determinar la concentración de un estándar exactamente de la misma concentración que el punto medio de la curva de calibración.

Especificidad.

Preparación de Soluciones.

- Soluciones estándar de CO₂ a partir de NaHCO₃.
 - Se sometió una cantidad de NaHCO₃ sólido a calentamiento (100°C) y se llevó a peso constante (**Fig. 3.2**).
 - Posteriormente se prepararon los estándares de acuerdo a la **Fig. 3.18**.
 - Se prepara un estándar adicionado (**Fig. 3.19**), con la matriz del problema (esto es que el primer aforo se llevó con matriz del problema). En este caso la matriz utilizada fue obtenida a partir de un refresco de cola de 600 mL. al cual se sometió a tratamiento de calor y sonicación para eliminar lo más posible el gas CO₂.

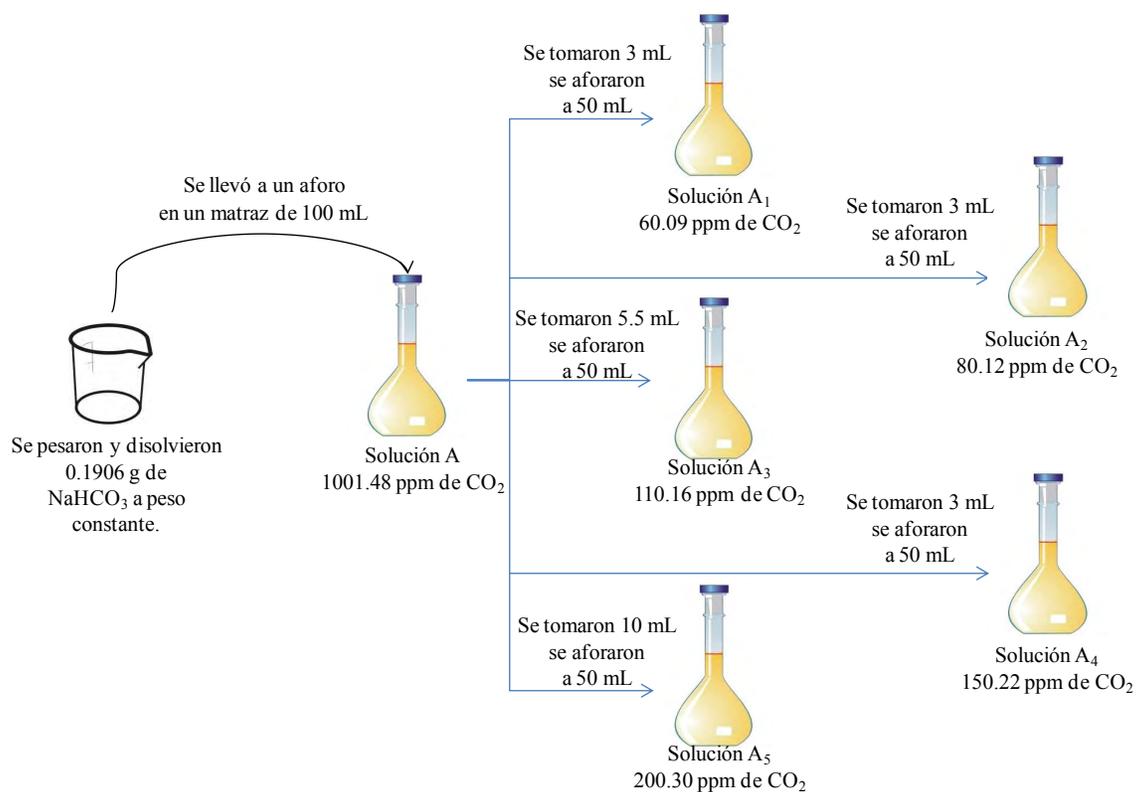


Fig. 3.18. Preparación de soluciones para la determinación de las 3 curvas de calibración para el parámetro de especificidad.

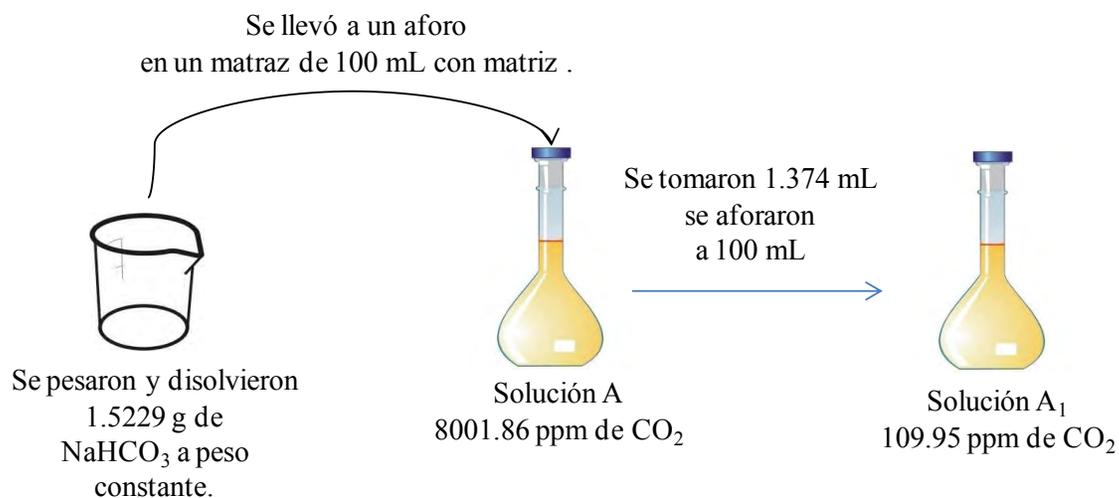


Fig. 3.19. Preparación del estándar adicionado para la determinación de especificidad. La solución A fue aforada con matriz del problema y la solución A₁ se aforó con agua desionizada.

Determinación de la respuesta analítica.

- Se midió la respuesta analítica para cada solución de las curvas de calibración y del estándar adicionado de la manera en la que se describe en la **Fig. 3.20**.

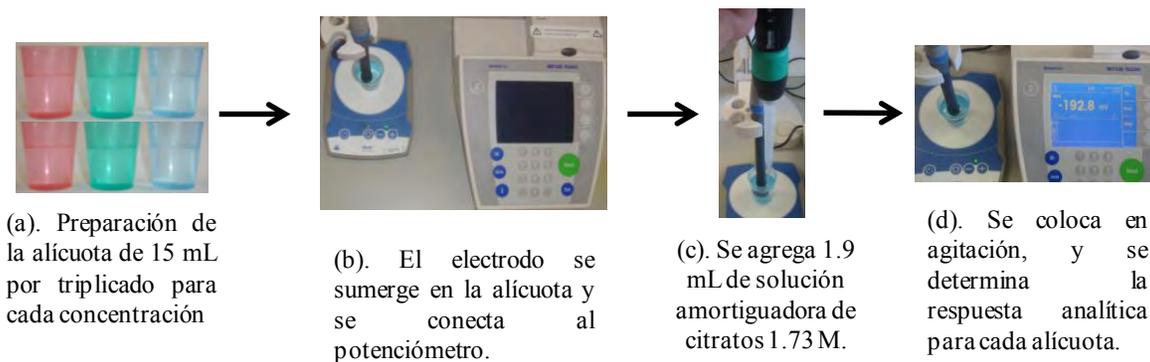


Fig. 3.20. Determinación de la respuesta analítica para la determinación de: Especificidad. Nota: Las determinaciones se realizaron de la concentración más diluida a la más concentrada.

3.3.2 Aplicación Del Método Validado (Curva De Calibración).

Preparación de Soluciones.

- Soluciones estándar de CO₂ a partir de NaHCO₃.
 - Se sometió una cantidad de NaHCO₃ sólido a calentamiento (100°C) y se llevó a peso constante (**Fig. 3.2**).

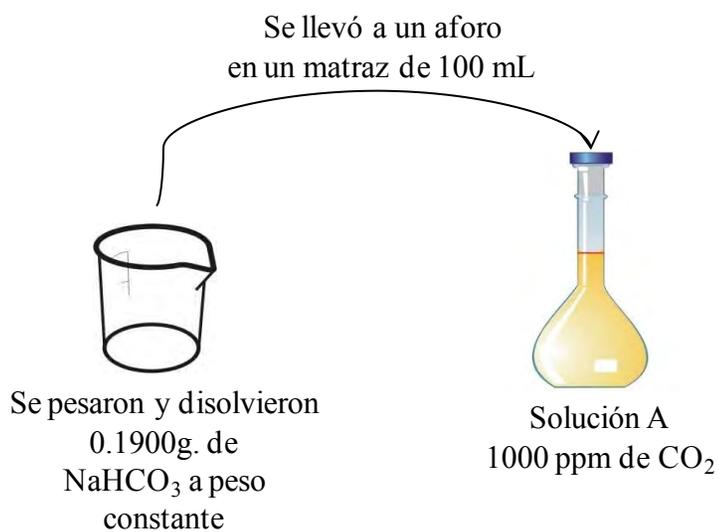


Fig. 3.21. Preparación del estándar de 1000 ppm de CO₂ del cual se toman alícuotas para preparar los estándares.

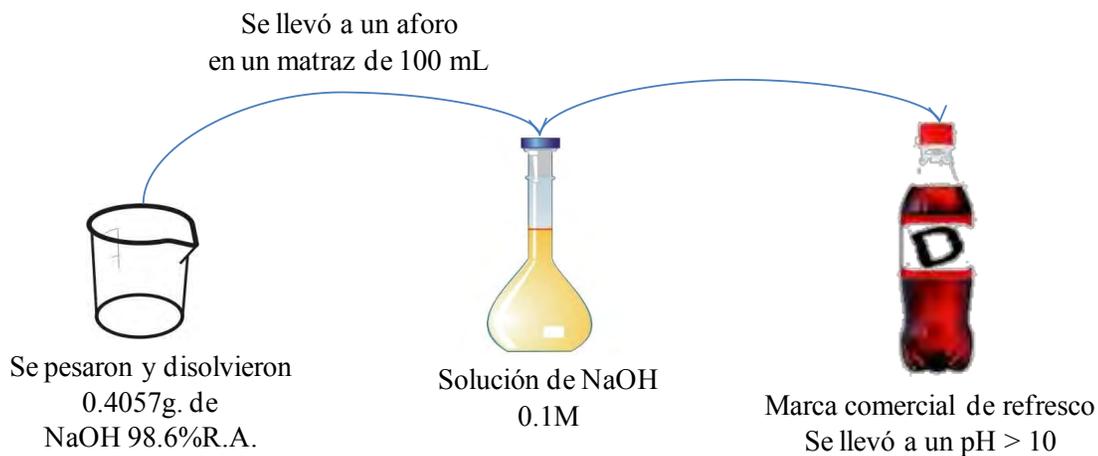


Fig. 3.22. Tratamiento de la muestra. Es necesario que la muestra comercial se le ajuste un pH mayor a 10 por lo tanto se agregan 15 mL de NaOH 10M a cada refresco a determinar, para que el CO₂ se mantenga en forma de CO₃²⁻ (iones carbonato), y no escape al momento de manipularse. Nota: los refrescos utilizados en este proyecto fueron de presentación de 600 mL de envase de tereftalato de polietileno (*PET*; por sus siglas en inglés *polyethylene terephthalate*).

Muestra de Refresco Comercial

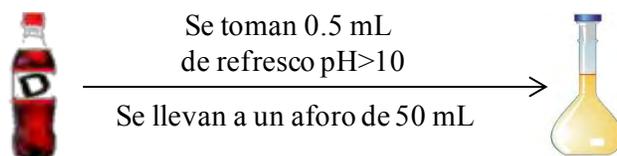


Fig. 3.23. Preparación de una disolución diluida del refresco, a partir de la muestra comercial a la cual se le llevó a un pH>10.

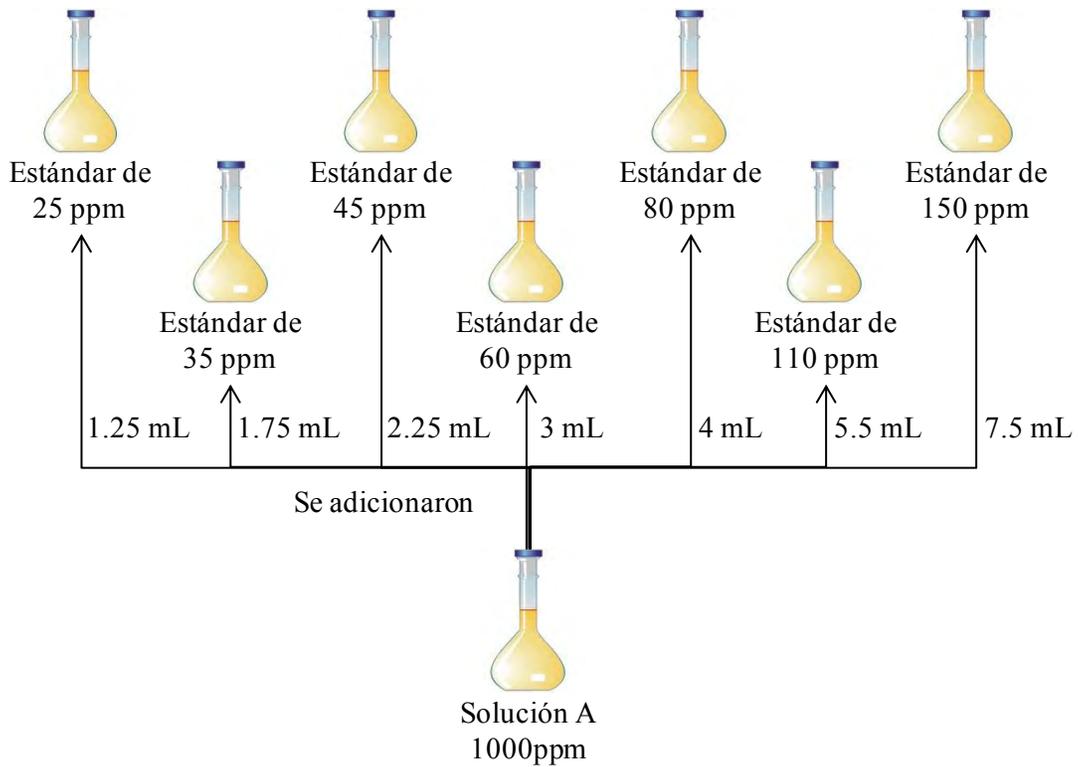


Fig. 3.24. Preparación de cada estándar para la curva de calibrado, a partir de una solución de 1000 ppm de CO₂. Nótese que se preparan a concentraciones dentro del intervalo lineal.

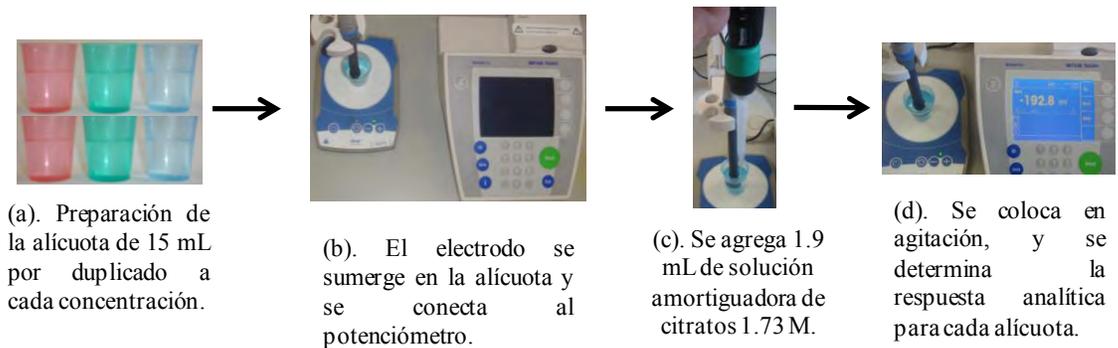


Fig. 3.25. Preparación y determinación de la respuesta analítica para cada una de las alícuotas para la medición, las cuales fueron preparadas para cada estándar y cada muestra (Figs. 20 y 21) por triplicado.

3.3.3 Método De Adiciones Patrón.

Preparación de Soluciones.

- Soluciones estándar de CO₂ a partir de NaHCO₃.
 - Se sometió una cantidad de NaHCO₃ sólido a calentamiento (100°C) y se llevó a peso constante (**Fig. 3.2**).

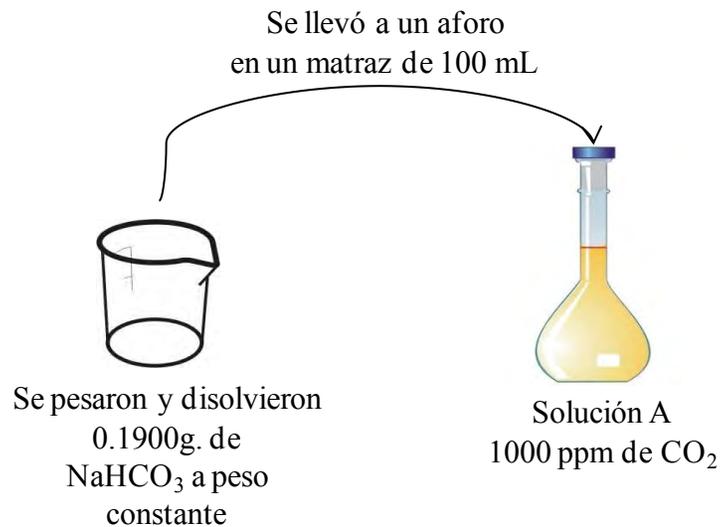


Fig. 3.26. Preparación del estándar de 1000 ppm de CO₂ del cual se toman alícuotas para preparar los estándares.

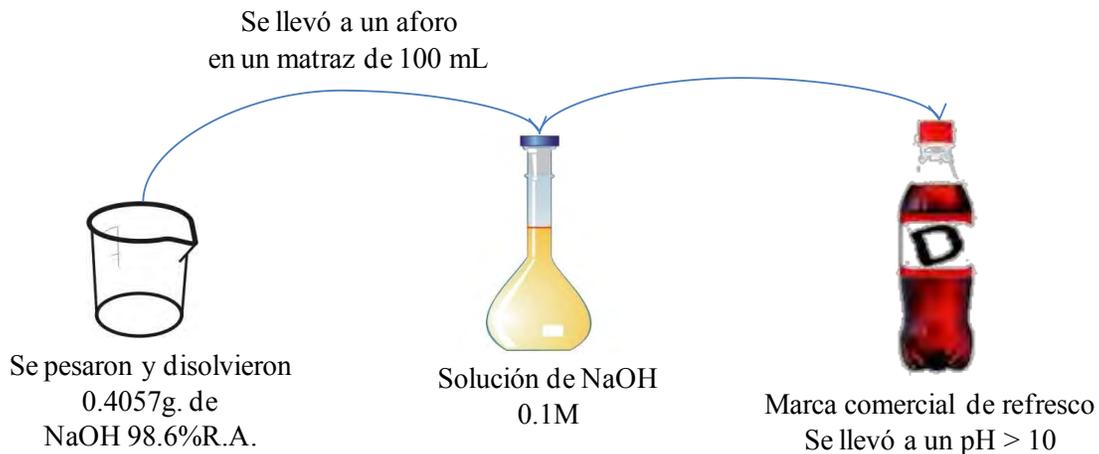


Fig. 3.27. Tratamiento de la muestra. Antes de preparar los estándares es necesario que la muestra comercial se le ajuste un pH mayor a 10 por lo tanto se agregaron 15 mL a cada muestra, para que el CO₂ se mantenga en forma de CO₃²⁻ (iones carbonato), y no escape al momento de manipularse. Nota: los refrescos utilizados en este proyecto fueron de presentación de 600 mL.

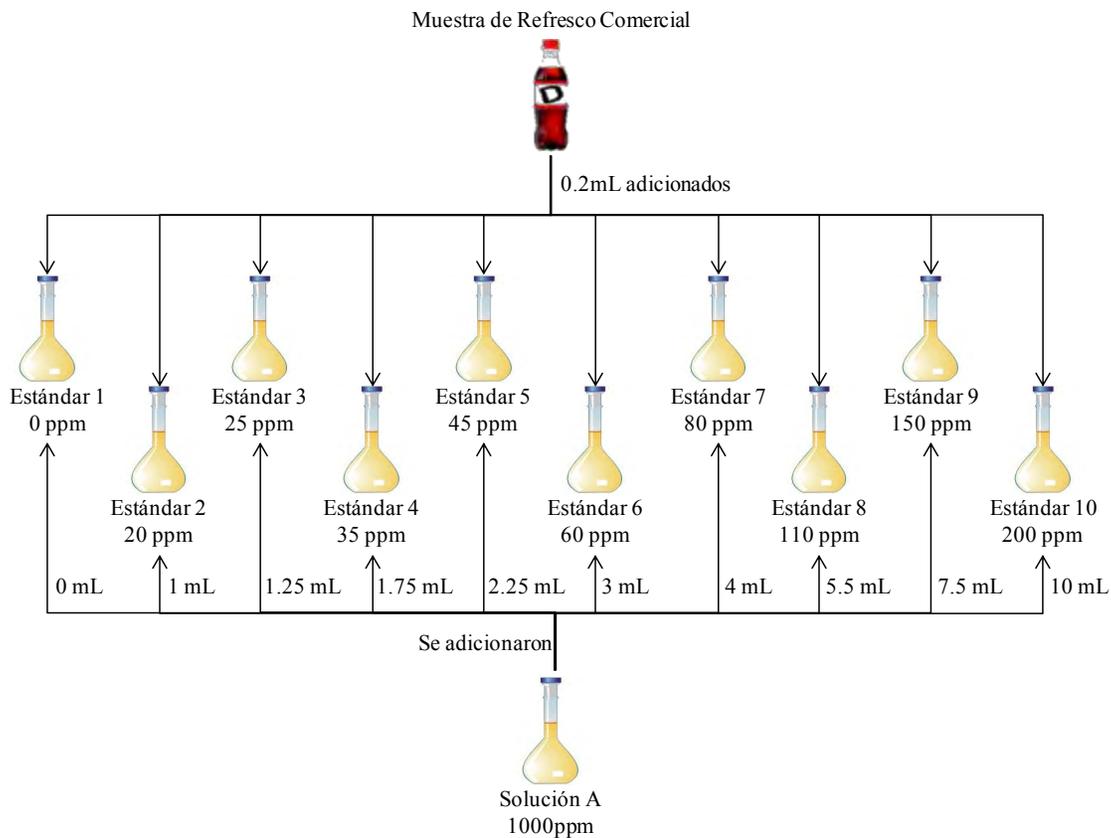


Fig. 3.28. Preparación de los estándares para la determinación de CO₂ de cada marca comercial de refresco por el método de adiciones patrón; los estándares se aforaban a 50 mL con agua desionizada y con 0.2 mL de muestra de refresco adicionando diferentes volúmenes de solución estándar.

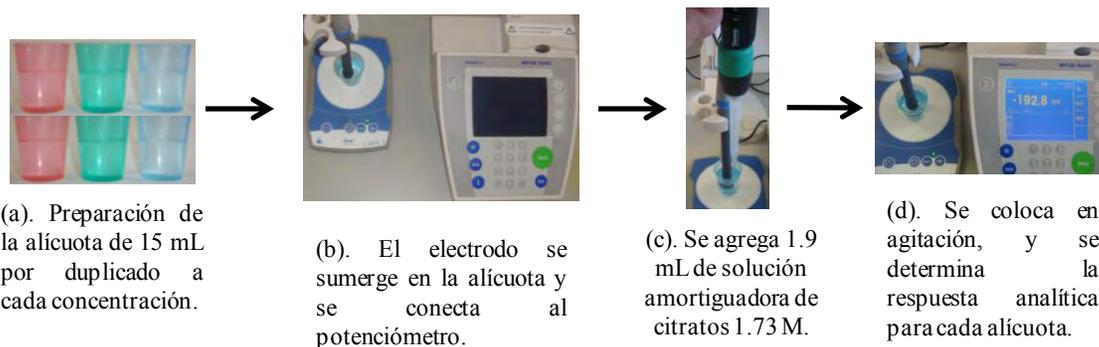


Fig. 3.29. Preparación y determinación de la respuesta analítica para cada una de las alícuotas para la medición, las cuales fueron preparadas para cada estándar (Fig. 3.28, Estándar 1-10) por triplicado.

Capítulo 4: RESULTADOS EXPERIMENTALES Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.1 VALIDACIÓN DEL MÉTODO.

En la **Tabla 4.1** se muestran los potenciales obtenidos para el intervalo de concentración trabajado, los cuales fueron útiles para los parámetros de linealidad, límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC); estos datos se graficaron en función al logaritmo de la concentración como se puede observar en la **Fig. 4.1**, de esta manera se pueden observar el comportamiento de la señal de la sonda a concentraciones muy bajas y a concentraciones muy altas; el intervalo de concentraciones utilizado es: 8.88×10^{-5} ppm - 28091.60 ppm.

Como se puede observar en la **Tabla 4.2** y **Fig. 4.2** se logró determinar la linealidad del sistema en el intervalo de concentración (8.89 ppm-280.92 ppm) en donde los potenciales obtenidos con el electrodo presentan un alto coeficiente de determinación ($R^2=0.9994$) además de que presentan un valor de pendiente de 54.01mV. Los datos experimentales se derivaron de la **Tabla 4.1**; por lo que los datos presentados en la **Tabla 4.2**, son los que mejor coeficiente de correlación ($R^2>0.98$) con una pendiente lo más cercana a una respuesta *nernstiana* (Evans, A, 1987 y *Pure & appl. Chem.* 1994) esperada para una sonda sensible a CO₂ (en el anexo para linealidad se muestra la tabla ANOVA y los residuales de esta curva). Por lo cual este parámetro es aceptado (*Guía de Validación de Métodos Analíticos.* 2002) con un intervalo de confianza de pendiente $IC(\beta_1)$ al 97.5% de confianza:

$$IC(\beta_1)=54.01 \pm 0.77 \text{mV}$$

El límite de detección (LD) se determinó al intersecar la curva de linealidad (**Fig. 4.2**) con la curva de los datos a muy bajas concentraciones (*Pure & appl. Chem.* 1994) (**Tabla 4.3**), debido a que en estas regiones se observan comportamientos aparentemente lineales (**Fig. 4.1**). Nótese que no se utilizaron datos dentro de la región curva de la curva de calibración (**Fig. 4.1**). Debido a que los datos a bajas concentraciones, no presentan una correlación adecuada, se optó por “trazar” una línea paralela al eje (log C) (*Pure & appl. Chem.* 1994), al valor promedio de potencial (E) de las respuestas de los datos (**Tabla 4.3**). Esta línea paralela se intersecó con la de linealidad (**Fig. 4.3**); permitiendo así la determinación del valor de LD con un intervalo de confianza de la media IC al 97.5% (Ver anexo: LD):

$$LD=1.48 \pm 0.04 \text{ ppm}$$

Tabla 4.1. Potenciales obtenidos para cada nivel de concentración por triplicado para la prueba de Linealidad, Límite de Detección y Límite de Cuantificación.

Concentración del estándar	Concentración de alícuota (ppm)	Log C_I	Potencial E (mV)		
			1	2	3
1.00E-04	8.88E-05	-4.05	-201.9	-201.1	-200.7
3.16E-04	2.00E-04	-3.55	-200.9	-201	-201.4
1.00E-03	8.00E-04	-3.05	-201.5	-201.7	-201.8
3.16E-03	2.80E-03	-2.55	-202.0	-202.1	-202.2
1.00E-02	8.80E-03	-2.05	-202.0	-201.7	-201.7
3.16E-02	2.80E-02	-1.55	-201.6	-201.5	-201.7
1.00E-01	8.88E-02	-1.05	-201	-200.3	-200
0.31	0.28	-0.55	-200.2	-200.1	-200.0
1.00	0.89	-0.05	-197.2	-194.6	-193.7
1.78	1.58	0.20	-190.7	-188.6	-188.2
3.16	2.81	0.45	-183.1	-179.1	-179.3
5.63	5.00	0.70	-171.3	-169.9	-170.7
10.00	8.89	0.95	-160.4	-158.2	-158.4
17.78	15.80	1.20	-147.0	-145.8	-145.3
31.60	28.09	1.45	-133.5	-132.3	-132.2
56.25	50.00	1.70	-118.7	-118.3	-118.6
100.01	88.89	1.95	-104.9	-104.7	-104.3
177.77	158.02	2.20	-91.8	-91.2	-91.3
316.03	280.92	2.45	-78.9	-78.7	-78.5
562.53	500.02	2.70	-66.7	-65.7	-65.0
1000.05	888.93	2.95	-54.6	-53.6	-54.1
1777.67	1580.15	3.20	-44.7	-43.7	-43.9
3160.30	2809.16	3.45	-42.2	-41.4	-40.8
10000.51	8889.34	3.95	-38.3	-37.1	-40.7
31603.05	28091.60	4.45	-38.5	-38.2	-38.7

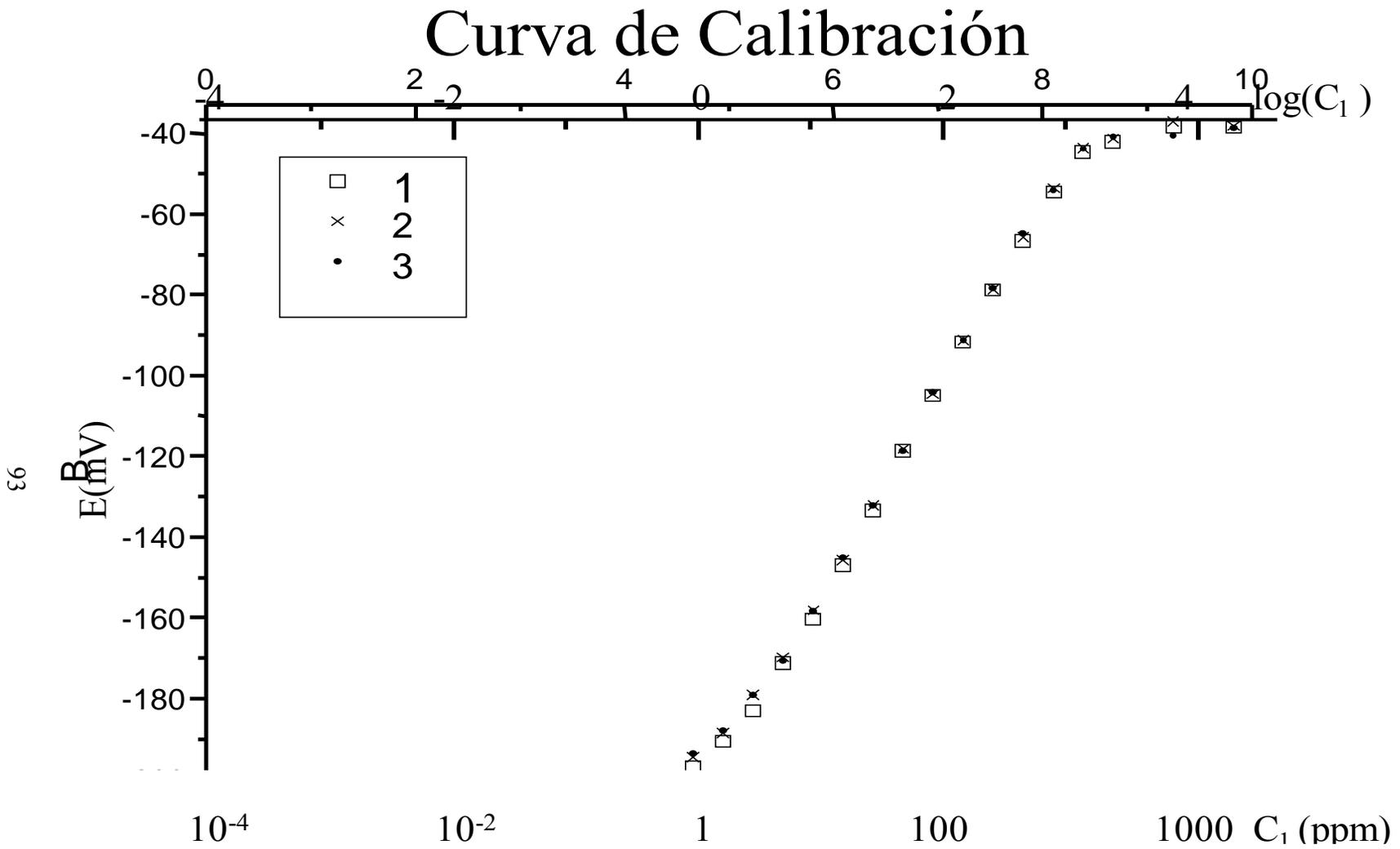


Fig. 4.1. Gráfica de $\log C_1$ vs. E (mv) de los datos de la Tabla 1.

El límite de cuantificación se determinó con el punto de la curva de linealidad (**Fig. 4.1**) el cual es el límite de una buena correlación y de una respuesta *nernstiana* adecuada (**Fig. 4.3**). Se determinó este punto debido a que es el punto mínimo útil para realizar cuantificaciones (Evans, A. 1987). Ya que este punto se determinó por triplicado (**Tabla 4.4**), se le puede asignar un intervalo de confianza (Ver Anexo: LC):

$$LC=8.97\pm 1.14 \text{ ppm.}$$

En la **Tabla 4.5** se presentan los resultados de estos 3 parámetros de Linealidad, LD y LC.

Tabla 4.2. Potenciales obtenidos en diferentes concentraciones de CO₂ en el intervalo de respuesta lineal, y coeficientes obtenidos con la gráfica de regresión lineal.

Concentración C_I (ppm)	Log C_I	Potenciales E (mV)		
		1	2	3
8.89	0.95	-160.4	-158.2	-158.4
15.80	1.20	-147.0	-145.8	-145.3
28.09	1.45	-133.5	-132.3	-132.2
50.00	1.70	-118.7	-118.3	-118.6
88.89	1.95	-104.9	-104.7	-104.3
158.02	2.20	-91.8	-91.2	-91.3
280.92	2.45	-78.9	-78.7	-78.5
	Cuadrados Mínimos estimados	Error estándar		IC(β_1)(mV) 97.5% de confianza
Ordenada al origen b	-210.46	0.5286		
Pendiente m	54.01	0.2985		54.01 \pm 0.77

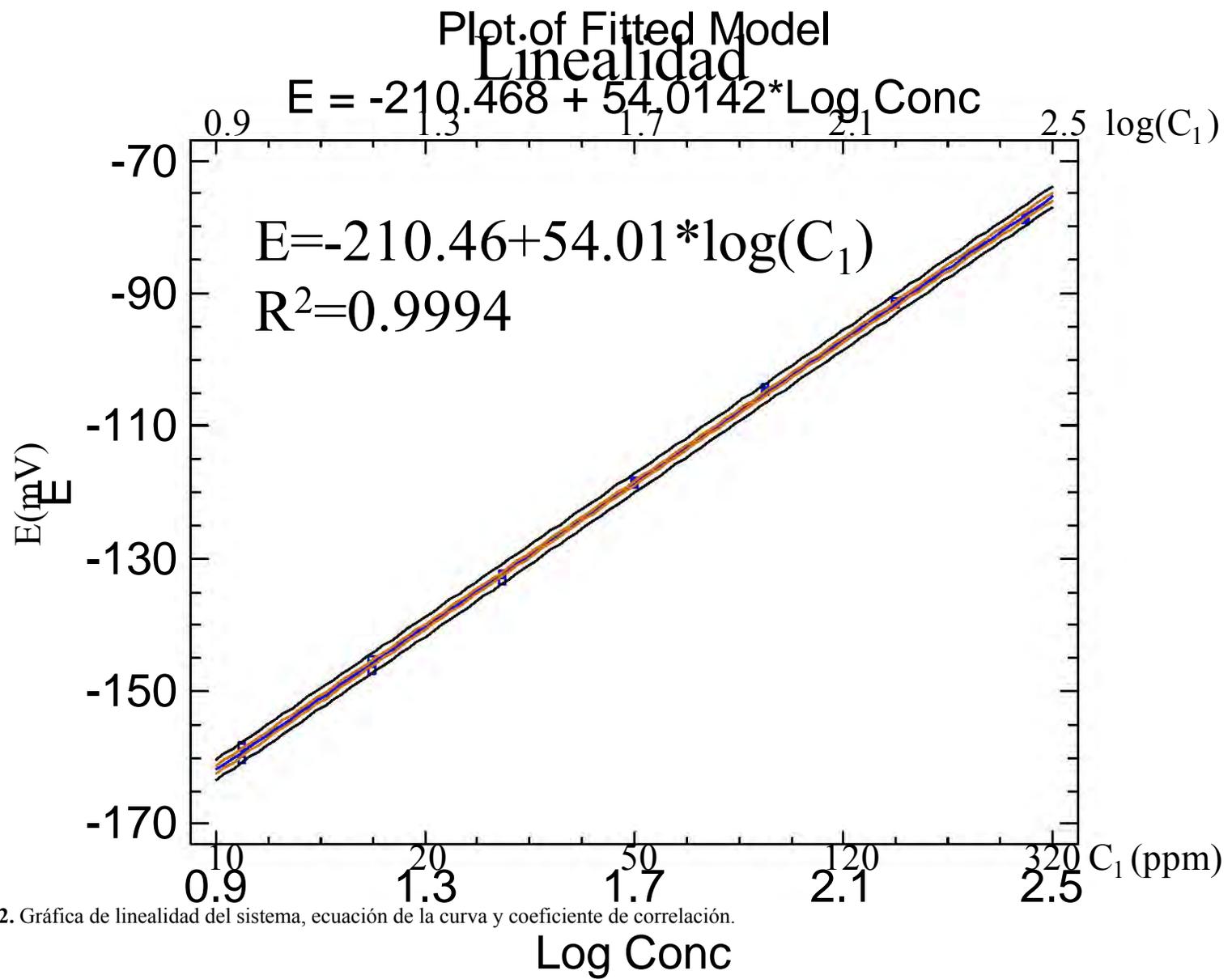


Fig. 4.2. Gráfica de linealidad del sistema, ecuación de la curva y coeficiente de correlación.

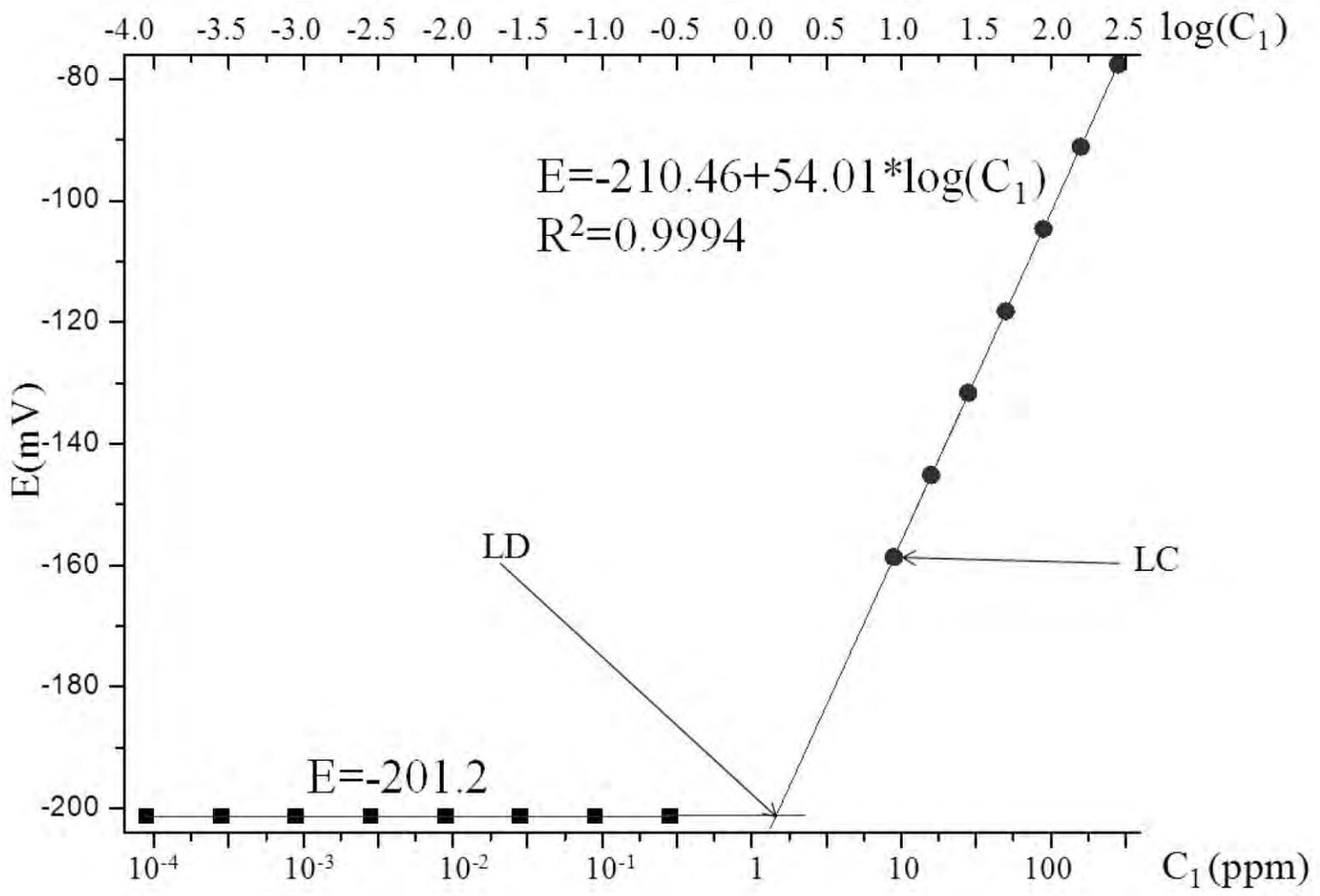


Fig. 4.3. Gráfica que muestra la intersección de las respuestas promedio a bajas concentraciones y la ecuación de linealidad con respuesta *nernstiana*.

Tabla 4.3. Datos para la obtención del valor promedio de potencial para la determinación del Límite de Detección (LD).

Concentración de alícuota C_I (ppm)	$\log(C_I)$	Potencial E (mV)				Valor de la intersección ($\log C_I$)	Valor en la intersección C_I (ppm)
		1	2	3	Promedio		
8.88E-05	-4.05	-201.9	-201.1	-200.7	-201.2	0.17	1.48
2.00E-04	-3.55	-200.9	-201.0	-201.4	-201.1	0.17	1.49
8.00E-04	-3.05	-201.5	-201.7	-201.8	-201.6	0.16	1.46
2.80E-03	-2.55	-202.0	-202.1	-202.2	-202.1	0.15	1.42
8.80E-03	-2.05	-202.0	-201.7	-201.7	-201.8	0.16	1.44
2.80E-02	-1.55	-201.6	-201.5	-201.7	-201.6	0.16	1.46
8.88E-02	-1.05	-201.0	-200.3	-200.0	-200.4	0.18	1.53
0.28	-0.55	-200.2	-200.1	-200.0	-200.1	0.19	1.55
Promedio							1.48
Desviación Estándar (S)							0.04

Tabla 4.4. Datos para el cálculo del parámetro Límite de Cuantificación (LC).

Potenciales E (mV)	Valores obtenida con la curva de linealidad	
	$\log(C_I)$	C_I (ppm)
-160.4	0.93	8.45
-158.2	0.97	9.28
-158.4	0.96	9.20
Promedio		8.98
Desv. Estándar (S)		0.45

Tabla 4.5. Resultados obtenidos para los parámetros de Linealidad, Limite de Detección *LD* y Límite de Cuantificación *LC*.

Parámetro	Resultados
Linealidad	$E = -210.46 + 54.01 * \text{Log } C_I$ $R^2 = 0.9994$ $IC(\beta_1) = 54.01 \pm 0.77 \text{ mV}$ Intervalo: 8.89 ppm-280.92 ppm
Límite de Detección (LD)	1.48 ± 0.04 ppm
Límite de Cuantificación (LC)	8.97 ± 1.14 ppm

En la **Tabla 4.6** se pueden observar los datos obtenidos para el parámetro de precisión la cual puede ser descrita por la repetibilidad *r* y reproducibilidad *R*; las cuales se obtuvieron por 3 diferentes analistas a 10 niveles diferentes de concentración; como se recomienda por el método *Two way* (dos vías) ANOVA (análisis de varianza) (Engineered Software, Inc. 1999) modelo de efectos fijos con repeticiones. Este método calcula la variabilidad total de medición del sistema y permite la separación de la variabilidad del sistema total de medición en repetibilidad *r*, reproducibilidad (Engineered Software, Inc. 1999).

La tabla ANOVA que se muestra en la **Tabla 4.7** se obtuvo con el programa *Minitab 15 Statistical*, la cual permitió los cálculos para determinar repetibilidad *r*, reproducibilidad *R* y *r*&*R* (relación de repetibilidad y reproducibilidad), los cuales se muestran en la **Tabla 4.8**, que se obtuvieron por las fórmulas que se muestran en el ANEXO en la sección de precisión.

Estos datos se pueden analizar de la siguiente manera:

1.- Debido a que la repetibilidad (5.4%) es mayor a la reproducibilidad (2.2%), infiere que las posibles causas que originaron la variación del sistema de medición puede ser debido a

que el instrumento necesita mantenimiento, el equipo necesita ser rediseñado para ser más rígido, el montaje o ubicación donde se efectúan las mediciones necesita ser mejorado y/o, existe una variabilidad excesiva entre las partes (sistemas o estándares de medición) (Llamosa, 2007). Por lo cual si se mejoran estos detalles la variación podrá disminuir.

2.- Debido a que el porcentaje de r&R (5.8%) es menor a un 10%; el sistema es aceptable.

Estos datos (repetibilidad, reproducibilidad y r&R) nos muestran lo que es también conocida como la precisión inherente del sistema (Engineered Software, Inc. 1999).

Tabla 4.6. Resultados de los 3 diferentes analistas, a los 10 diferentes niveles de concentración para el parámetro reproducibilidad y repetibilidad (Precisión).

Concentración del Estándar	Concentración (ppm)	Nivel	Analista					
			A		B		C	
			Prueba 1	Prueba 2	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 1	Prueba 2
5.66	5.02	1	-176.8	-172.2	-172.8	-172.0	-174.3	-170.9
10.05	8.92	2	-158.0	-159.5	-157.0	-159.0	-160.0	-157.9
18.07	16.04	3	-148.0	-146.4	-147.4	-147.4	-147.4	-145.8
32.21	28.59	4	-133.9	-130.9	-133.5	-133.3	-131.3	-132.5
56.59	50.23	5	-119.2	-118.8	-119.8	-119.4	-120.1	-119.2
100.46	89.17	6	-104.3	-103.4	-105.3	-105.6	-106.0	-105.6
180.75	160.43	7	-89.7	-89.4	-91.4	-90.1	-91.5	-91.5
322.09	285.88	8	-75.3	-75.0	-78.2	-77.4	-78.1	-77.7
562.89	502.27	9	-62.1	-61.8	-64.4	-64.5	-64.1	-64.0
1004.63	891.69	10	-49.0	-49.4	-51.8	-51.8	-51.4	-51.4

Tabla 4.7. ANOVA obtenida por el método *Two-Way*.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Media cuadrática
Analista	2	11.2	5.6
Niveles	9	92707.4	10300.8
Interacción	18	31.7	1.8
Error	30	32.4	1.1
Total	59	92782.7	

Tabla 4. 8. Resultados para repetibilidad y reproducibilidad por el método *Two-Way* ANOVA.

Parámetro	Resultado (%)
Repetibilidad <i>r</i>	5.4
Reproducibilidad <i>R</i>	2.2
r&R	5.8

En las **Tablas 4.9 a 4.12** se presentan los resultados obtenidos para el parámetro de robustez, en los cuales se observan los resultados de cambiar algún efecto al uso cotidiano de este sistema. Por ejemplo en la **Tabla 4.9** se observan los resultados obtenidos de un

estándar medido bajo condiciones normales (25°C, sistema abierto, y con una solución amortiguadora de citratos pH=4.5), determinando su concentración con una curva de calibración igualmente bajo condiciones normales; como se observa el porcentaje (%) de recobro (determinado al dividir la cantidad obtenida (C_{exp}) entre la concentración estándar (53.19 ppm para sistema cerrado, temperatura y condición normal y 53.22 para solución amortiguadora y multiplicarlo por 100). De igual manera se determinó un estándar a 38°C (**Tabla 4.10**), con diferente solución amortiguadora (fosfatos pH=4.5, **Tabla 4.11**) y a sistema cerrado (**Tabla 4.12**). Al obtener el promedio para cada recobro y cada factor (i) se determinó la diferencia absoluta $|d_i|=|y_1-y_0|$. Los resultados fueron: $|d_i|=2.8\%$ para el cambio en temperatura, $|d_i|=3.4\%$ para el cambio en solución amortiguadora a fosfatos y de $|d_i|=6.5\%$ al cambio a sistema cerrado. Con estos resultados se puede determinar el factor que presenta mayor efecto sobre el desempeño del método, ordenándolos del efecto que tienen: el cambio al sistema cerrado, seguido de la solución amortiguadora de fosfatos y el cambio de temperatura con un menor efecto. Estos experimentos indican que se debe controlar aquellos que presentan un mayor efecto y se debe tener precaución al realizar modificaciones y además ayudan a mejorar el método. Por lo tanto debido a que el $|d_i|$ de la temperatura y de la solución amortiguadora no rebasan el 3% (*Guía de Validación de Métodos Analíticos*. 2002); estos factores pueden modificarse y no afectar el desempeño y se aceptan, al contrario en el sistema cerrado el cual rebasa el 3% y no es aceptado (*Guía de Validación de Métodos Analíticos*. 2002).

➤ **Condición normal**Tabla 9. Resultados para robustez condición normal y_0 .

Det.	Condición normal y_0		
	$E(\text{mV})$	Concentración C_{exp} (ppm)	%Recobro $(C_{exp}/53.19 \text{ ppm}) \times 100$
1	-119.1	50.69	95.3
2	-117.8	53.31	100.2
3	-116.7	55.64	104.6
		y_0	100.0

➤ **Temperatura (38°C).**

Tabla 10. Resultados para robustez al modificarla la temperatura a 38°C.

Det.	38°C		
	$E(\text{mV})$	Concentración (ppm) C_{exp}	%Recobro $(C_{exp}/53.19 \text{ ppm}) \times 100$
1	-121.2	54.87	103.2
2	-121.3	54.66	102.8
3	-121.4	54.46	102.4
		y_1	102.8

$$|d_i| = |y_1 - y_0| = |102.8 - 100.0| = 2.8\%$$

➤ Solución amortiguadora (Fosfatos 1.73M, pH=4.5).

Tabla 11. Resultados para robustez al modificar la solución amortiguadora a fosfatos.

Det.	Fosfatos.		
	<i>E</i> (mV)	Concentración (ppm) <i>C_{exp}</i>	%Recobro (<i>C_{exp}</i> /53.22 ppm)x100
1	-130.3	55.54	104.4
2	-129.0	56.94	107.0
3	-128.4	52.63	98.9
		<i>y</i> ₁	103.4

$$|d_i|=|y_1-y_0|=|103.4-100.0|=3.4\%$$

➤ Sistema cerrado.

Tabla 12. Resultados para robustez al modificar el sistema de abierto a cerrado.

Det.	Sistema Cerrado		
	<i>E</i> (mV)	Concentración (ppm) <i>C_{exp}</i>	%Recobro (<i>C_{exp}</i> /53.19 ppm)x100
1	-112.5	55.22	103.8
2	-111.5	57.50	108.1
3	-111.6	57.27	107.7
		<i>y</i> ₁	106.5

$$|d_i|=|y_1-y_0|=|106.5-100.0|=6.5\%$$

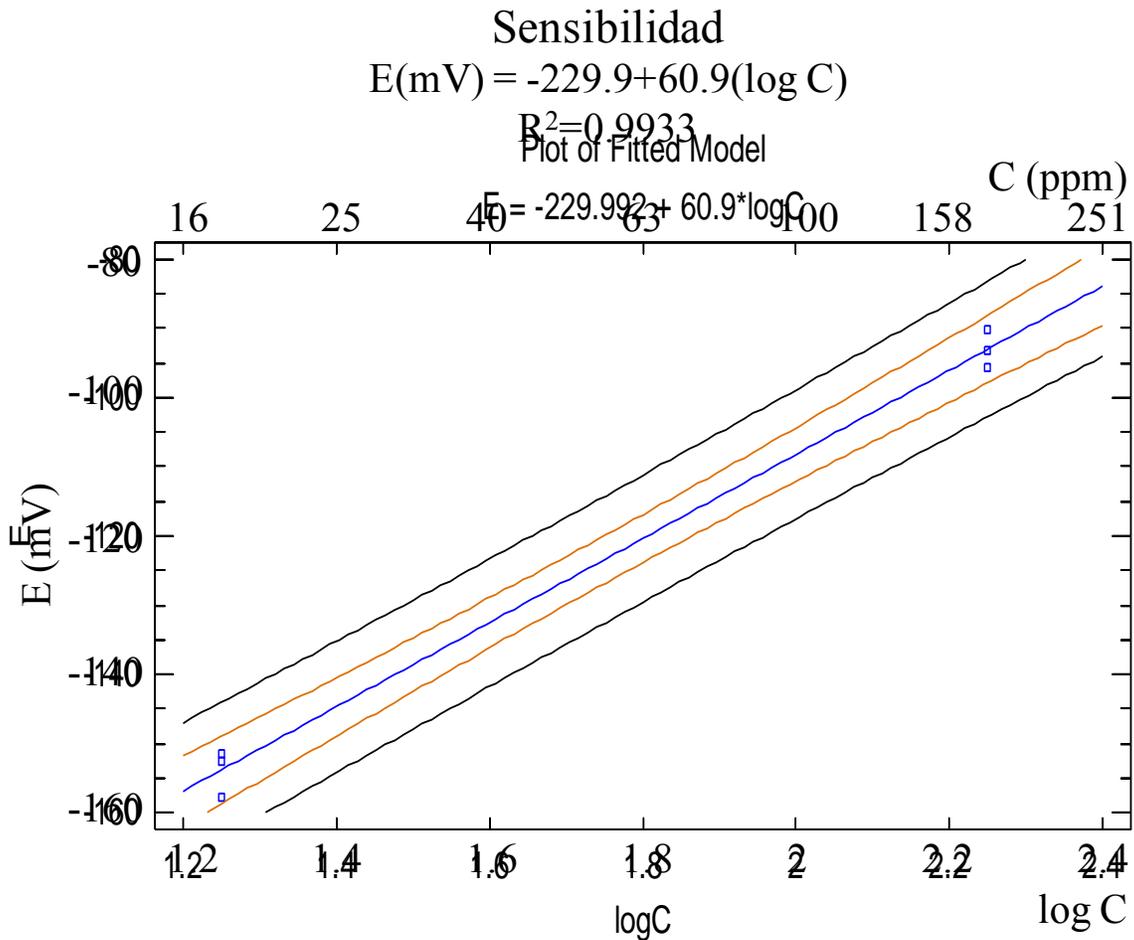
En la **Tabla 4.13** se presentan los datos para la determinación de la sensibilidad, al obtener las respuestas para una concentración de 177.03 y de 17.70 por triplicado, los cuales están dentro del intervalo lineal (ver la parte de linealidad). Este parámetro se determina al obtener la pendiente de la curva, es decir, el cambio en la respuesta del instrumento. Como se puede observar en el Fig. 4, la pendiente m es de 60.9mV lo cual es muy cercano a una respuesta *nernstiana*, indicando así una buena sensibilidad del instrumento (*Pure & appl. Chem.* 1994).

Tabla 4.13. Resultados para el parámetro de sensibilidad.

Concentración C_1 (ppm)	$\log C_1$	Potencial E (mV)		
		1	2	3
17.70	1.25	-157.7	-152.5	-151.4
177.03	2.25	-95.5	-93.3	-90.1

Tabla 4.14. Presentación de resultados para sensibilidad.

Parámetro	Resultados
Sensibilidad	$E = -229.9 + 60.9 \cdot \log C_1$ $R^2 = 0.9933$ $IC(\beta_1) = 60.9 \pm 7.3 \text{ mV}$



En la **Tabla 4.15** se muestran los resultados obtenidos para el parámetro de exactitud, se realizaron determinaciones de 2 niveles de concentración por sextuplicado, para determinar si las concentraciones determinadas con el sistema son cercanos al resultado verdadero, en este caso a la concentración de analito que se agregó. Con los datos obtenidos experimentalmente y los datos teóricos se realiza una comparación (recobro ó %R “por ciento de recobro”). Como se muestra en la **Tabla 4.15** los resultados de recobro promedio para los dos diferentes niveles (88.61 ppm y 132.91 ppm) son de 99.7% y de 99.6% respectivamente; lo que indica que las concentraciones experimentales se encuentran muy cercanas a las concentraciones teóricas además que el intervalo de confianza de la media

$IC(\mu)$ incluye el 100% en los dos casos y debido a que el coeficiente de variación CV no es muy elevado 2.7% y 2.0% respectivamente, el parámetro de exactitud es aceptable.

Tabla 4.15. Resultados para el parámetro de exactitud.

Concentración 88.61 ppm				Concentración 132.91 ppm			
Respuesta E (mV)	Log C	Concentración C_2 (ppm)	Porcentaje de Recobro “%R”	Respuesta. E (mV)	Log C	Concentración C_2 (ppm)	Porcentaje de recobro “%R”
-88.8	1.94	86.51	97.6	-76.9	2.13	135.55	102.0
-88.2	1.95	88.49	99.9	-77.1	2.13	134.53	101.2
-89.2	1.93	85.21	96.2	-78.2	2.11	129.06	97.1
-88.2	1.95	88.49	99.9	-77.6	2.12	132.01	99.3
-87.1	1.96	92.24	104.1	-78.1	2.11	129.55	97.5
-88.0	1.95	89.16	100.6	-77.3	2.13	133.52	100.5
promedio			99.7	promedio			99.6
CV			2.7	CV			2.0
IC(μ) (mV)			99.7 \pm 2.9	IC(μ) (mV)			99.6 \pm 2.1

En la **Tabla 4.16** se muestran los resultados que se obtuvieron para el parámetro de especificidad, este parámetro muestra el efecto que provoca el hacer mediciones de CO₂ cuando se agregan concentraciones conocidas de éste en un medio parecido al real, esto se obtiene adicionando la matriz² la cual se piensa que produce interferencias a la hora de hacer mediciones.

² Debido a que la validación de este método es dirigido para determinaciones de CO₂ en refresco de cola, la matriz para esta validación son todos los componentes de un refresco de cola sin CO₂ el cual es el analito a medir.

Como se ve en la **Tabla 4.16** se obtuvieron potenciales experimentales de una muestra con matriz adicionada con una concentración conocida de CO₂ cada uno se midió en una curva de calibración diferente, con la cual se logró obtener la concentración obtenida por el método el porcentaje de recobro brinda una relación de la concentración obtenida con la concentración que se esperaba. Con los recobros obtenidos se puede hacer un análisis de como la concentración puede tener cambios al usar este método al determinar CO₂, cuando la matriz se encuentra presente. La tabla muestra que el valor promedio es de 98.2% y que tiene un intervalo de $\pm 10.7\%$ (incluye el 100%) con un coeficiente de variación (CV) de 6.2%. Estos resultados indican que hay un efecto de matriz, el cual podría dar valores aparentes de concentración, por lo cual debe estar presente cuando se utilice este método.

Tabla 4.16. Resultados para el parámetro de Especificidad.

Estándar Adicionado.	Respuesta E (mV)	Concentración (ppm).	Porcentaje de Recobro (%)
1	-88.3	7581.05	94.74
2	-86.5	8163.92	102.03
3	-86.8	7820.84	97.74
IC(μ)			98.2 \pm 10.7
CV(%)			6.2

Con estos resultados se puede concluir que el método está validado y como lo muestra la **Tabla 4.17**, todos los parámetros cumplen con las especificaciones, las cuales indican que el método analítico puede ser utilizado para una correcta determinación de CO₂ en muestras realizadas en el laboratorio y será necesario ampliar esta validación a otro tipo diferente de muestras.

Tabla 4.17. Comparación de los datos experimentales con los parámetros de aceptación para la validación de métodos analíticos.

Parámetro	Criterios de aceptación	Resultados Experimentales
Linealidad	$R^2 \geq 0.98^{[3]}$	$R^2=0.9994$ $IC(\beta_1)=54.01 \pm 0.73 \text{mV}$ Intervalo: 8.89 ppm-280.92 ppm
Límite de detección (LD)		$1.5 \pm 0.04 \text{ ppm}$
Límite de cuantificación (LC)		$8.9 \pm 1.1 \text{ ppm}$
Sensibilidad	pendiente $\approx 59.16 \text{mV}^{[4]}$	$60.9 \pm 7.3 \text{mV}$
Precisión	$\%R \leq 10\%^{[6]}$	$R\&R=5.8\%$ Repetibilidad = 5.4% Reproducibilidad = 2.2%
Exactitud	$CV < 5\%$ $IC(\mu)$; debe incluir el 100% o el intervalo del promedio de %R se encuentre entre 95-105% ^[3]	$CV=2.73\%$ y 2.00% $IC(\mu)=99.7 \pm 2.9 \text{mV}$ y $99.6 \pm 2.1 \text{mV}$
Robustez	$ d_i \leq 3\%^{[3]}$	Temperatura: $ d_i =2.8\%$ Solución amortiguadora: $ d_i =3.4\%$ Sistema Cerrado: $ d_i =6.5\%$
Especificidad	La respuesta del método sólo se deberá al analito	$IC(\mu)=98.2 \pm 10.7$

4.2 RESULTADOS PARA LA DETERMINACIÓN DE CO₂ USANDO EL MÉTODO VALIDADO (CURVA DE CALIBRACIÓN).

Se aplicó la metodología validada para la determinación de CO₂ por curva de calibración a diferentes refrescos (Coca-Cola, Coca-Cola Light, Coca-Cola Zero, Coca-Cola Light sin Cafeína, Pepsi, Pepsi Light, Pepsi Max, Pepsi Kick, Diet Rite Cola, Red Cola Light). Los cuales se muestran a continuación.

Curva de Calibración

Tabla 4.18. Resultados para la obtención de la curva de calibración los estándares fueron preparados a partir de un estándar de 999.38 ppm de CO₂.

Concentración de estándar (ppm)	Concentración de alícuota (ppm)	Logaritmo de la concentración de alícuota ($\log C$)	Potenciales (E , mV)		
24.98	22.18	1.35	-131.1	-131.1	-131.0
34.98	31.05	1.49	-124.9	-124.8	-124.7
44.97	39.92	1.60	-118.5	-118.4	-118.3
59.96	53.22	1.73	-112.0	-112.0	-111.9
79.95	70.96	1.85	-105.2	-105.1	-105.1
109.93	97.57	1.99	-97.7	-97.7	-97.8
149.91	133.05	2.12	-90.2	-90.1	-90.2

Tabla 4.19. Tabla de resultados que muestra los coeficientes para la recta obtenida al graficar los datos de la **tabla 4.17** (**Fig. 4.5**).

Parámetro	Mínimos cuadrados estimados	Error Estándar (S)
Ordenada al origen b	-203.847	0.6736
Pendiente m	53.3934	0.3846
	IC(β_1)(mV) al 97.5% de confianza	53.39±0.99

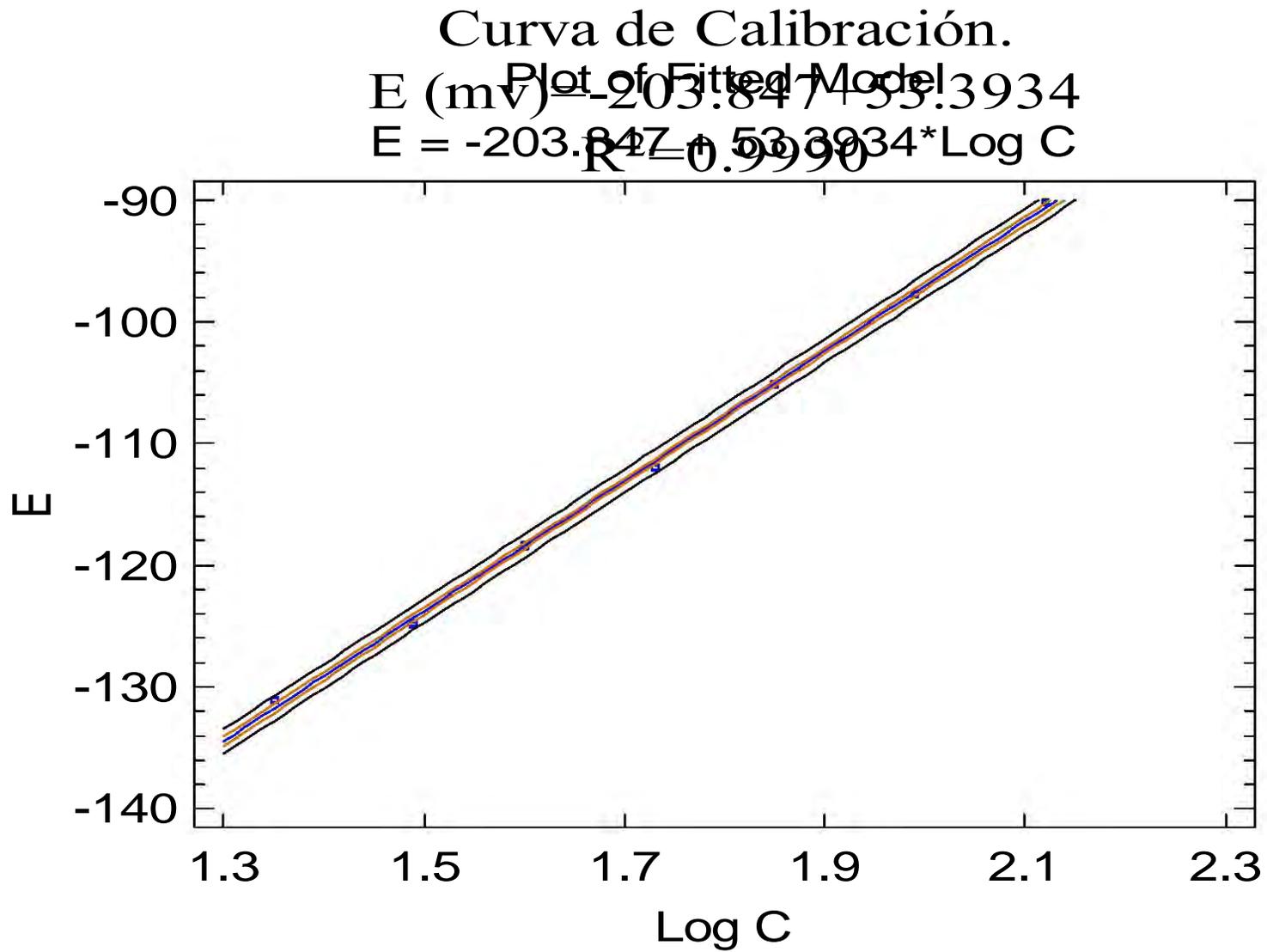


Fig.4.5. Gráfica que muestra la intersección de las respuestas promedio a bajas concentraciones y la ecuación de linealidad con respuesta *nernstiana*.

Tabla 4.20. Resultados Experimentales para las diferentes marcas de refresco, se determinó experimentalmente el potencial de cada muestra por triplicado, con la Curva de Calibración (**Fig. 4.5**) y la ecuación de regresión se obtuvieron los valores de *Log C* (ver anexo 2 para cálculos de la concentración y sus límites de confianza); obteniendo finalmente la concentración para cada marca de refresco contenido en envases de PET de 600 mL (tomando en cuenta las diluciones realizadas).

Marca de Refresco	Potenciales experimentales (E) mV			log C			Concentración de CO ₂ en refrescos de cola (g/L).
Coca-Cola	-106.7	-106.6	-106.5	1.82	1.82	1.82	7.65±0.11
Coca-Cola Light	-107.5	-107.5	-107.5	1.80	1.80	1.80	7.36±0.11
Coca-Cola Zero	-106.7	-106.6	-106.6	1.82	1.82	1.82	7.64±0.11
Coca-Cola Light Sin Cafeína	-108.4	-108.3	-108.3	1.79	1.79	1.79	7.10±0.11
Pepsi	-107.2	-107.2	-107.2	1.81	1.81	1.81	7.46±0.11
Pepsi Light	-110.0	-110.0	-110.0	1.76	1.76	1.76	6.61±0.11
Pepsi Max	-107.2	-107.3	-107.3	1.81	1.81	1.81	7.44±0.11
Pepsi Kick	-107.8	-107.7	-107.7	1.80	1.80	1.80	7.29±0.11
Diet Rite Cola	-108.5	-108.5	-108.5	1.79	1.79	1.79	7.05±0.11
Red Cola Light	-106.2	-106.3	-106.3	1.83	1.83	1.83	7.76±0.11

Como se puede observar en la **Tabla 4.20** se logró determinar la concentración de CO₂ utilizando el método validado (curva de calibración **Tablas 4.18, 4.19 y Fig. 4.5**), el cual presenta resultados aceptables, pues los valores son muy cercanos a los valores reportados de CO₂ en bebidas gaseosas (6g/L) (Baur, 2006), en este caso de refrescos de cola, una ventaja de este método es su rapidez para la determinación de una gran serie de muestras, pues con una sola curva de calibrado se pueden medir varias muestras problema en cuestión de minutos. Además este método tiene la ventaja que se encuentra validado por lo cual se

sabrán los factores que afectan al analito y por lo tanto se sabrá la fuente que puede provocar la incertidumbre que presente el resultado.

Esta metodología puede ser utilizada en prácticas de docencia a nivel licenciatura en carreras afines al área de la química por la versatilidad y facilidad de conceptos que este presenta y que no requieren una exactitud y precisión tan elevada. Pero también puede ser utilizado para otro tipo de análisis a nivel industrial teniendo en cuenta la exactitud y precisión que este presenta en diferentes matrices.

4.3 RESULTADOS EXPERIMENTALES Y ANÁLISIS DE RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE CO₂ UTILIZANDO EL MÉTODO DE ADICIONES PATRÓN.

Se aplicó la metodología para la determinación de CO₂ por adiciones patrón a volumen constante para determinar el contenido de CO₂ en diferentes refrescos (Pepsi, Pepsi Max, Pepsi Kick, Pepsi Light, Red Cola, Red Cola Light, Diet Rite Cola, Coca-Cola, Coca-Cola Zero, Coca-Cola Light y Peñafiel sabor Fresa). Los cuales se muestran a continuación. Se muestra una curva de calibración (**Fig. 4.6**) con la cual se determinó el valor S que en este método equivale al valor de la pendiente.

Curva de Calibración.

Tabla 4.21. Resultados para la obtención de la curva de calibración para obtener el valor $S=pendiente$, para utilizarlo en el método de adiciones patrón, los estándares fueron preparados a partir de un estándar de 1002.11 ppm de CO₂.

Concentración de estándar (ppm)	Concentración de alícuota (ppm)	Logaritmo de la concentración de alícuota ($\log C$)	Potenciales (E , mV)		
20.04	17.79	1.25	-130.1	-129.8	-129.7
25.05	22.24	1.35	-122.4	-122.4	-122.5
35.07	31.13	1.49	-115.4	-115.5	-115.6
45.09	40.03	1.60	-108.6	-108.5	-108.6
60.13	53.37	1.73	-100.9	-100.9	-100.9
80.17	71.16	1.85	-94.2	-94.2	-94.4
110.23	97.84	1.99	-85.2	-85.2	-85.2
150.32	133.42	2.13	-77.8	-77.8	-77.9

Tabla 4.22. Parámetros estadísticos, para la curva de calibración. Se calcularon a partir de las fórmulas del Anexo 2, se le llamará S al valor de pendiente sólo para la determinación de CO₂ por adiciones patrón; no confundir con el Error Estándar (S).

Parámetro	Mínimos cuadrados estimados	Error Estándar (S)
Ordenada al origen b	-202.72	0.6195
Pendiente S	58.79	0.3647
	IC(β_1)(mV) al 97.5% de confianza	58.79±0.89

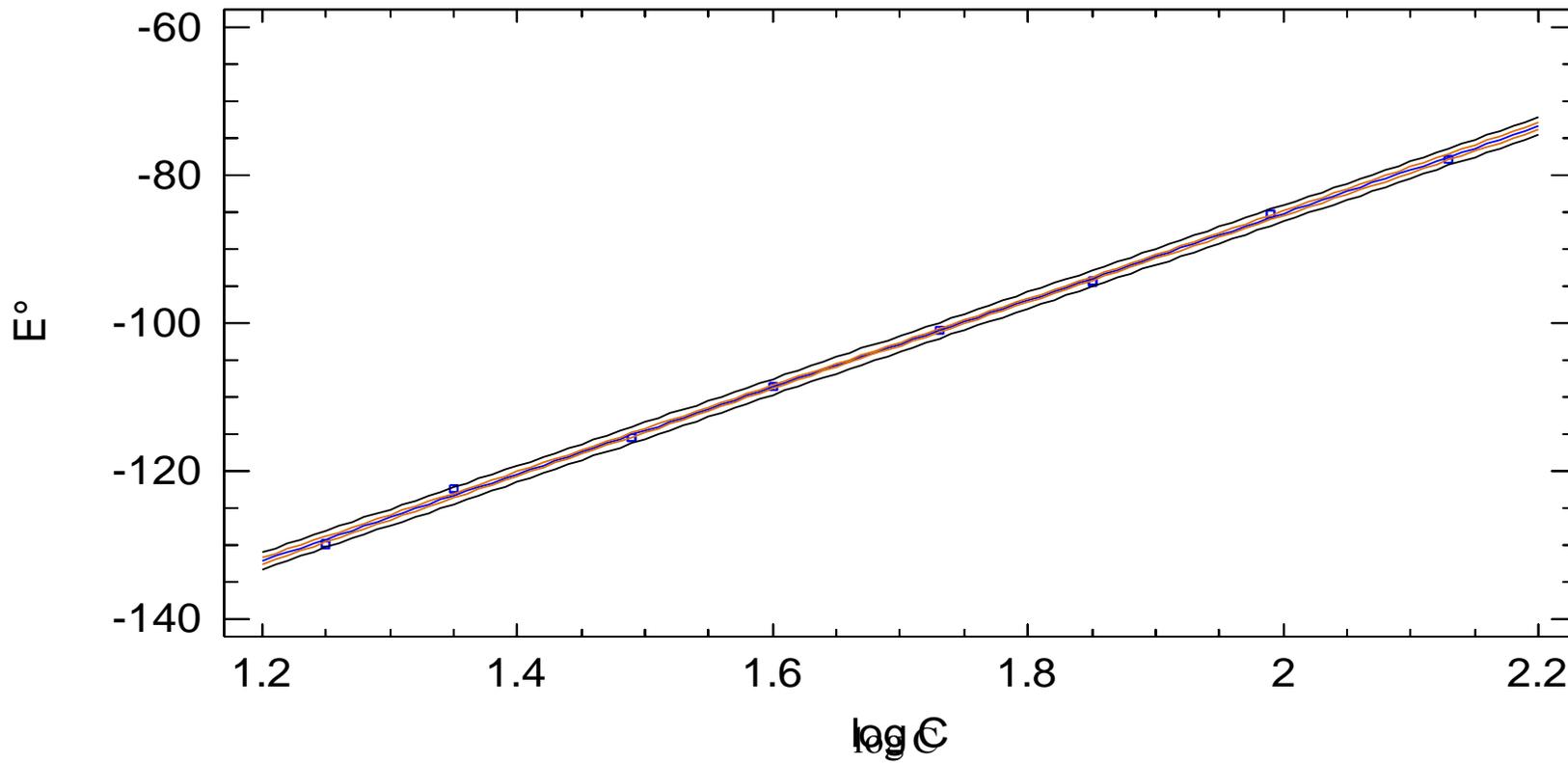
Curva de calibración para la determinación del valor S para la determinación por

Adiciones Patrón.

Plot of Fitted Model

$$E = -202.72 + 58.79(\log C)$$

$$E^\circ = -202.71992 + 58.7888 \cdot \log C$$



Curva de adiciones patrón para: Pepsi.

Tabla 4.23. Resultados para la marca de refrescos *Pepsi*. El potencial E es el potencial cuando $C_{std}=0$ y E' son los valores obtenidos a cada adición de estándar, como se puede observar los datos de *respuesta* y de C_{std} indican los valores para y y x respectivamente, para la ecuación de línea recta $(10^{E'-E/S})=1+(1/C_{desc})(C_{std})$ que se plantea en la introducción para el método de adiciones patrón a volumen constante para una sonda sensible a CO₂.

Concentración de estándar concentrado	Concentración de estándar (C_{std})	E'	Respuesta ($10^{E'-E/S}$); $S=58.79$
ppm	x, ppm	mV	y, mL
0	0	-120.8	1.00
25.05	22.24	-103.4	1.98
35.07	31.13	-99.7	2.29
45.09	40.03	-95.5	2.70
60.13	53.37	-89.6	3.40
80.17	71.16	-85.1	4.05
110.23	97.84	-78.5	5.24
150.32	133.42	-73.6	6.36
200.42	177.89	-66.7	8.33

Tabla 4.24. Muestra los valores de pendiente m y de ordenada al origen b que se obtuvieron de la **Fig. 4.7** y del análisis de regresión para *Pepsi* (Ver anexo). El valor de C_{pepsi} es la concentración del refresco sin diluciones.

Pendiente m	Ordenada b	R^2	C_{desc} (ppm)	C_{pepsi} (g/L)
0.0405	1.1205	0.9976	24.70±0.49	7.1±1.99

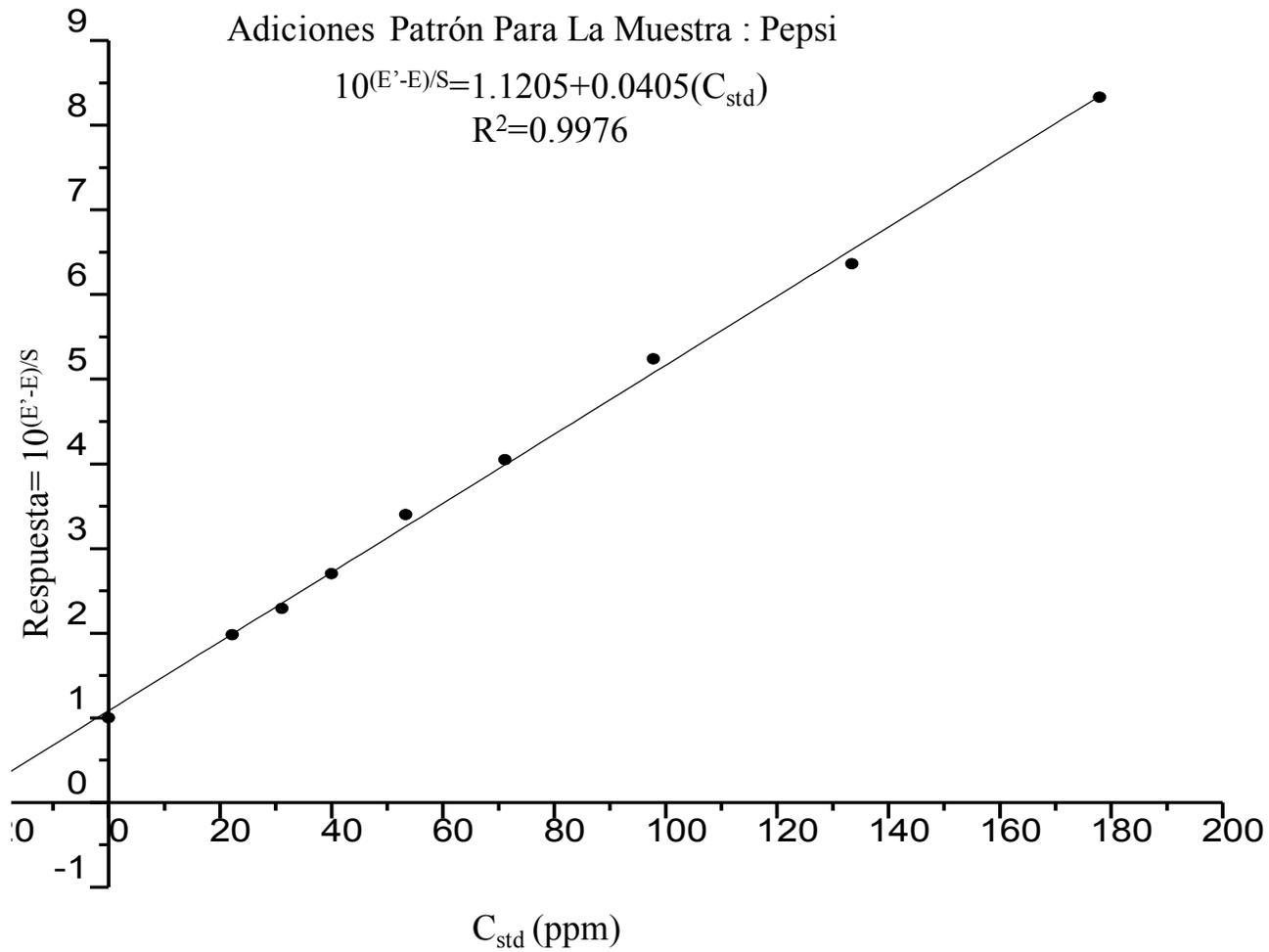


Fig.4.7. Curva de Adiciones patrón a volumen constante para la muestra comercial *Pepsi*. Se muestra la Ecuación que corresponde a la curva y el valor de R².

Curva de adiciones patrón para: Pepsi Max.

Tabla 4.25. Resultados para la marca de refrescos *Pepsi Max*. El potencial E es el potencial cuando $C_{std}=0$ y E' son los valores obtenidos a cada adición de estándar, como se puede observar los datos de *respuesta* y de C_{std} indican los valores para y y x respectivamente, para la ecuación de línea recta $(10^{E'-E/S})=1+(1/C_{desc})(C_{std})$ que se plantea en la introducción para el método de adiciones patrón a volumen constante para una sonda sensible a CO₂.

Concentración de estándar concentrado.	Concentración de alícuota (C_{std})	E'	Respuesta ($10^{E'-E/S}$); $S=58.79$
ppm	x, ppm	mV	y, mL
0	0	-131.2	1.00
20.05	17.80	-115.1	1.88
25.06	22.25	-112.4	2.09
35.09	31.14	-107.4	2.54
45.11	40.04	-103.9	2.91
60.15	53.39	-99.7	3.43
80.20	71.19	-94.57	4.20

Tabla 4.26. Muestra los valores de pendiente m y de ordenada al origen b que se obtuvieron de la Fig. 4.8 y del análisis de regresión para *Pepsi Max* (Ver anexo). El valor de $C_{pepsimax}$ es la concentración del refresco sin diluciones.

Pendiente m	Ordenada b	R^2	C_{desc} (ppm)	$C_{pepsimax}$ (g/L)	Incertidumbre relativa (%)
0.0431	1.1460	0.9985	23.19±0.45	6.70±1.95	1.95

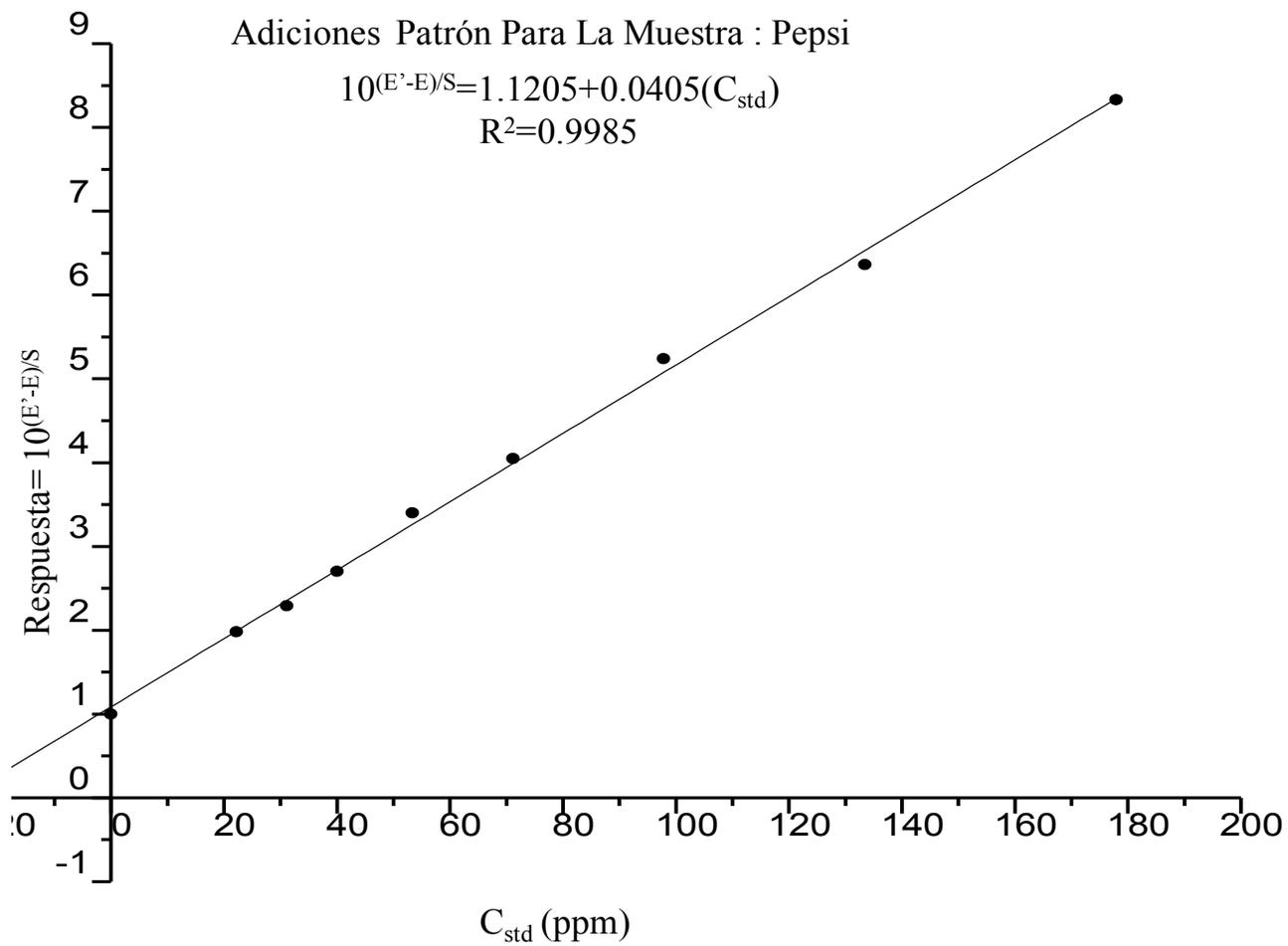


Fig. 4.8. Curva de Adiciones Patrón a volumen constante para la muestra comercial *Pepsi Max*. Se muestra la Ecuación que corresponde a la curva y al valor de R².

Curva de adiciones patrón para: Pepsi Kick.

Tabla 4.27. Resultados para la marca de refrescos *Pepsi Kick*. El potencial E es el potencial cuando $C_{std}=0$ y E' son los valores obtenidos a cada adición de estándar, como se puede observar los datos de *respuesta* y de C_{std} indican los valores para y y x respectivamente, para la ecuación de línea recta $(10^{E'-E/S})=1+(1/C_{desc})(C_{std})$ que se plantea en la introducción para el método de adiciones patrón a volumen constante para una sonda sensible a CO₂.

Concentración de estándar concentrado.	Concentración de estándar (C_{std})	E'	Respuesta ($10^{E'-E/S}$); S=58.79
ppm	x, ppm	mV	y, mL
0	0	-131.9	1.00
20.05	17.80	-116.3	1.84
25.06	22.25	-112.5	2.14
35.09	31.14	-108.2	2.53
45.11	40.04	-104.9	2.88
60.15	53.39	-101.6	3.28
80.20	71.19	-94.6	4.31

Tabla 4.28. Muestra los valores de pendiente m y de ordenada al origen b que se obtuvieron de la **Fig. 4.9** y del análisis de regresión para *Pepsi Kick* (Ver anexo). El valor de $C_{PepsiKick}$ es la concentración del refresco sin diluciones.

Pendiente m	Ordenada b	R^2	C_{desc} (ppm)	$C_{PepsiKick}$ (g/L)
0.0438	1.1099	0.9890	22.86±1.20	6.60±5.26

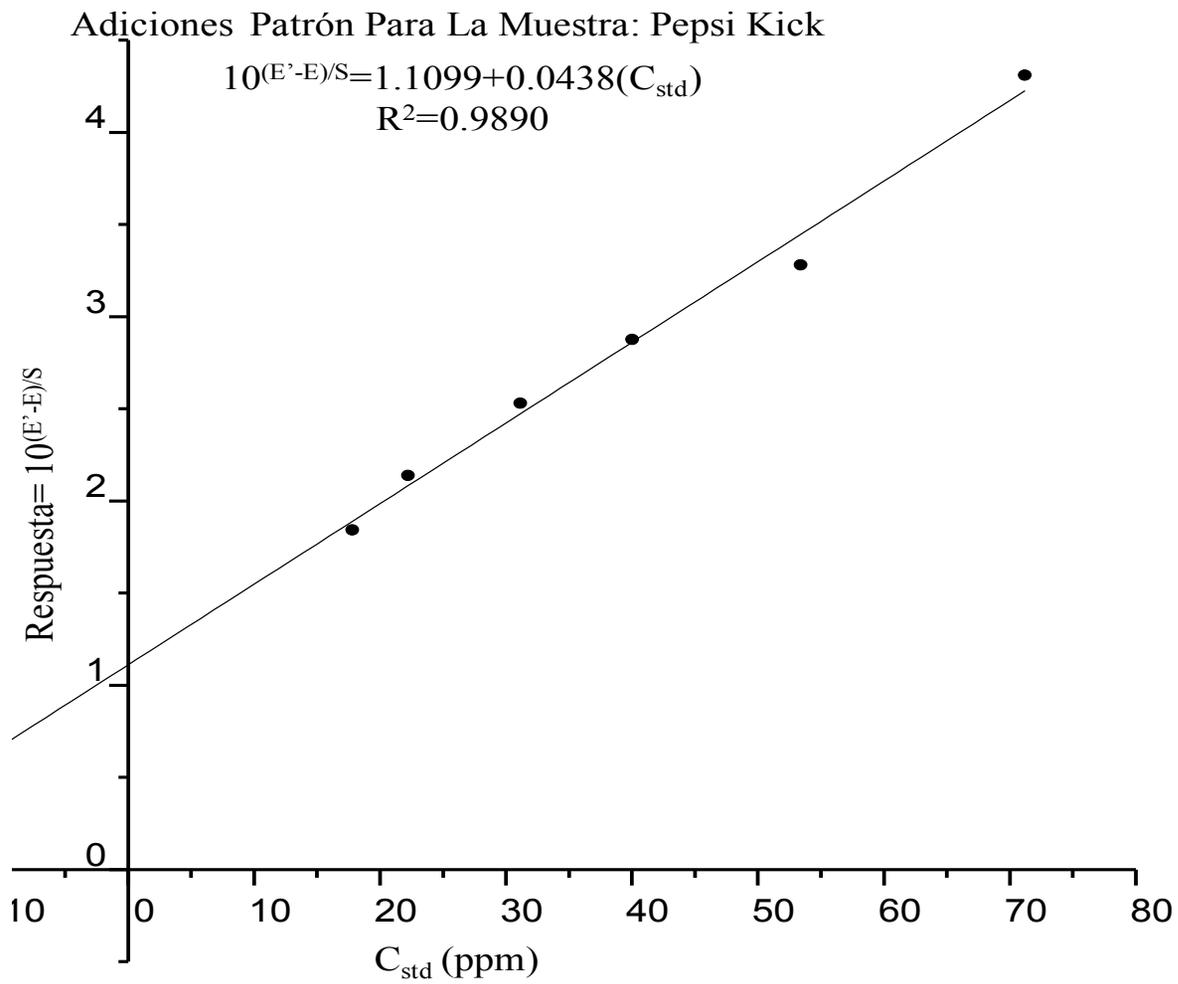


Fig. 4.9. Curva de Adiciones patrón a volumen constante para la muestra comercial *Pepsi Kick*. Se muestra la ecuación que corresponde a la curva y el valor de R^2 .

Curva de adiciones patrón para: Pepsi Light.

Tabla 4.29. Resultados para la marca de refrescos *Pepsi Light*. El potencial E es el potencial cuando $C_{std}=0$ y E' son los valores obtenidos a cada adición de estándar, como se puede observar los datos de *respuesta* y de C_{std} indican los valores para y y x respectivamente, para la ecuación de línea recta $(10^{E'-E/S})=1+(1/C_{desc})(C_{std})$ que se plantea en la introducción para el método de adiciones patrón a volumen constante para una sonda sensible a CO₂.

Concentración de estándar concentrado	Concentración de estándar. (C_{std})	E'	Respuesta (10^{E'-E/S}); S=58.79
ppm	x, ppm	mV	y, mL
0	0	-129.8	1.00
19.98	17.73	-115.4	1.75
24.97	22.16	-111.8	2.02
34.96	31.03	-107.1	2.43
44.95	39.90	-102.9	2.87
59.93	53.19	-99.2	3.32
79.91	70.92	-94.0	4.06

Tabla 4.30. Muestra los valores de pendiente m y de ordenada al origen b que se obtuvieron de la Fig. 4.10 y del análisis de regresión para *Pepsi Light* (Ver anexo). El valor de $C_{pepsilight}$ es la concentración del refresco sin diluciones.

Pendiente m	Ordenada b	R²	C_{desc} (ppm)	C_{pepsilight} (g/L)
0.0426	1.0729	0.9952	23.46±0.81	6.77±3.47

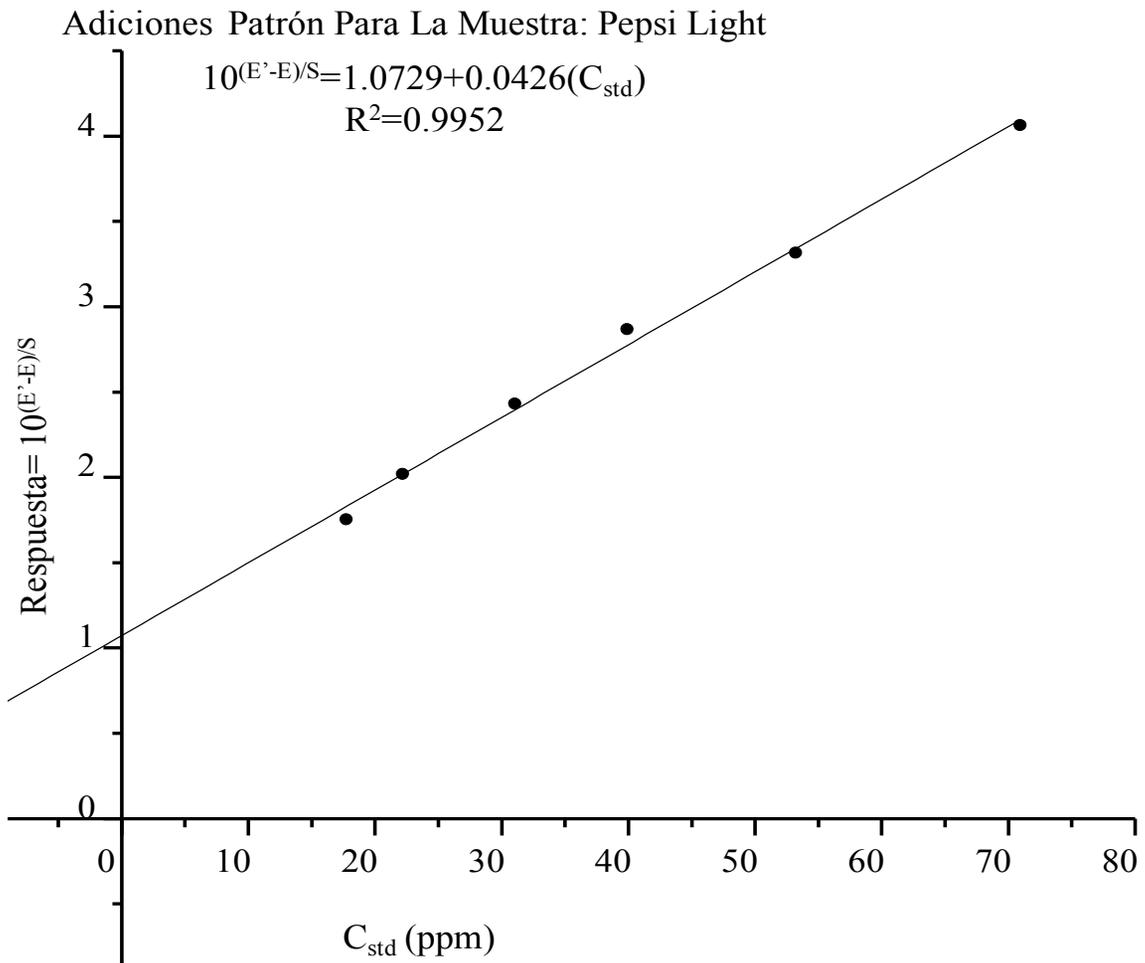


Fig. 4.10. Curva de Adiciones patrón a volumen constante para la muestra comercial *Pepsi Light*. Se muestra la ecuación que corresponde a la curva y el valor de R^2 .

Curva de adiciones patrón para: Red Cola.

Tabla 4.31. Resultados para la marca de refrescos *Red Cola*. El potencial E es el potencial cuando $C_{std}=0$ y E' son los valores obtenidos a cada adición de estándar, como se puede observar los datos de *respuesta* y de C_{std} indican los valores para y y x respectivamente, para la ecuación de línea recta $(10^{E'-E/S})=1+(1/C_{desc})(C_{std})$ que se plantea en la introducción para el método de adiciones patrón a volumen constante para una sonda sensible a CO₂.

Concentración de estándar concentrado.	Concentración de estándar. (C_{std})	E'	Respuesta ($10^{E'-E/S}$); $S=58.79$
ppm	x, ppm	mV	y, mL
0	0	-132.8	1.00
20.05	17.80	-117.5	1.82
25.06	22.25	-115.0	2.01
35.09	31.14	-108.2	2.61
45.11	40.04	-104.5	3.02
60.15	53.39	-101.0	3.47
80.20	71.19	-96.3	4.17

Tabla 4.32. Muestra los valores de pendiente m y de ordenada al origen b que se obtuvieron de la Fig. 4.11 y del análisis de regresión para *Red Cola* (Ver anexo). El valor de $C_{RedCola}$ es la concentración del refresco sin diluciones.

Pendiente m	Ordenada b	R^2	C_{desc} (ppm)	$C_{RedCola}$ (g/L)
0.0440	1.1219	0.9857	22.74±1.37	6.57±6.03

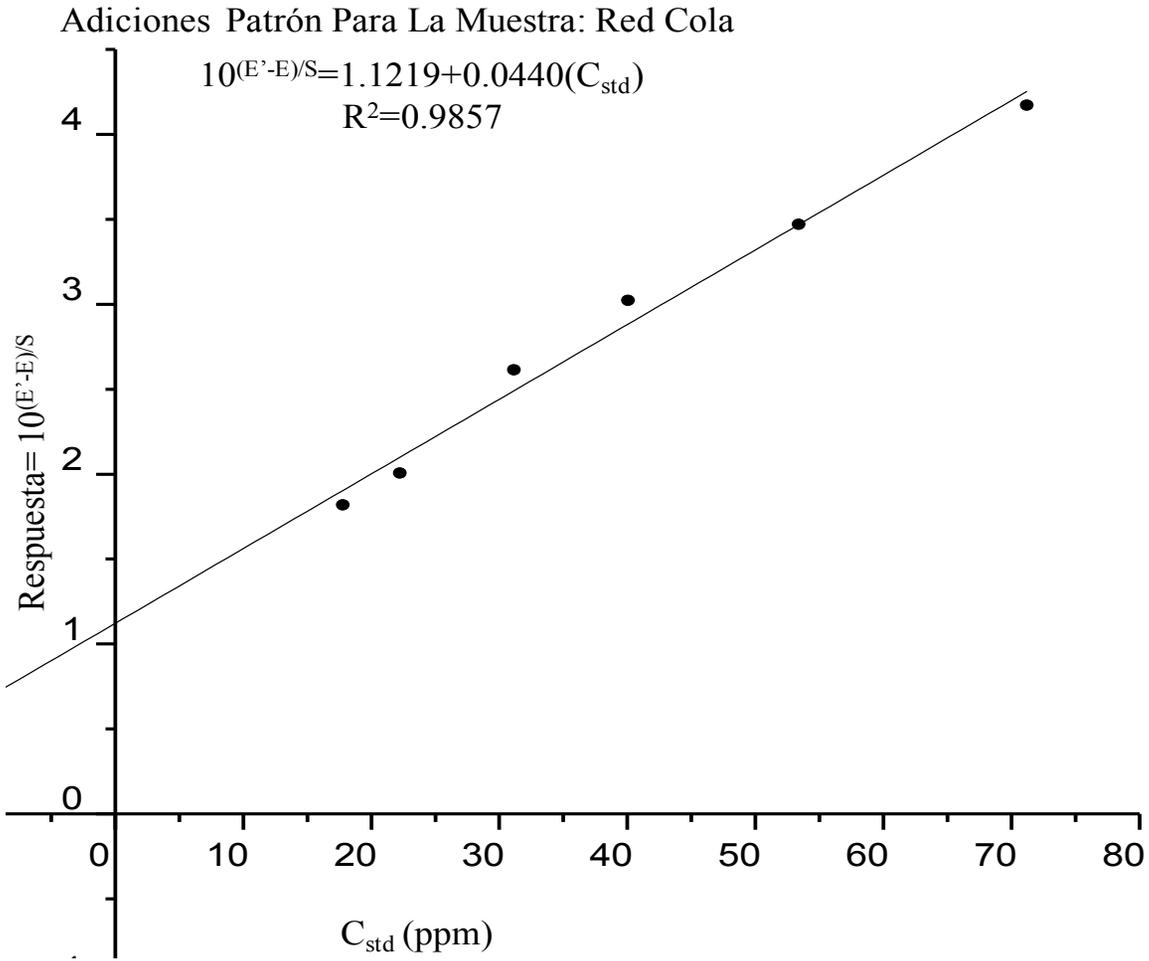


Fig. 4.11. Curva de Adiciones patrón a volumen constante para la muestra comercial *Red Cola*. Se muestra la ecuación que corresponde a la curva y el valor de R^2 .

Curva de adiciones patrón para: Red Cola Light.

Tabla 4.33. Resultados para la marca de refrescos *Red Cola Light*. El potencial E es el potencial cuando $C_{std}=0$ y E' son los valores obtenidos a cada adición de estándar, como se puede observar los datos de *respuesta* y de C_{std} indican los valores para y y x respectivamente, para la ecuación de línea recta $(10^{E'-E/S})=1+(1/C_{desc})(C_{std})$ que se plantea en la introducción para el método de adiciones patrón a volumen constante para una sonda sensible a CO₂.

Concentración de estándar concentrado.	Concentración de estándar. (C_{std})	E'	Respuesta ($10^{E'-E/S}$); $S=58.79$
ppm	x, ppm	mV	y, mL
0	0	-131.8	1.00
20.05	17.80	-114.7	1.95
25.06	22.25	-111.8	2.19
35.09	31.14	-106.9	2.66
45.11	40.04	-103.7	3.01
60.15	53.39	-98.9	3.63
80.20	71.19	-93.4	4.51

Tabla 4.34. Muestra los valores de pendiente m y de ordenada al origen b que se obtuvieron de la **Fig. 4.12** y del análisis de regresión para *Red Cola Light* (Ver anexo). El valor de $C_{RedColaLight}$ es la concentración del refresco sin diluciones.

Pendiente m	Ordenada b	R^2	C_{desc} (ppm)	$C_{RedColaLight}$ (g/L)
0.0472	1.1360	0.9990	21.20±0.32	6.12±1.53

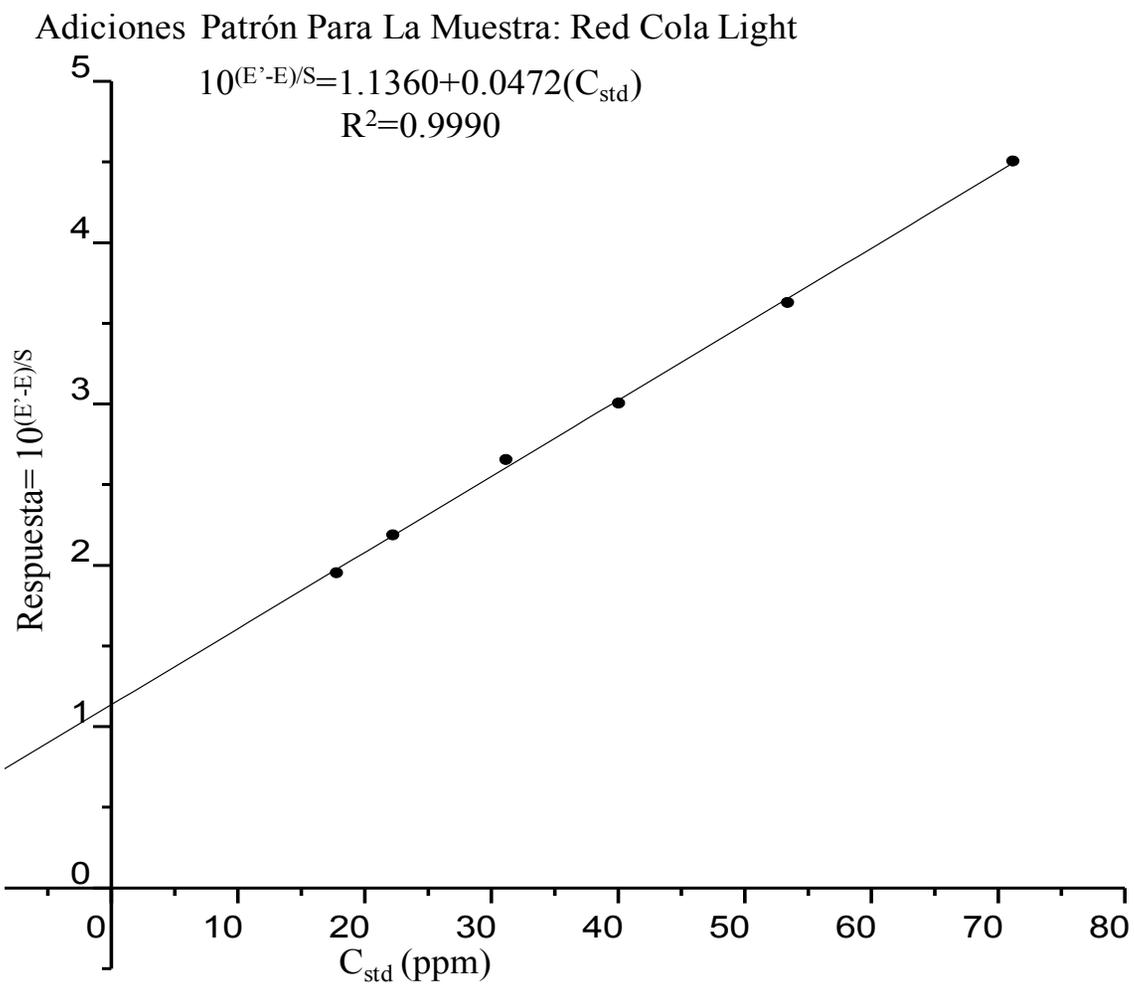


Fig. 4.12. Curva de Adiciones patrón a volumen constante para la muestra comercial *Red Cola Light*. Se muestra la ecuación que corresponde a la curva y el valor de R^2 .

Curva de adiciones patrón para: Diet Rite Cola.

Tabla 4.35. Resultados para la marca de refrescos *Diet Rite Cola*. El potencial E es el potencial cuando $C_{std}=0$ y E' son los valores obtenidos a cada adición de estándar, como se puede observar los datos de *respuesta* y de C_{std} indican los valores para y y x respectivamente, para la ecuación de línea recta $(10^{E'-E/S})=1+(1/C_{desc})(C_{std})$ que se plantea en la introducción para el método de adiciones patrón a volumen constante para una sonda sensible a CO₂.

Concentración de estándar concentrado.	Concentración de estándar (C_{std})	E'	Respuesta ($10^{E'-E/S}$); $S=58.79$
ppm	ppm	mV	y, mL
0	0	-126.3	1.000
20.05	17.80	-109.8	1.91
25.06	22.25	-107.8	2.06
35.09	31.14	-101.8	2.61
45.11	40.04	-97.8	3.05
60.15	53.39	-93.2	3.65
80.20	71.19	-89.3	4.26

Tabla 4.36. Muestra los valores de pendiente m y de ordenada al origen b que se obtuvieron de la Fig. 4.13 y del análisis de regresión para *Diet Rite Cola* (Ver anexo). El valor de $C_{DietRiteCola}$ es la concentración del refresco sin diluciones.

Pendiente m	Ordenada b	R^2	C_{desc} (ppm)	$C_{DietRiteCola}$ (g/L)
0.0452	1.1464	0.9902	22.12±1.10	6.39±4.98

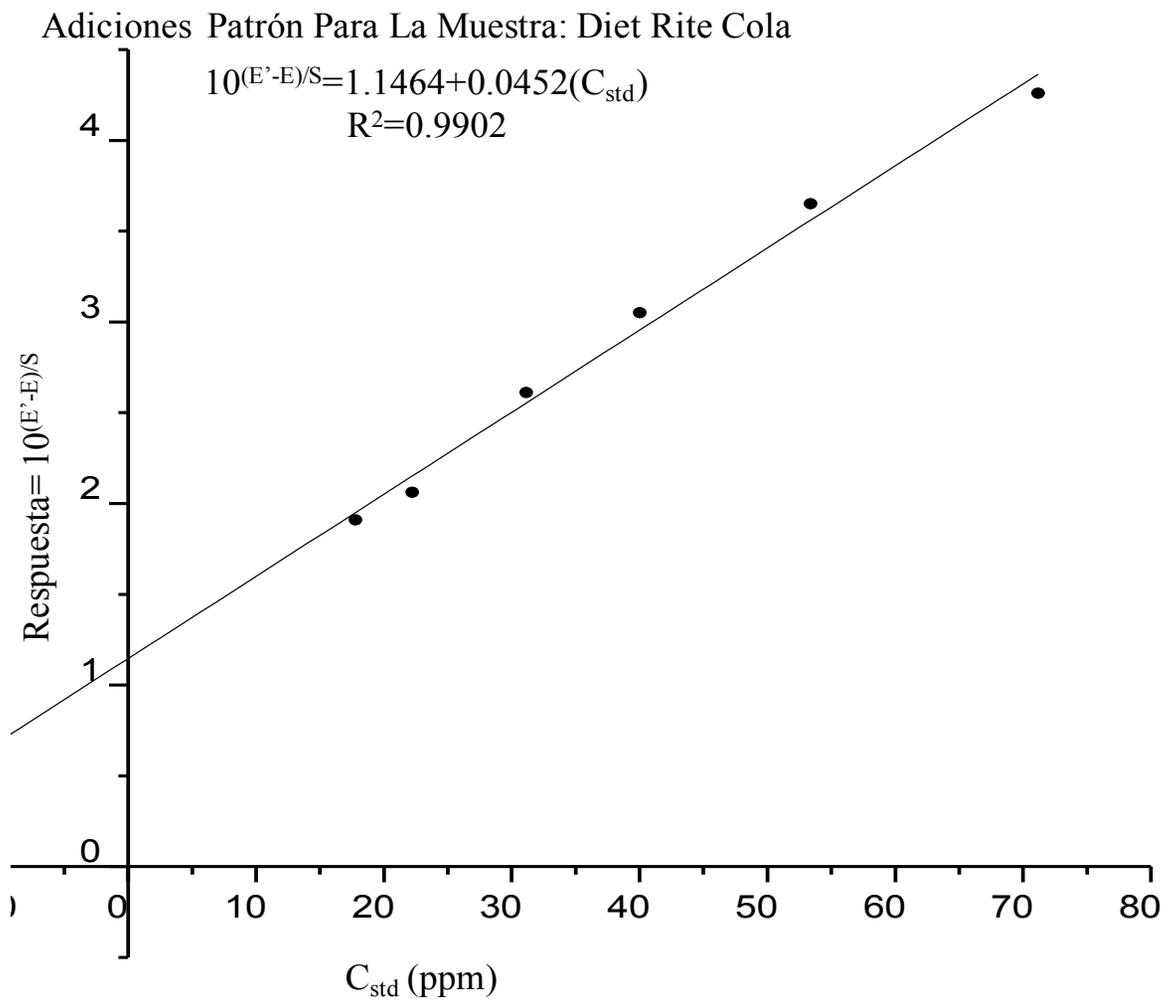


Fig. 4.13. Curva de Adiciones patrón a volumen constante para la muestra comercial *Diet Rite Cola*. Se muestra la ecuación que corresponde a la curva y el valor de R^2 .

Curva de adiciones patrón para: Coca-Cola.

Tabla 4.37. Resultados para la marca de refrescos *Coca-Cola*. El potencial E es el potencial cuando $C_{std}=0$ y E' son los valores obtenidos a cada adición de estándar, como se puede observar los datos de *respuesta* y de C_{std} indican los valores para y y x respectivamente, para la ecuación de línea recta $(10^{E'-E/S})=1+(1/C_{desc})(C_{std})$ que se plantea en la introducción para el método de adiciones patrón a volumen constante para una sonda sensible a CO₂.

Concentración de estándar concentrado.	Concentración de estándar (C_{std})	E'	Respuesta ($10^{E'-E/S}$); $S=58.79$
ppm	x, ppm	mV	y, mL
0	0	-130.0	1.00
20.00	17.75	-110	2.22
24.99	22.18	-108.4	2.36
34.99	31.06	-104.2	2.79
44.99	39.93	-101.5	3.11
59.99	53.24	-96.8	3.75
79.98	70.99	-89.8	4.96
109.98	97.61	-86	5.77
149.97	133.11	-80	7.33
199.96	177.48	-73.3	9.57

Tabla 4.38. Muestra los valores de pendiente m y de ordenada al origen b que se obtuvieron de la **Fig. 4.14** y del análisis de regresión para *Coca-Cola* (Ver anexo). El valor de $C_{Cocacola}$ es la concentración del refresco sin diluciones.

Pendiente m	Ordenada b	R^2	C_{desc} (ppm)	$C_{Cocacola}$ (g/L)
0.0458	1.3785	0.9969	21.83±0.46	6.30±2.10

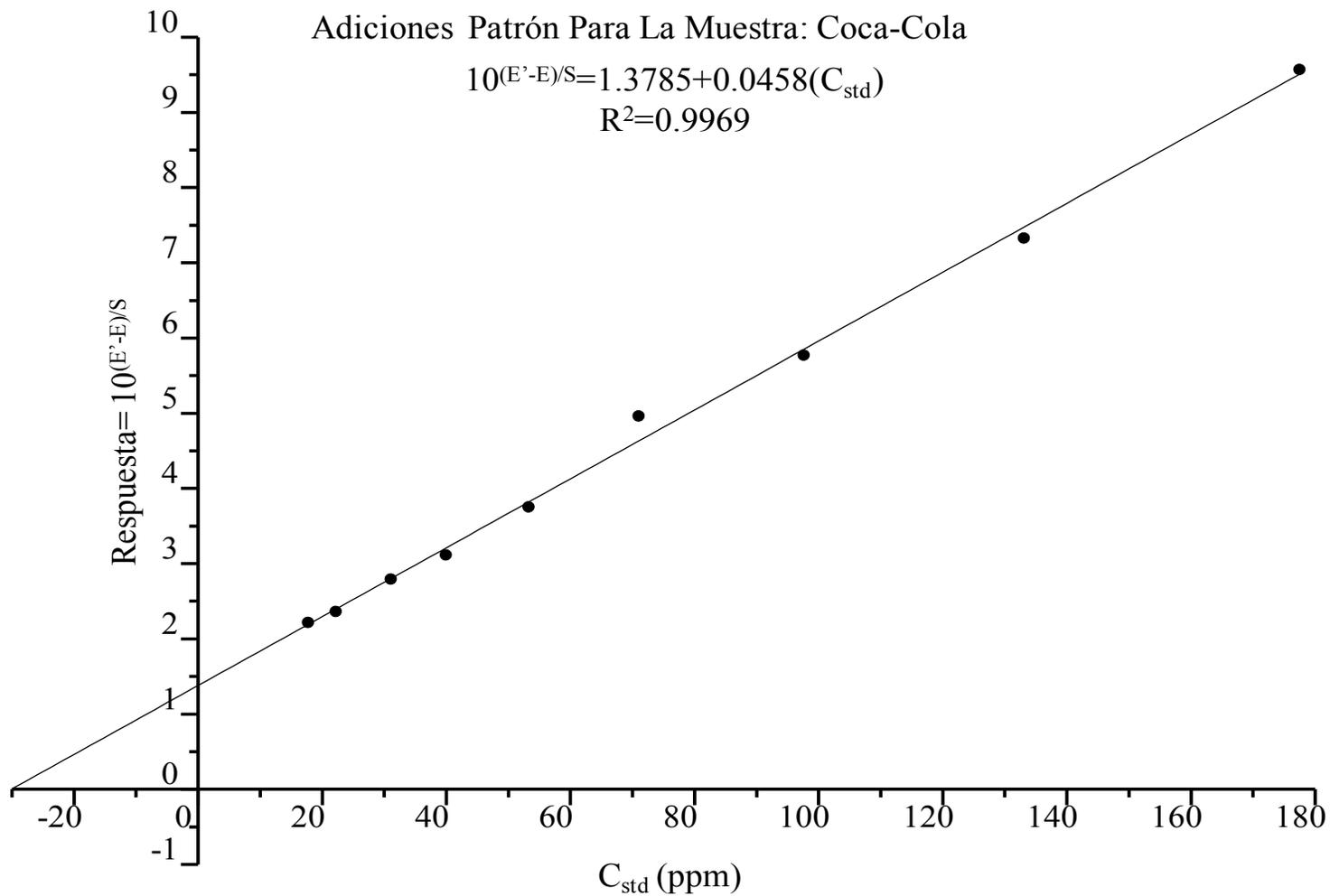


Fig. 4.14. Curva de Adiciones patrón a volumen constante para la muestra comercial *Coca-Cola*. Se muestra la ecuación que corresponde a la curva y el valor de R^2 .

Curva de adiciones patrón para: Coca-Cola Zero.

Tabla 4.39. Resultados para la marca de refrescos *Coca-Cola Zero*. El potencial E es el potencial cuando $C_{std}=0$ y E' son los valores obtenidos a cada adición de estándar, como se puede observar los datos de *respuesta* y de C_{std} indican los valores para y y x respectivamente, para la ecuación de línea recta $(10^{E'-E/S})=1+(1/C_{desc})(C_{std})$ que se plantea en la introducción para el método de adiciones patrón a volumen constante para una sonda sensible a CO₂.

Concentración de estándar concentrado.	Concentración de estándar. (C_{std})	E'	Respuesta ($10^{E'-E/S}$); $S=58.79$
ppm	ppm	mV	y, mL
0	0	-122.6	1.00
20.05	17.80	-107.1	1.84
25.06	22.25	-105.1	1.98
35.09	31.14	-100.3	2.39
45.11	40.04	-94.8	2.97
60.15	53.39	-92.3	3.27
80.20	71.19	-85.1	4.34

Tabla 4.40. Muestra los valores de pendiente m y de ordenada al origen b que se obtuvieron de la Fig. 4.15 y del análisis de regresión para *Coca-Cola Zero* (Ver anexo). El valor de $C_{Coca-colaZero}$ es la concentración del refresco sin diluciones.

Pendiente m	Ordenada b	R^2	C_{desc} (ppm)	$C_{Coca-colaZero}$ (g/L)
0.0462	0.9846	0.9917	21.66±1.25	6.25±5.75

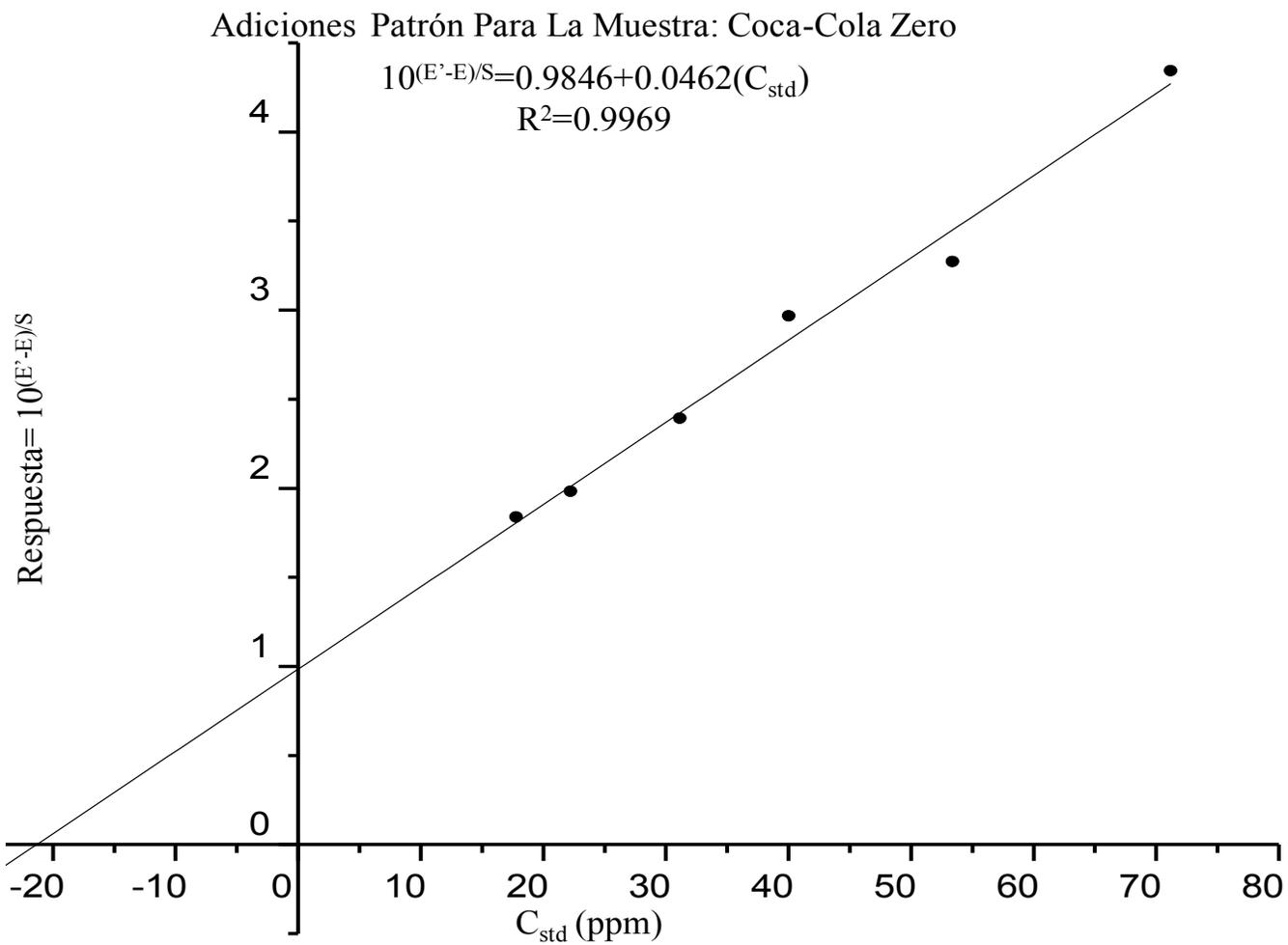


Fig. 4.15. Curva de Adiciones patrón a volumen constante para la muestra comercial *Coca-Cola Zero*. Se muestra la ecuación que corresponde a la curva y el valor de R^2 .

Curva de adiciones patrón para: Coca-Cola Light.

Tabla 4.41. Resultados para la marca de refrescos *Coca-Cola Light*. El potencial E es el potencial cuando $C_{std}=0$ y E' son los valores obtenidos a cada adición de estándar, como se puede observar los datos de *respuesta* y de C_{std} indican los valores para y y x respectivamente, para la ecuación de línea recta $(10^{E'-E/S})=1+(1/C_{desc})(C_{std})$ que se plantea en la introducción para el método de adiciones patrón a volumen constante para una sonda sensible a CO₂.

Concentración de estándar concentrado.	Concentración de estándar (C_{std})	E'	Respuesta ($10^{E'-E/S}$); $S=58.79$
ppm	x, ppm	mV	y, mL
0	0	-130.7	1.000
19.98	17.73	-114.8	1.86
24.97	22.16	-113.3	1.97
34.96	31.03	-108.3	2.40

Tabla 4.42. Muestra los valores de pendiente m y de ordenada al origen b que se obtuvieron de la **Fig. 4.16** y del análisis de regresión para *Coca-Cola Light* (Ver anexo). El valor de $C_{cocolaLight}$ es la concentración del refresco sin diluciones.

Pendiente m	Ordenada b	R^2	C_{desc} (ppm)	$C_{cocolaLight}$ (g/L)
0.04204	1.0845	0.9827	23.79±3.16	6.867±13.27

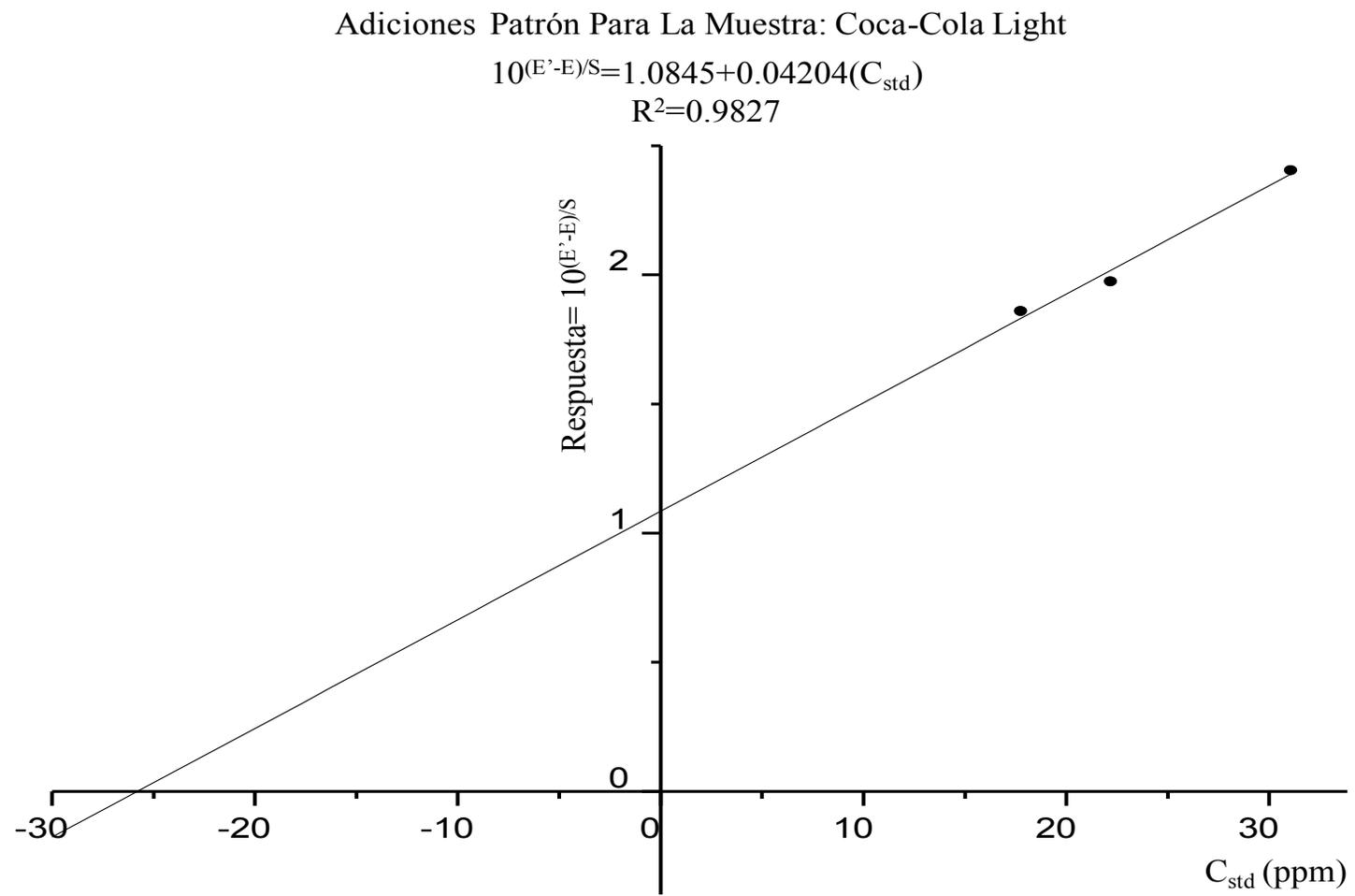


Fig. 4.16. Curva de Adiciones patrón a volumen constante para la muestra comercial *Coca-Cola Light*. Se muestra la ecuación que corresponde a la curva y el valor de R².

Curva de adiciones patrón para: Coca-Cola Light Sin Cafeína.

Tabla 4.43. Resultados para la marca de refrescos *Coca-Cola Light Sin Cafeína*. El potencial E es el potencial cuando $C_{std}=0$ y E' son los valores obtenidos a cada adición de estándar, como se puede observar los datos de *respuesta* y de C_{std} indican los valores para y y x respectivamente, para la ecuación de línea recta ($10^{E'-E/S}$) = $1 + (1/C_{desc})(C_{std})$ que se plantea en la introducción para el método de adiciones patrón a volumen constante para una sonda sensible a CO₂.

Concentración de estándar concentrado.	Concentración de estándar (C_{std})	E'	Respuesta ($10^{E'-E/S}$); $S=58.79$
ppm	x, ppm	mV	y
0	0	-131.2	1.00
19.98	17.73	-117.3	1.73
24.97	22.16	-113.2	2.02
34.96	31.03	-108.6	2.43
44.95	39.90	-105.0	2.79
59.93	53.19	-100.1	3.39
79.91	70.92	-94.5	4.22

Tabla 4.44. Muestra los valores de pendiente m y de ordenada al origen b que se obtuvieron de la Fig. 4.17 y del análisis de regresión para *Coca-Cola Light Sin Cafeína* (Ver anexo). El valor de $C_{CCLsinCafe}$ es la concentración del refresco sin diluciones.

Pendiente m	Ordenada b	R^2	C_{desc} (ppm)	$C_{CCLsinCafe}$ (g/L)
0.0457	0.9718	0.9985	21.88±0.42	6.32±1.91

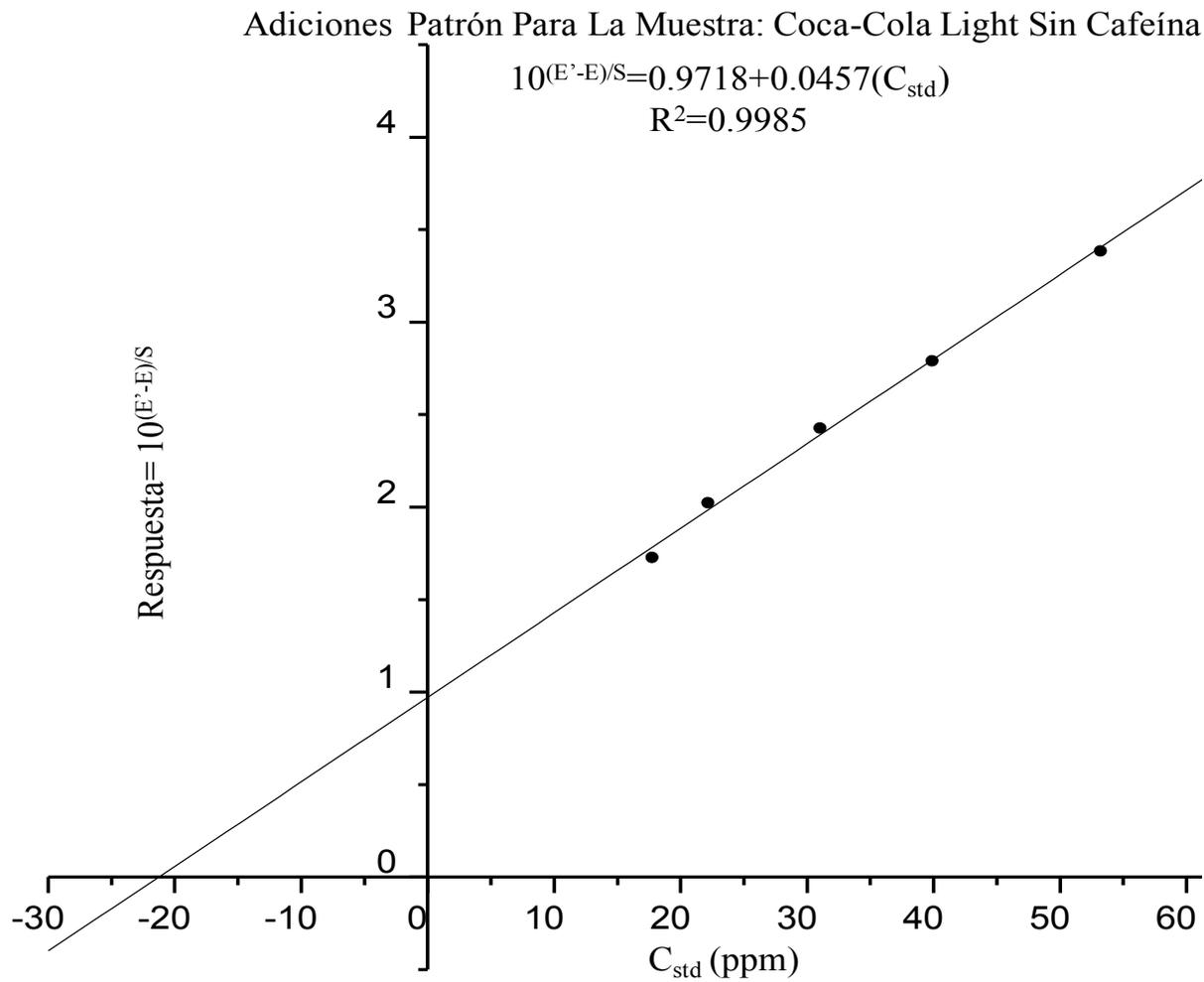


Fig. 4.17. Curva de Adiciones patrón a volumen constante para la muestra comercial *Coca-Cola Light Sin Cafeína*. Se muestra la ecuación que corresponde a la curva y el valor de R^2 .

Curva de adiciones patrón para: Peñafiel sabor Fresa.

Tabla 4.45. Resultados para la marca de refrescos *Peñafiel sabor Fresa*. El potencial E es el potencial cuando $C_{std}=0$ y E' son los valores obtenidos a cada adición de estándar, como se puede observar los datos de *respuesta* y de C_{std} indican los valores para y y x respectivamente, para la ecuación de línea recta $(10^{E'-E/S})=1+(1/C_{desc})(C_{std})$ que se plantea en la introducción para el método de adiciones patrón a volumen constante para una sonda sensible a CO₂.

Concentración de estándar concentrado.	Concentración de estándar (C_{std})	E'	Respuesta ($10^{E'-E/S}$); $S=58.79$
ppm	x, ppm	mV	y, mL
0	0	-125.9	1.00
20.00	17.75	-111.5	1.76
24.99	22.18	-107.8	2.03
34.99	31.06	-102.6	2.49
44.99	39.93	-98.7	2.89
59.99	53.24	-94.5	3.42
79.98	70.99	-88.6	4.31
109.98	97.61	-82.1	5.55
149.97	133.11	-76.1	7.02
199.96	177.48	-68.3	9.53

Tabla 4.46. Muestra los valores de pendiente m y de ordenada al origen b que se obtuvieron de la **Fig. 4.18** y del análisis de regresión para *Coca-Cola Light Sin Cafeína* (Ver anexo). El valor de $C_{peñaFresa}$ es la concentración del refresco sin diluciones.

Pendiente m	Ordenada b	R^2	C_{desc} (ppm)	$C_{peñaFresa}$ (g/L)
0.0474	0.9445	0.9982	21.09±0.34	6.09±1.61

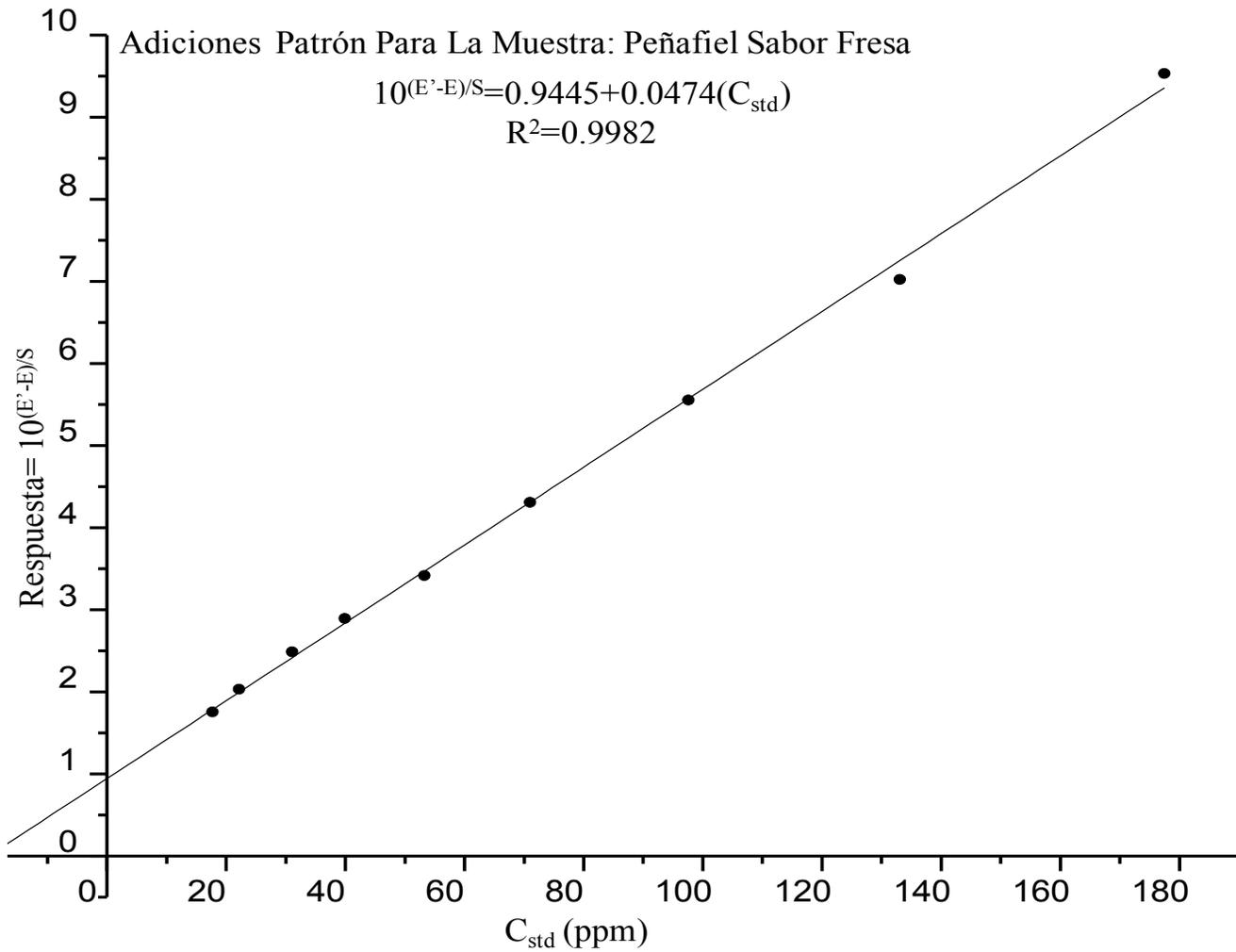


Fig. 4.18. Curva de Adiciones patrón a volumen constante para la muestra comercial *Peñafiel sabor Fresa*. Se muestra la ecuación que corresponde a la curva y al valor de R^2 .

En los resultados para la determinación de CO₂ utilizando el método de adiciones patrón se muestra cómo se llevó a cabo esta metodología acorde a una sonda selectiva a gases. En esta parte se explica el tratamiento experimental y las ecuaciones utilizadas para ajustar los parámetros a una ecuación de línea recta (Ec. 2.15 a 2.27). Se determinó el valor de S el cual es útil para que el tratamiento matemático fuera más adecuado a los experimentos realizados con muestras de matriz compleja (refrescos), se pensó que es más adecuado utilizar un valor de S determinado experimentalmente bajo las mismas condiciones de trabajo, en lugar de utilizar un valor de S reportado, para una sonda de este tipo; por lo tanto como se muestra en la **Fig 4.6** se realizó una curva de calibración con estándares de CO₂ preparados a partir de bicarbonato.

Después en las tablas y gráficas (**Tablas 4.23 a 4.46** y **Fig 4.7 a 4.18**) siguientes, se muestran los resultados obtenidos para todas las muestras de refresco determinadas (Pepsi, Pepsi Max, Pepsi Kick, Pepsi Light, Red Cola, Red Cola Light, Diet Rite Cola, Coca-Cola, Coca-Cola Zero, Coca-Cola Light y Peñafiel sabor Fresa. Todas las gráficas de adiciones patrón presentan buenos valores de correlación mayores a 0.98, lo que indicaría un comportamiento lineal de las curvas de calibración (se sabe que no es suficiente plantear que los puntos de los gráficos de calibrado son lineales sólo con el valor de R^2 por lo que en los anexos correspondientes a la curva de adiciones patrón, se encuentran los gráficos de residuales contra C_{std} , para que el autor contraste estos resultados con los valores de R^2 . En este trabajo no se analizará más allá de los valores de R^2 , aunque en los anexos se explicará porque este método de adiciones patrón se utiliza en relación a otros métodos de adiciones patrón).

Para la determinación de CO₂ en diferentes muestras comerciales se preparó una curva por adiciones patrón a volumen constante y se determinó la concentración realizando análisis de mínimos cuadrados parciales (en el ANEXO 3 se muestran las ecuaciones utilizadas para el análisis de este tipo) a continuación se muestran los valores para todas las muestras determinadas y además se hace una comparación con los resultados obtenidos con el método validado (**Tabla 4.47**).

Tabla. 4.47. Tabla de resultados de CO₂ en diferentes marcas comerciales por el método de curva de calibración el cual está validado; y los resultados obtenidos con el método de adiciones patrón a volumen constante.

Concentración de CO₂ en 600mL (g/L).		
Marca de Refresco	Método de Adiciones Patrón	Método de Curva de Calibración
Coca-Cola	6.30±0.13	7.65±0.11
Coca-Cola Light	6.87±0.91	7.36±0.11
Coca-Cola Zero	6.25±0.36	7.64±0.11
Coca-Cola Light Sin Cafeína	6.32±0.12	7.10±0.11
Pepsi	7.13±0.14	7.46±0.11
Pepsi Light	6.77±0.24	6.61±0.11
Pepsi Max	6.70±0.13	7.44±0.11
Pepsi Kick	6.60±0.35	7.29±0.11
Diet Rite Cola	6.39±0.32	7.05±0.11
Red Cola Light	6.12±0.09	7.76±0.11
Peñafiel sabor Fresa	6.09±0.10	ND

*ND: No se determinó.

Se observa que los resultados presentan diferencias lo cual es evidente que la matriz afecta al analito en las muestras por lo cual será necesario analizar que método puede ser útil para el fin el cual se requiere. Como se ha presentado en los resultados y en el análisis realizado, el trabajar con adiciones patrón se lleva bastante tiempo, pero presenta buenos resultados para una sola muestra. Pero a diferencia con el método de curva de calibración se pueden realizar diferentes muestras en menor tiempo siendo la mayor desventaja la especificidad al analito en matrices complejas.

Capítulo 5: CONCLUSIONES

- Se logró desarrollar una metodología de validación mediante parámetros establecidos generales mínimos necesarios para una sonda sensible a CO₂.
- Se llevó a cabo satisfactoriamente la aplicación del método validado en la determinación y cuantificación de esta especie en muestras de laboratorio o muestras comerciales que en este caso fueron refrescos en presentación de 600mL
- Además de que se consiguió el desarrollo de un método de cuantificación de CO₂ por adiciones patrón en muestras con matrices complejas, en este caso sólo bebidas carbonatadas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Buck, R. P. *Anal. Chem.* **2001**; 73:88A.
2. Bastos, J. C. *Quim. Nova*, **2001**, Vol. 24, No. 1, pp. 120-130.
3. Nernst, W.; Loeb, K; *Z. Phys. Chem.* **1888**, 2, 948.
4. Parsons, R. In *Modern Aspects of Electrochemistry*; Bockris, J. O. M., Conway, B. E., Eds.; Butterworths: London, 1954; pp 13-38.
5. Nernst, W.; *Ber. Deutsch. Chem. Ges.* **1897**, 30, 1547.
6. Ruzicka J.; *J. Chem. Educ.* **1997**. 74. 167-170.
7. Astrup P.; Severinghaus J. W. *The History of Blood Bases, Acids and Bases*; Mungsgaard Int.: Copenhagen, 1986.
8. *Radiometer Annual Report 1994/1995*; Copenhagen.
9. Elder, L. W.; Wright, W. H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1928**, 14, 938.
10. Tendeloo, H. J. C. *J. Biol. Chem.* **1936**, 113, 333.
11. Kolthoff, I. M.; Sanders, H. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1937**, 59, 416.
12. Pungor, E.; Hollos-Rokosinyi, F. *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.* **1961**, 27, 63.
13. Cihalik, J.; Ruzicka, J. *Coll. Czech. Chem. Commun.* **1957**, 51, 264.
14. Cihalik, J. *Potentiometric Titrations* (in Czech); SNTL: Prague, 1959.
15. Eisenman, G.; Ruskin, D. C.; Casby, J. H. *Science* **1957**, 126, 831.
16. Eisenman, G. *Biophys J.* **1962**, 2, 259.
17. Stow, R. W.; Randall, B. F. *Am. J. Physiol.* **1954**, 179, 678.
18. Stow, R. W.; Baer, R. F.; Randall, B. *Arch. Phys. Med. Rehabil.*, **1957**, 38, 646.
19. Severinghaus, J. W.; Bradley, A. F. *J. Appl. Physiol.*, 14 **1958**, 13, 515.
20. Clark, L. C., *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs*, **1956**, 2, 41.
21. Frant, M. S. *Analyst* **1994**, 119, 2293–2301.
22. Frant, M. S. *J. Chem. Educ.* **1997**, 74, 159-166.
23. *Ion-Selective Electrodes*; Durst, R., Ed.; NBS Spec. Publ. 314; National Bureau of Standards: Washington, DC, 1969.
24. Moody, G. J.; Thomas, J. R. D. *Selective Ion Sensitive Electrodes*; Merrow: Watford, England, 1971.

25. Camman, K. *Das Arbeiten mit ionselektiven Elektroden*, 1st ed.;Springer: Berlin, 1973. (2nd ed. 1977.)
26. *Ion-Selective Electrodes in Analytical Chemistry*; Freiser, H., Ed.; Plenum: New York, 1978.
27. Moody, G. J.; Oke, R. B.; Thomas, J. D. R. *Analyst* **1970**, *95*, 910.
28. Pungor, E. *Anal. Chem.* **1967**, *39*, 28A.
29. Thomas, J. R. D. *Analyst* **1994**, *119*, 203-208.
30. Stefanec, Z; Simon, W. *Chimia* **1966**, *20*, 436.
31. Stefanec, Z; Simon, W. *Microchem. J.* **1967**, *12*, 125.
32. Bakker, E.; Bühlmann, P.; Pretsch, E.; *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 3083-3132.
33. D'Orazio, P., Pittsburgh Conference, Chicago, IL, 1994; Abstract 152.
34. Amman, D.; Morf, W. E.; Anker, P.; Meier, P. C.; Pretsch, E.; Simon, W. *Ion-Sel. Electrode Rev.***1983**, *5*, 3-92.
35. Amman, D.; Bissig, R; Guggi, M.; Pretsch, E.;Simon, W.; Borowitz, I. J.; L. *Helv. Chim. Acta* **1975**, *58*, 1539.
36. Ruzicka, J.; Hansen, E. H. H.; Tjell J. Chr. *Anal. Chim. Acta* **1973**, *67*, 155.
37. Bühlmann, P.; Pretsch, E.; Bakker, E. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1593-1687.
38. Hansen E. H. H.; Lamm, C. G.; Ruzicka J. *Anal. Chim. Acta* **1972**, *59*, 403.
39. Hulanicki, A.; Trojanowicz, M.; *Selective Electrode Rev.* **1980**, *1*, 207.
40. Hulanicki, A.; Lewandowski, R.; Michalska, A.; Lewenstam, A. *Anal. Chim. Acta* **1990**, *233*, 269.
41. Frant, M.; Ross, J. W. *Science* **1968**, *40*, 1169.
42. Meyerhoff, M. R. *Clin. Chem.* **1990**, *36*, 1567-1572.
43. Guilbault, G. G.; Montalvo, J. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 2164.
44. Rechnitz, G. A.; Kobos, R. K.; Riechel, S. J.;Gebauer, C. R. *Anal. Chim. Acta* **1977**, *94*, 357-365.
45. Frant, M.S. *Analyst* **1994**, *119*, 2293-2301.
46. Coetzee, J. F.; Desmukh, B.K.; Liao, C.C. *Chem. Rev.* **1990**, *90*, 827-835.
47. Ruzicka, J.; Hansen, E. H. H. *Anal. Chim. Acta* **1975**, *78*, 145.
48. Bergveld, P. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **1970**, BME-19,70.
49. Moss, S. D; Janata, J; Johnson, C. C. *Anal. Chem.* **1975**, *47*, 2238.

50. Lindler, E. Buck, R. P. *Anal. Chem.* **2000**, 72, 336 A 345 A.
51. Fischer, Robert B. *J. Chem. Educ.*, **1974**, 51 (6), p 387.
52. Evans, A. (1987). *Potentiometry and ion selective electrodes*. ACOL. Londres. Inglaterra.
53. Czaban, J. D., *Anal. Chem.* **1985**, 57, 345 A.
54. Stock, J. T.; Orna, M. V. (1989); *Electrochemistry, Past and Present*, American Chemical Society, Washington, DC. Cheng, K. L.; *pH Glass Electrode and Its Mechanism*, Chapter 20, pp.286.
55. Naegli, R.; Reddipenning, J.; Anson, F. C. *J. Phys. Chem.* **1986**, 90, 6227.
56. Buck, R. P; Vanysek, P. *J. Electroanal. Chem.* **1990**, 292, 73-91.
57. Arnold, M. A. & Meyerhoff, M. E. (1984). Ion-Selective electrodes. *Anal. Chem.*, **56**, 20R.
58. Arnold, M. A. & Solsky, R. L. (1986). Ion-selective electrodes. *Anal. Chem.*, **58**, 84R.
59. Solsky, R. L. (1988). Ion-selective electrodes. *Anal. Chem.*, **60**, 106R.
60. Bailey, P. L. & Riley, M. (1975). Performance characteristics of gas-sensing membrane probes. *Analyst*, **100**, 145.
61. Rechnitz, G. A. (1981). Bioselective membrane electrode probes. *Science*, **214**, 287.
62. Guilbault, G. G. (1984). *Analytical Uses of Immobilized Enzymes*. Marcel Dekker, Ney York, pp. 112.
63. Karube, I. & Suzuki, S. (1984). Amperometric and potentiometric determinations with immobilized enzymes and microorganisms. *Ion-Selective Electrode Rev.*, **6**, 15.
64. Ross, J. W., Riseman, J. H. & Krueger, J. A. (1973). Potentiometric gas sensing electrodes. *Pure Appl. Chem.*, **36**, 473.
65. Severinghaus, J. W. & Bradley, A. F. (1958). Electrodes for blood P_{O₂} and P_{CO₂} determinations. *J. Appl. Physiol.*, **13**, 515.
66. Lane, e. E. & Walker, J. F. (1987). *Clinical Arterial Blood Gas Analysis*. The C.V. Mosby Co., Toronto, Canda.
67. Shapiro, B.A., Harrison, R. A., Cane, R. D. & Templin, R. (1989). *Clinical Application of Blood Gases*. Year Book Medical Publishers, Boca Raton, FL.

68. Thompson, M. and Vanderberg, E. T. (1986) *In vivo probes: problems and perspectives*. *Clin. Biochem.* **19**, 255-261.
69. Collison, M. E., Aebli, G. V., Petty, J. and Meyerhoff, M. E. (1989) Potentiometric combination ion/carbon dioxide sensors for *in vitro* and *in vivo* blood measurements. *Anal. Chem.* **61**, 2365-2372.
70. Meyerhoff, M. E.; Meruva, R. K. (1998). *Biosensors & Bioelectronics*. 13, 201-212.
71. Guilbault, G. G.; Kuan, S. S. (1987) *Ion selective electrodes and biosensors based on ISEs*. In *Biosensors, Fundamentals and Applications* (Turner APF, Karube I, Wilson G. S., eds). Oxford: Oxford University Press, pp. 135-152.
72. Torrecilla O. C. *Enfermedades sistémicas y Litiasis Urinaria*. Publidisa. Madrid, España. 2004.
73. Borja de la Quintana, Francisco de. (2004) *Monitorización en anestesia, medicina de urgencias y cuidados intensivos*. Elsevier. Madrid, España, pag. 515.
74. Kocmur, S. (1999). *J. Chem. Educ.*, 76, 1253-1255.
75. Manahan, S. E. (2007). *Introducción a la Química Ambiental*. México, D. F: Reverté.
76. Bryson, R. A. (1937). *Cuando los demás factores son constantes. Una reconciliación de las diversas teorías de los cambios climáticos (en Orígenes y control de la contaminación)*, México, pág. 262.
77. Perloff, H. S. (1973): *La calidad del medio ambiente urbano*, Barcelona, pág. 46.
78. Revelle, R., and cols.: *Atmosférico carbón dioxide*, Washington, 1956, pág. 20.
79. Barry, R. G. , y Chorley, R. J.: *Atmósfera, tiempo y clima*, Barcelona, 1972, pág. 21.
80. Brown, T. L. *Química. La ciencia central*. México: Pearson.
81. Dessirier, J.-M., Simons, C., Carstens, M.-I., OMahony, M., & Carstens, E. (2000). *Chemical Senses*, 25, 277–284.
82. Lubetkin, S., & Blackwell, M. (1988). *Journal of Colloid and Interface Science*, 26, 610–615.
83. Wilt, P.-M. (1986). *Journal of Colloid and Interface Science*, 112, 530–538.
84. Jones, S. F., Evans, G. M., & Galvin, K. P. (1999). The cycle of bubble production from a gas cavity in a supersaturated solution. *Advances in Colloid and Interface Science*, 80, 51–84.

85. Odake, S. (2001). *Biomolecular Engineering*, 17, 151–156.
86. Barker, G. S., Jefferson, B., & Judd, S. J. (2002a). *Chemical Engineering Science*, 57, 565–573.
87. Barker, G. S., Jefferson, B., & Judd, S. J. (2002b). *Journal of Food Engineering*, 52, 405–412.
88. Danckwerts, P. V. (1979). *Chemical Engineering Science*, 34, 443–446.
89. Munkolm, C., Walt, D. R., & Milanovich, F. P. (1988). *Analytical Chemistry*, 35, 109–112.
90. Hale, J., Stehle, G., & Bals, I. (199). *Sensors and Actuators B*, 7, 665–671.
91. Barker, G., Jefferson, B., & Judd, S. J. (1999). Measuring techniques for the determination of CO₂ in beverages. St. Paul Minesota: Eagan Press.
92. Descoins, C.; *Food Chemistry*. **2006**. 95. 541-553.
93. Lendl, B., Frank, J., Baena, J. R., Haberkorn, M. Schaden, S. (2004). *Applied Spectroscopy*. 58, 667-670.
94. Yank, L. (2002). *Determinación de CO₂ en diferentes muestras de gas mediante el uso del aparato de Orsat*. Chaco, Argentina.
95. Severns, W. H. (2007). *Energía mediante Vapor, Aire o Gas*. Reverté. Barcelona, España. Pp. 120-121.
96. Rochette, P., Hutchinson, G.L. 2005. *Measurement of soil respiration in situ: chamber techniques*. American Society of Agronomy Monograph Series No. 47. IN: *Micrometeorology in Agricultural Systems*, J.L. Hatfield and J.M. Baker (eds). pp. 247-286.
97. Lozano C., L. (1998). Validación de métodos cromatográficos... Tesis publicada de químico farmacéutico biólogo, Universidad Nacional Autónoma de México, D.F, México.
98. Rozet E., Marini R. D., Ziemons E., Boulanger B. *J. Pharma. and Biomed. Anal.* **2011**, 55, 848-858.
99. U.S. FDA, Title 21 of the U.S. Code of Federal Regulations: 21 CFR 211—Current good manufacturing practice for finished pharmaceuticals.

100. U.S. FDA - Guidance for Industry (draft) Analytical Procedures and Methods Validation: Chemistry, Manufacturing, and Controls and Documentation, 2000.
101. ISO/IEC 17025, General requirements for the competence of testing and calibration laboratories, 2005.
102. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Validation of analytical procedures: definitions and terminology, Geneva (1996).
103. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Validation of analytical procedures: Methodology, adopted in 1996, Geneva.
104. U.S. EPA, Guidance for methods development and methods validation for the Resource Conservation and Recovery Act (RCRA) Program, Washington, D.C. (1995).
105. General Chapter 1225, Validation of compendial methods, United States Pharmacopeia 30, National Formulary 25, Rockville, Md., USA, The United States Pharmacopeial Convention, Inc., USP (2007).
106. U.S. FDA - Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation. 2001.
107. G. C. Hokanson, *A life cycle approach to the validation of analytical methods during pharmaceutical product development, Part I: The initial validation process*, Pharm. Tech., Sept. 1994, pp. 118–130.
108. G. C. Hokanson, *A life cycle approach to the validation of analytical methods during pharmaceutical product development, Part II: Changes and the need for additional validation*, Pharm. Tech., Oct. 1994, pp. 92–100.
109. J. M. Green, *A practical guide to analytical method validation*, Anal. Chem. News & Features, 1 May 1996, pp. 305A–309A.
110. Renger B., Jehle H., Fischer M. and Funk W., *Validation of analytical procedures in pharmaceutical analytical chemistry: HPTLC assay of theophylline in an effervescent tablet*, J. Planar Chrom. 8:269–278 (July/August 1995).
111. Huber L., (2007). *Validation and qualification in Analytical Laboratories*. Second Edition. Informa. E. U.

112. Wegscheider, *Validation of analytical methods, in: Accreditation and quality assurance in analytical chemistry*, edited by H. Guenzler, Springer Verlag, Berlin (1996).
113. S. Seno, S. Ohtake and H. Kohno, *Analytical validation in practice at a quality control laboratory in the Japanese pharmaceutical industry*, *Accred. Qual. Assur.* 2:140–145 (1997).
114. AOAC *Peer-Verified Methods Program*, Manual on policies and procedures, Arlington, Va., USA (1998).
115. P. A. Winslow and R. F. Meyer, *Defining a master plan for the validation of analytical methods*, *J. Validation Technology*, pp. 361–367 (1997).
116. Breaux J., Jones K., Boulas P., *Pharmaceutical Technology, Analytical Technology and Testing*, 6-13, 2003.
117. S.O. Krause, *A Guide for testing biopharmaceuticals, Part II: acceptance criteria and analytical method maintenance*, *Pharm. Tech. Europe*, Vol 18(6), 29/38, 2006.
118. Eurachem. (1998). *Guide The Fitness for Purpose of Analytical Methods...* pp.2-27
119. ISO 11843-1:1997. Capability of detection – Part 1 Terms and definitions.
120. Nomenclature in evaluation of analytical methods, including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995). *Pure & appl. Chem.*, 1995, **67**, 1699-1723.
121. Guidelines for Collaborative Study – Procedures to Validate Characteristics of Method of analysis, AOAC International, revised May 1994, publicado originalmente en *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 72, 694-704 (1989).
122. ISO 3534-1:1993. *Statistics – Vocabulary and symbols – Part 1: Probability and general statistical terms*.
123. Compendium of Chemical Technology (IUPAC Recommendations), Blackwell Scientific, 1987, ISBN 0-632-01767-8.
124. *Pure & appl. Chem.* **1994**, Vol. 66, No. 12, pp. 2527-2536.
125. *Guía de Validación de Métodos Analíticos*. (2002). Ed. Colegio Nacional de químicos Farmacéuticos Biólogos.
126. US FDA. Guideline for industry: text on validation of analytical procedures: ICH Q2A. Rockville, MD: 1995.

127. Zellmer, David L. (1999, 18 de mayo). *The Fluoride Ion Selective Electrode...*, [en línea] California, Estados Unidos: Universidad Estatal de California.
Recuperado el 29 de Mayo de 2012, de
<http://zimmer.csufresno.edu/~davidz/Chem102/FluorideISE/FluorideISE.html>
128. Harris, D. C. (1999). *Análisis Químico Cuantitativo*, México: Grupo Editorial Iberoamérica.
129. Li, G., Polk, B. J. (2000), *Journal of Chemical Education*. 77, 1049-152.

Anexos.

ANEXO 1. Validación.

➤ Linealidad

Pendiente

$$m = \frac{\overline{xy} - \overline{x}\overline{y}}{n\overline{x^2} - (\overline{x})^2}$$

Ordenada al origen

$$v = \frac{\overline{y} - m\overline{x}}{n}$$

Coefficiente de determinación

$$R^2 = \frac{(n(\overline{xy}) - (\overline{x})(\overline{y}))^2}{(n(\overline{x^2}) - (\overline{x})^2)(n(\overline{y^2}) - (\overline{y})^2)}$$

Intervalo de confianza para la pendiente (S_{b1}: Error Estándar de la Pendiente)

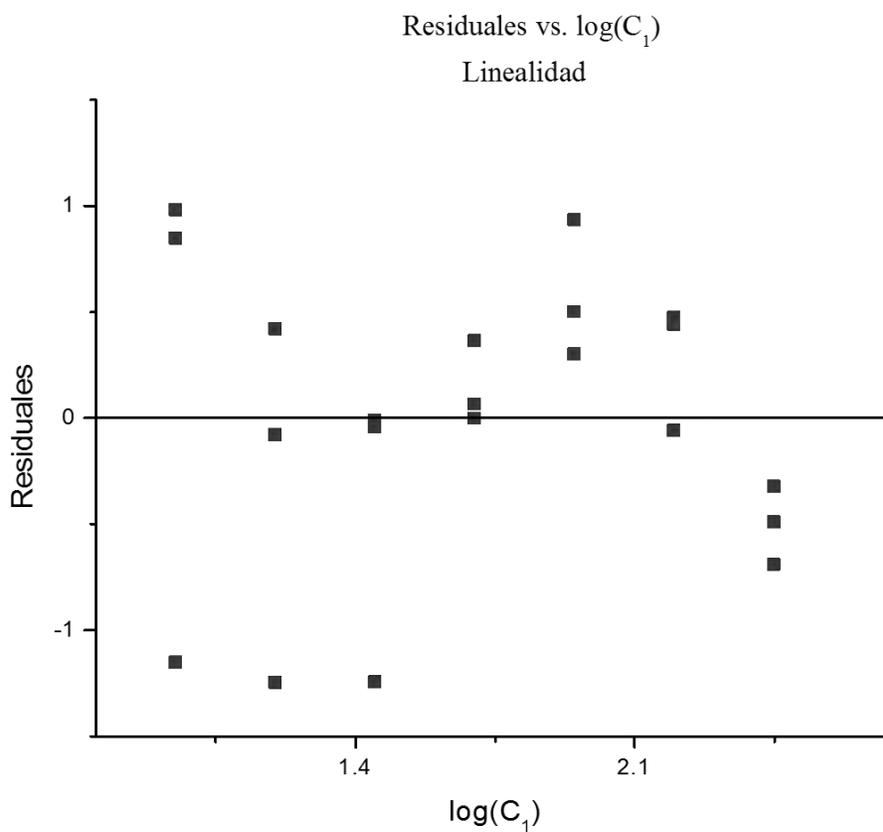
$$IC(\beta_1) = m \pm t_{0.975, n-2} S_{b1} \quad (t_{0.975, (8-2=6)} = 2.447)$$

$$S_{b1} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

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

Tabla A1.1 ANOVA para linealidad.

Análisis de varianza con falta de ajuste					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	Estadístico F	Valor P
Modelo	15314.50	1	15314.50	32740.88	0
Residual	8.89	19	0.47		
Falta de Ajuste	3.05	5	0.61	1.46	0.26
Error Puro	5.84	14	0.42		
Total (Corr.)	15323.40	20			

**Fig. A1.1.** Gráfica de Residuales contra $\log(C_1)$ para linealidad.

➤ Límite de Detección (LD).

LD_{prom}: Valor promedio de concentración de los valores de potenciales obtenido a concentraciones bajas determinadas con la curva de linealidad (Valor en la intersección C_l **Tabla 4.3** de resultados).

Desviación estándar

$$S = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$$

$$LD = LD_{prom} \pm t_{0.975, n-2} (S/\sqrt{n}) ; \quad (t_{0.975, (8-1=7)} = 2.365)$$

➤ Límite de Cuantificación (LC)

LC_{prom}: Valor promedio de concentraciones de los valores de potenciales obtenido a partir de los valores de potencial en el punto más bajo de la respuesta nernstiana.

Desviación estándar

$$S = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$$

$$LC = LC_{prom} \pm t_{0.95, n-2} (S/\sqrt{n}) ; \quad (t_{0.975, (3-1=2)} = 4.3)$$

- Precisión (repetibilidad, reproducibilidad, R&R)

Tabla XX. Tabla Analisis de Varianza por dos vías (*Two-way ANOVA*).

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	Estadístico F
Analista	SSA	a-1	MSA=SSA/a-1	F=MSA/MSE
Niveles	SSB	b-1	MSB=SSB/b-1	F=MSB/MSE
Interacción	SSAB	(a-1)(b-1)	MSAB=SSAB/(a-1)(b-1)	F=MSAB/MSE
Interacción (Analista, Niveles)	SSE	ab(n-1)	MSE=SSE/ab(n-1)	
Error	TSS	N-1		
Total				

$$SSA = \sum_{i=1}^a \frac{(Y_{i..})^2}{bn} - \frac{Y_{..}^2}{N}$$

$$SSB = \sum_{j=1}^b \frac{(Y_{.j.})^2}{an} - \frac{Y_{..}^2}{N}$$

$$SSAB = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \frac{(Y_{ij.})^2}{n} - \frac{Y_{..}^2}{N} - SSA - SSB$$

$$TSS = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^n Y_{ijk}^2 - \frac{Y_{..}^2}{N}$$

$$SSE = TSS - SSA - SSB - SSAB$$

a = número de analistas

b = número de niveles

n = número de repeticiones

N = número total de lecturas (abn)

El sistema de medida de repetibilidad en porcentaje es:

$$\text{Repetibilidad} = 5.15 \sqrt{MSE}$$

El sistema de medida para reproducibilidad en porcentaje es:

$$\text{Reproducibilidad} = 5.15 \sqrt{\frac{MSA - MSAB}{bn}}$$

La interacción entre analistas y los niveles.

$$I = 5.15 \sqrt{\frac{MSAB - MSE}{n}}$$

El sistema de medida de repetibilidad y reproducibilidad es

$$R \& R = \sqrt{\text{Repetibilidad}^2 + \text{Reproducibilidad}^2 + I^2}$$

➤ Robustez.

Media aritmética de la condición de operación.

$$y_0 = \frac{\sum y_0}{n_0}$$

n_0 = número de muestras de la condición normal de operación.

Media aritmética del análisis de cada condición de operación diferente a la condición normal

$$y_1 = \frac{\sum y_1}{n_1}$$

n_1 = número de muestras de la i -ésima condición de operación.

Diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición respecto de la media aritmética de la condición normal.

$$|d_i| = |y_1 - y_0|$$

➤ Sensibilidad.

Pendiente

$$m = \frac{\sum xy - \frac{(\sum x)(\sum y)}{n}}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

Ordenada al origen

$$v = \frac{\sum y - \frac{(\sum x)(\sum y)}{n}}{n}$$

Coefficiente de determinación

$$R^2 = \frac{(n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y))^2}{(n(\sum x^2) - (\sum x)^2)(n(\sum y^2) - (\sum y)^2)}$$

Intervalo de confianza para la pendiente (S_{b1} : Error Estándar de la Pendiente)

$$IC(\beta_1) = m \pm t_{0.975, n-2} S_{b1} \quad (t_{0.975, (8-2=6)} = 2.447)$$

$$S_{b1} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

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

➤ Exactitud.

Media aritmética

$$\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$$

Desviación estándar

$$S = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$$

Coefficiente de variación

$$CV = \frac{S}{\bar{y}} * 100$$

Intervalo de confianza para la media poblacional

$$IC(\mu) = \bar{y} \pm t_{0.975, n-1} \frac{S}{\sqrt{n}} \quad (t_{0.975, (6-1=5)} = 2.571)$$

n = numero de recobros.

➤ Especificidad.

Media aritmética

$$y = \frac{\sum y}{n}$$

Desviación estándar

$$S = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$$

Coefficiente de variación

$$CV = \frac{S}{y} * 100$$

Intervalo de confianza para la media poblacional

$$IC(\mu) = y \pm t_{0.975, n-1} \frac{S}{\sqrt{n}} \quad (t_{0.95, (3-1=2)}=2.92)$$

n = numero de estándares.

ANEXO 2 Cuantificación por el método validado (Curva de Calibración).

➤ Intervalo de confianza para la pendiente (S_{b1}: Error Estándar de la Pendiente)

$$IC(\beta_1) = m \pm t_{0.975, n-2} S_{b1} \quad (t_{0.975, (7-2=5)}=2.571)$$

$$S_{b1} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

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

- Para la determinación de la concentración de cada muestra C se calcularon utilizando la ecuación de regresión de la curva de calibración.

$$E(\text{mV}) = b + m \text{Log} C$$

$$\text{Log } C = (E(\text{mv}) - b) / m$$

$$C = 10^{(E(\text{mv}) - b) / m}$$

$$\text{IC}(C) = C \pm t_{0.975, n-2} S_{X_0} \quad (t_{0.975, (22-2)=19} = 2.093)$$

Se toman en cuenta las diluciones requeridas para obtener la concentración en cada muestras de refresco.

- El intervalo de confianza (incertidumbre) para cada muestra (S_{X_0}) se calculó con la siguiente ecuación (θ es el número de repeticiones):

$$S_{x_0} = \frac{S_{x/y}}{m} \sqrt{\frac{1}{\theta} + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - \bar{y})^2}{m^2 \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

ANEXO 3 Cuantificación por el método de adiciones patrón.

- Para la curva de calibración:

Intervalo de confianza para la pendiente (S_{b1} : Error Estándar de la Pendiente)

$$\text{IC}(\beta_1) = m \pm t_{0.975, n-2} S_{b1} \quad (t_{0.975, (8-2)=6} = 2.447)$$

$$S_{b1} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

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

- Para determinar el valor de pendiente (m), ordenada al origen (b) y la concentración en la muestra problema (C_{desc}), en el método de adiciones patrón.

$$m = \frac{\sum (X_i Y_i) - n \bar{X} \bar{Y}}{\sum (X_i)^2 - n (\bar{X})^2}$$

$$b = Y_{prom} - m(X_{prom})$$

$$C_{desc} = \frac{1}{m}$$

- Para determinar el error o incertidumbre de la C_{desc} se aplica la estadística de regresión.

$$n_i = \sqrt{\frac{(n-2)(n-1)(SX^2)}{X_i^2}}$$

$$\lambda_i = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}} \sqrt{\frac{1}{n} + \left\{ \frac{1}{n-1} \left[\frac{X_{prom}^2}{SX^2} \right] \right\}}$$

$$C_{desc} - (b)$$

Bebida Carbonatada	Método 1		Método 2		Método 3	
	C _{M1} (ppm)	RSD	C _{M2} (ppm)	RSD	C _{M3} (ppm)	RSD
Coca-Cola	7.957	8.876	3.917	26.815	6.30	2.100
Pepsi	7.675	7.174	6.272	14.967	7.13	1.99
Peñafiel	5.850	6.897	6.428	12.304	6.09	1.61
Coca-Cola Zero	6.224	11.086	6.350	13.521	6.25	5.750
Diet Rite Cola	6.655	9.979	5.450	13.929	6.39	4.98
Red Cola Light	6.370	5.076	5.289	4.418	6.12	1.53
Red Cola	6.792	11.330	5.765	15.830	6.57	6.03
Pepsi Max	6.967	5.757	5.718	5.178	6.70	1.95
Pepsi Kick	6.804	9.952	5.873	13.531	6.60	5.26
Pepsi Light	6.911	6.564	6.279	8.233	6.77	3.47
Coca-Cola Light sin	6.263	3.778	6.494	4.349	6.32	1.91
Coca-Cola Light	6.370	5.076	5.289	4.418	6.87	13.27

Tabla A3.1. Tabla de comparación de valores de concentración y RSD de 3 métodos distintos de adiciones patrón usando los datos de las bebidas carbonatadas de este trabajo. Nótese el valor de RSD del método 3 relativamente más bajo que el método 1 y 2, los cuales son métodos clásicos de adiciones patrón.

En la tabla A3.1 se hace una comparación de los métodos de adiciones patrón utilizados para la determinación de la concentración en bebidas carbonatadas con una sonda sensible a CO₂; se muestran los resultados de las concentraciones y el RSD o %RSD que se obtuvo por cada método con el cual ayudó a decidir que método presenta mejores resultados o al menos aquel que presenta menos desviaciones en su resultado.

El Método 1 describe una línea recta a partir de la respuesta del electrodo en el eje *y* y en el eje *x* la concentración adicionada de estándar C_{std} de la siguiente manera (Li G., 2000):

$$10^{\frac{E}{S}} = b + mC_{std} \quad \text{Ec. A3.1}$$

Y donde la concentración problema o desconocida C_{desc} se determina de la siguiente manera:

$$C_{desc} = \frac{10^{\frac{E}{S}} - b}{m}$$

El Método 2 describe una línea recta a partir de restar la respuesta del estándar sin adición $10^{(E/S)}$ a la respuesta de los estándares con adiciones $10^{(E'/S)}$, en el eje de las *y* y C_{std} en el eje de las *x*; esto es:

$$10^{\frac{E'}{S}} - 10^{\frac{E}{S}} = mC_{std} \quad \text{Ec. A3.2}$$

Y donde la concentración problema o desconocida C_{desc} se determina de la siguiente manera:

$$C_{desc} = \frac{10^{\frac{E'}{S}} - 10^{\frac{E}{S}}}{m}$$

El Método 3 (Ec. 2.19 a 2.17) divide la respuesta de los estándares entre la respuesta del estándar sin adición en el eje de las *y* y C_{std} en el eje de las *x* de la siguiente manera (Zellmer, 1999):

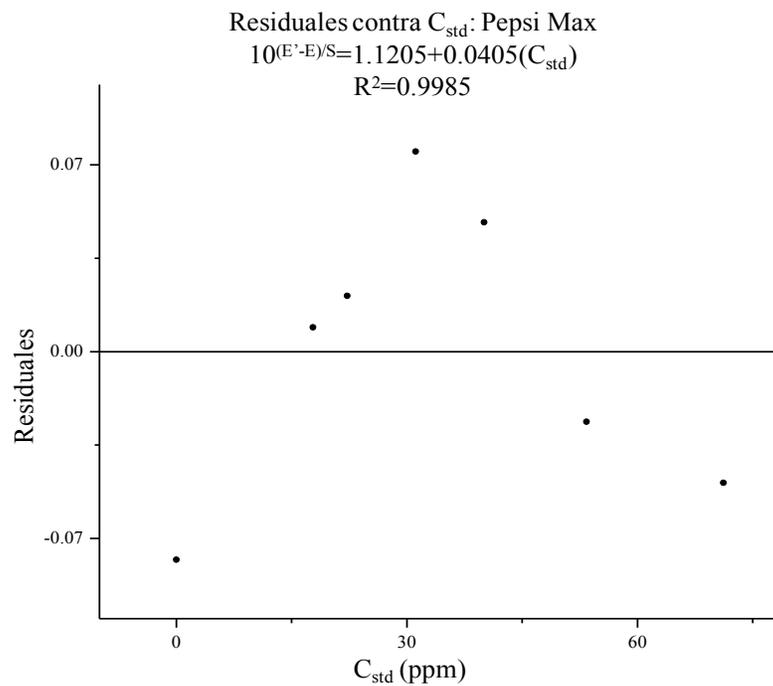
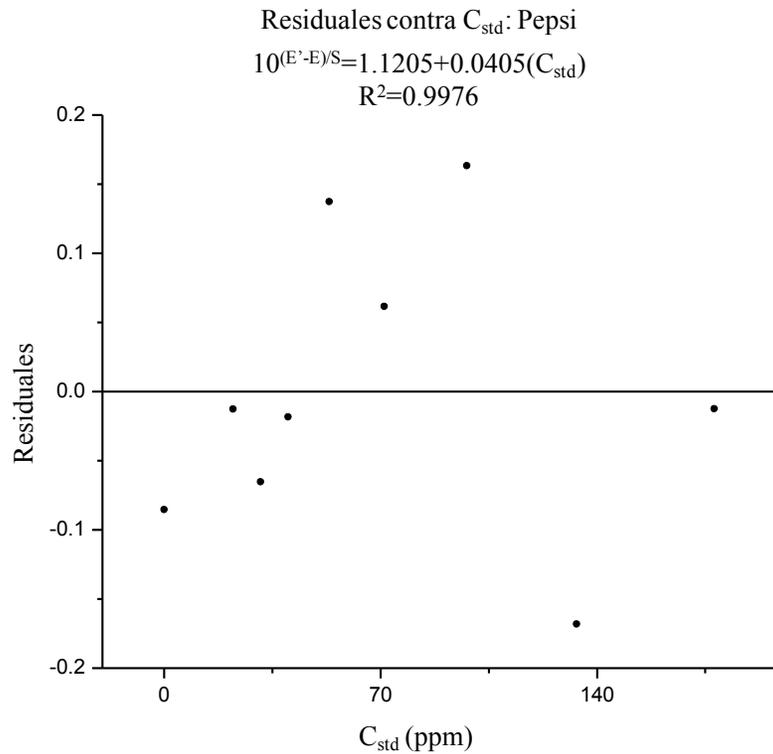
$$\frac{10^{\frac{E'}{S}}}{10^{\frac{E}{S}}} = 10^{\frac{E'-E}{S}} = b + mC_{std}$$

Y donde la concentración problema o desconocida C_{desc} se determina de la siguiente manera:

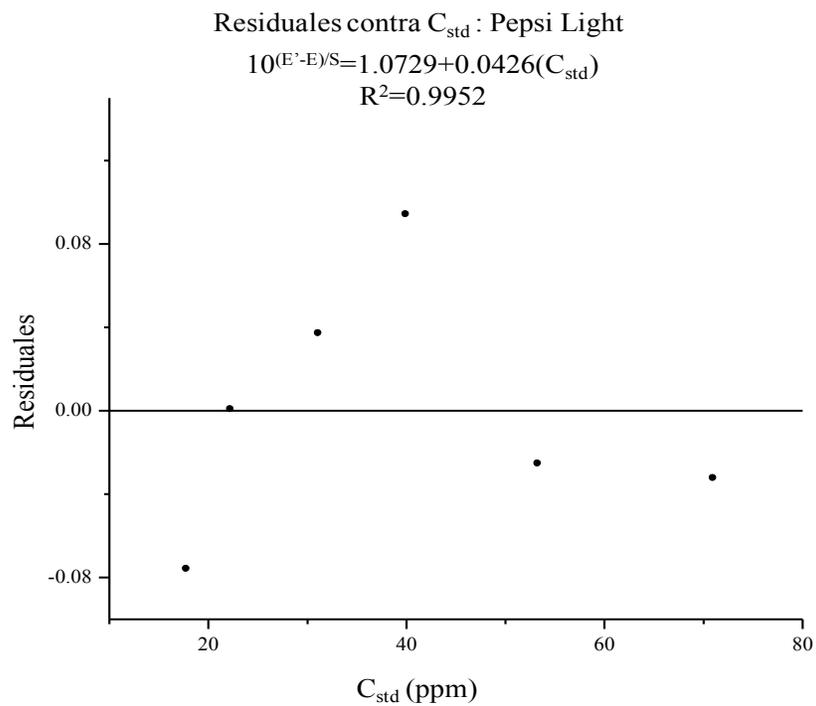
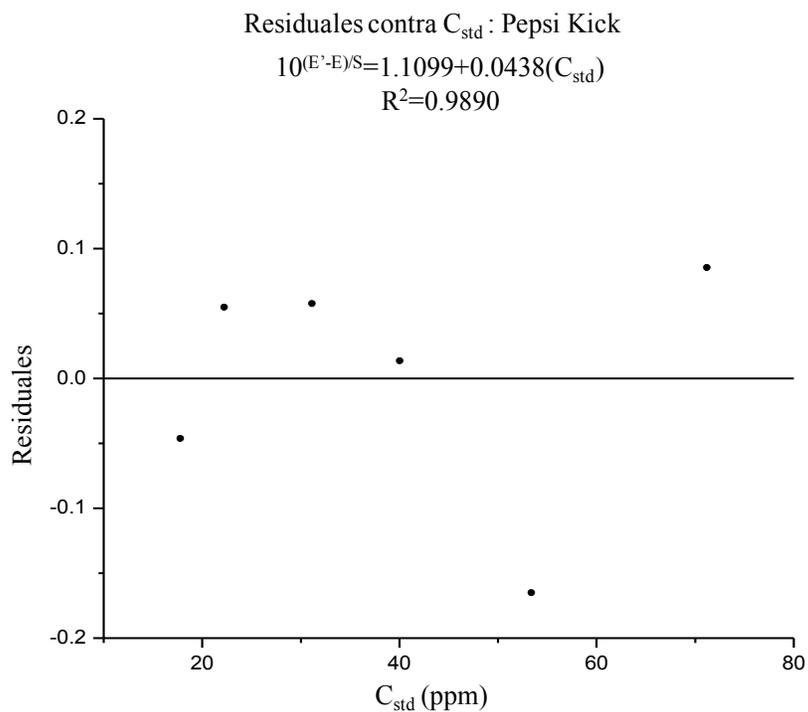
$$C_{desc} = \frac{10^{\frac{E'}{S}} - 10^{\frac{E}{S}}}{m}$$

Como se observa en la Tabla A3.1, los valores de RSD o desviación estándar relativa son más bajo en el Método 3 en comparación con los otros 2 métodos por lo cual el método 3 es preferido por los otros 2 métodos en este trabajo.

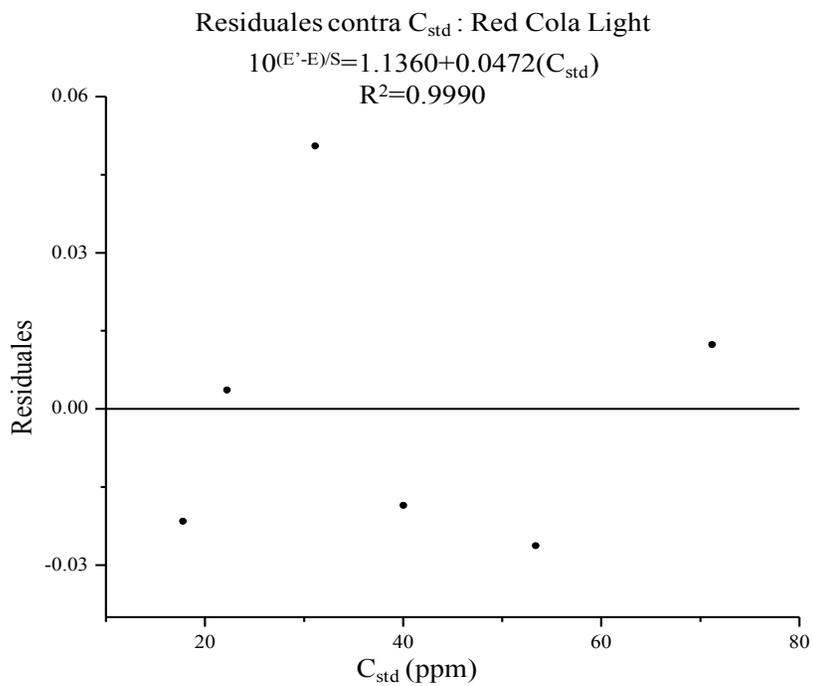
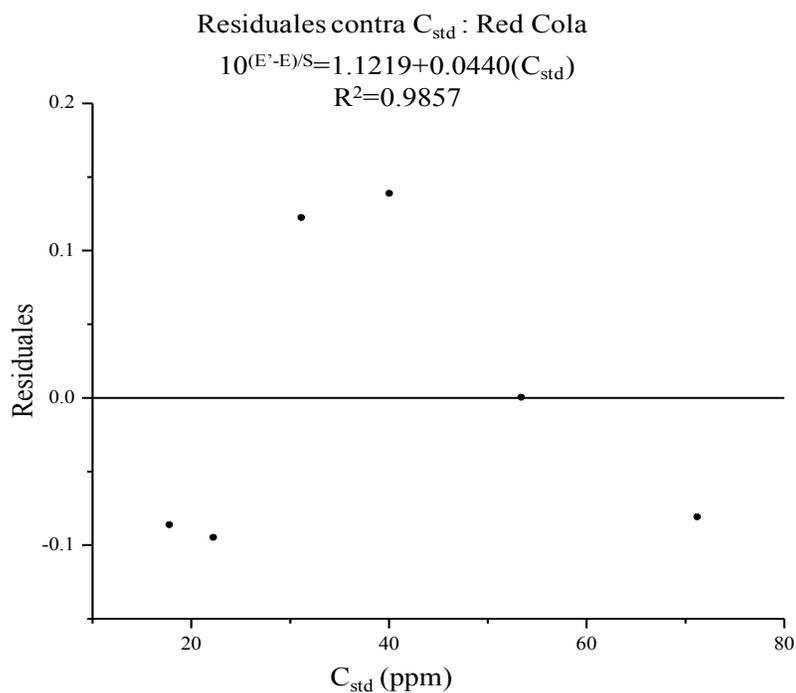
Gráficos de residuales para los datos de las bebidas carbonatadas por el método de adiciones patrón.



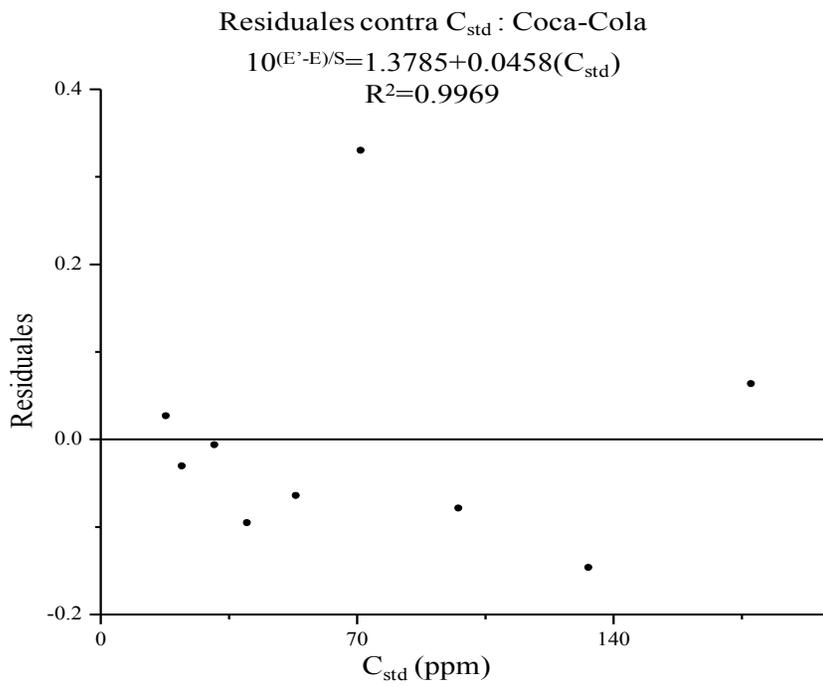
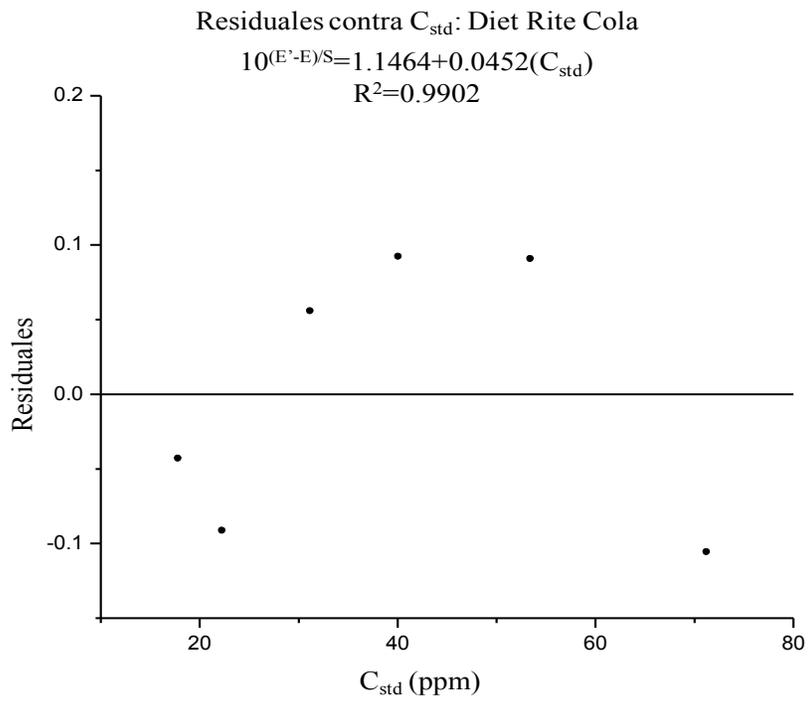
Adrián Ricardo Hipólito Nájera



Adrián Ricardo Hipólito Nájera



Adrián Ricardo Hipólito Nájera



Adrián Ricardo Hipólito Nájera

