



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA



**OPTIMIZACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA
CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO ASCÓRBICO EN
GOMITAS PEDIÁTRICAS.**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

MARÍA DOLORES HERNÁNDEZ LOMELI

DIRECTOR DE TESIS: M. EN. F. IDALIA LETICIA FLORES GÓMEZ

ASESOR DE TESIS: Q.F.B. MAURO ARRIETA SÁNCHEZ

México, D.F., Febrero de 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dios, para que los quiero si tengo alas para volar.
Frida Kahlo

Salmo 15
Conserva me, Domine...

Protégeme, Dios mío, pues eres mi refugio.
Yo siempre he dicho que tú eres mi Señor.
El Señor es la parte que me ha tocado en herencia.
Mi vida está en sus manos.

Bendeciré al Señor, que me aconseja,
hasta de noche me instruye internamente.
Tengo siempre presente al Señor
y con él a mi lado, jamás tropezaré.

Por eso se me alegran el corazón y el alma
y mi cuerpo vivirá tranquilo,
porque tú no me abandonarás a la muerte
ni dejarás que sufra yo la corrupción.

Enséñame el camino de la vida,
sáciame de gozo en tu presencia
Y de alegría perpetua junto a ti.

AGRADECIMIENTOS

Dios te agradezco por brindarme el don maravilloso de la vida, gracias por darme el entendimiento tanto espiritual como racional, para convertirme en un ser pensante.

Jesús, gracias por acogermme entre tus brazos como mi hermano mayor, además de ayudarme en los momentos difíciles. Al mostrarme con tu sabiduría el camino a seguir.

María te agradezco por el apoyo incondicional que ofrece una madre a sus hijos, gracias por escucharme día a día.

Hermosa, no sé cómo podría agradecerte. Ni siquiera tengo las palabras, creo que aun no existe alguna palabra que describa todo el amor y el apoyo que me has dado, en primera por darme la vida y luego mi mejor herencia la educación. Al formarme como una mujer con principios y valores. Gracias infinitas gracias mamá.

Gracias papá, ya que al partir me obligaste a tener la fortaleza no solo para terminar mis estudios sino para aplicar tus conocimientos de vida. Al diferenciar por medio de tú vida, lo que debo y no debo hacer a lo largo mi vida.

A mi hermano Javier Eduardo gracias por estar en los momentos más difíciles de nuestra vida y apoyarme en todos los aspectos, incluyendo tu propio sacrificio.

A mi hermanito Luis Alberto, te agradezco las palabras tan sabias que alguna vez me expresaste, ya que fue el último empujón que necesitaba para concluir este proyecto.

A Paty, Erika, David y Fernando por esos grandiosos años que pase en la FES. Con ustedes aprendí a valorar una amistad, a compartir lágrimas y sufrimientos pero también a disfrutar de muchas alegrías. Sin ustedes jamás habría sido tan feliz en la escuela.

A Kristell, Gaby, Bere y Bety Carpio por el apoyo que me dieron durante este tiempo, gracias por ser mis amigas y confidentes.

Mi miamor; gracias por el amor y confianza que has tenido hacia mí. Te agradezco porque me has escuchado y apoyado en los momentos más exasperantes al escribir esta tesis.

Josefina, te agradezco infinitamente el apoyo que me brindaste para poder combinar el trabajo con la escuela, no tengo palabras para agradecértelo.

A la congregación de las Apostólicas del Sagrado Corazón de Jesús y a Mónica Saldivar por el apoyo brindado a mi mamá, gracias a esto pude terminar mis estudios.

Don Miguel, gracias por los consejos laborales y vivenciales que hasta ahora me ha transmitido.

A mi directora de tesis la M. en F. Idalia Flores, por darme el apoyo que necesite y la oportunidad de trabajar con ella, al transmitirme sus más grandes conocimientos. Gracias por ser más que una profesora al ser mi amiga y madre de escuela.

A mi asesor el profesor Mauro Arrieta por darme la oportunidad de trabajar con él en este proyecto y compartirme sus conocimientos analíticos.

Agradezco a los profesores de las FES Zaragoza por compartir sus conocimientos, en especial a Lety Huerta, Martha Ugalde, Victor Becerra y Ángel Pavón.

Por último, gracias a la Universidad Nacional Autónoma de México, máxima casa de estudios que me brindo la oportunidad de ingresar a sus instalaciones, y darme la formación intelectual necesaria.

ÍNDICE

INTRODUCCION.....	1
1. MARCO TEORICO.....	2
1.1 Vitaminas.....	2
1.2 Ácido ascórbico.....	2
1.3 Gomas.....	6
1.4 Suplementos alimenticios.....	8
1.5 Métodos analíticos.....	10
1.6 Optimización de métodos analíticos.....	18
1.7 Validación.....	19
1.8 Validación de métodos analíticos.....	19
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	27
3. OBJETIVO.....	28
4. HIPOTESIS.....	28
5. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	29
5.1 Material de Laboratorio.....	29
5.2 Reactivos.....	29
5.3 Equipos.....	30
5.4 Principio activo y materia primas.....	30
5.5 Preparación de soluciones.....	30
5.6 Fabricación de los placebos.....	31
5.7 Optimización del método analítico.....	32
5.8 Validación del Método Analítico.....	39
5.9 Diagrama de Flujo.....	41
6.0 RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS.....	42
6.1 Optimización del método analítico.....	42
6.2 Validación del método analítico.....	45
7.0 CONCLUSIONES.....	66
8.0 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	67
9.0 ANEXO.....	71
9.1 Linealidad del sistema.....	71
9.2 Precisión del sistema.....	72
9.3 Linealidad del método.....	72

9.4 Exactitud del método.....	74
9.5 Repetibilidad.....	74
9.6 Reproducibilidad.....	75
9.7 Estabilidad de la muestra.....	75
9.8 Tolerancia.....	76

INTRODUCCION

El ácido ascórbico en México se utiliza principalmente como suplemento alimenticio, ya que es prescrito por algunos médicos como tratamiento auxiliar para el refriado común, gingivitis y problemas en la piel; por lo que su consumo constante previene y ayuda a la mejora de los síntomas provocados por estos padecimientos.

Generalmente esta vitamina es administrada en soluciones poli vitamínicas, tabletas efervescentes y masticables; sin embargo, hay una formulación atractiva y versátil para la población pediátrica-infantil, como lo son las gomitas.

Al ser reconocidas las gomitas como suplementos alimenticios y al tener el ácido ascórbico una acción farmacología reconocida, es necesario que para su comercialización en el país; cumplan con las disposiciones aplicables para los insumos de salud, por lo que se busca adecuar y optimizar un método farmacopeico para su cuantificación, cumpliendo así con los parámetros de control de calidad establecidos en la industria farmacéutica dedicada a la fabricación de suplementos alimenticios.

La optimización de un método analítico se basa en adecuar los principales puntos críticos o modificables de un método analítico ya antes propuesto en alguna Norma, Farmacopea, Libro vigente, con el fin de evaluar una forma farmacéutica ó principio activo.

Optimizado el método analítico se busca demostrar que éste es útil para la cuantificación del ácido ascórbico en la gomita, así como asegurar que los datos sean exactos y reproducibles; además de que este método pueda ser transferido de un laboratorio a otro. Todo esto se logra por medio de la validación del método analítico

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Vitaminas

Las vitaminas son un grupo heterogéneo de compuestos orgánicos de origen natural indispensables para una buena nutrición que se deben incluir como micronutrientes en la dieta diaria del ser humano.

Estos compuestos son efectivos en pequeñas cantidades debido a que son esenciales para la transformación de la energía y la regulación del metabolismo del ser humano. Al ser diferentes una de la otra por composición química y función que desempeñan, se clasifican como liposolubles (no polar, soluble en grasa) o hidrosolubles (polar y soluble en agua).¹

Dentro de las liposolubles están las vitaminas A, D, E y K, ya que se encuentran en las fracciones lipídicas de los tejidos animales. El ácido ascórbico y el grupo de las vitaminas B se clasifican como hidrosolubles, debido a su estructura química y su solubilidad principalmente, puesto que no pueden ser retenidas por el organismo como las hidrosolubles, por lo tanto deben ser administradas constantemente, para evitar alguna deficiencia.

1.2 Ácido ascórbico

El ácido L-ascórbico es un ácido de azúcar derivado del ácido gulónico, que se sintetiza a partir de la glucosa (ver Fig.1). Tiene propiedades antioxidantes, es altamente polar y por tanto soluble en agua, este actúa como agente reductor en reacciones de hidroxilación.

Su principal característica es oxidarse en ácido dehidroascórbico para formar un sistema redox que puede ser la base de sus principales acciones fisiológicas. El humano carece de la capacidad de sintetizar el ácido ascórbico, por lo cual es necesario incluirlo en su dieta.

1.2.1 Estructura y fórmula química

$C_6H_8O_6$
PM 176.13

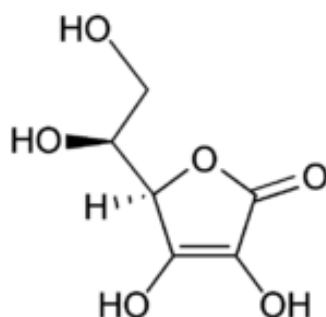


Fig. 1 Estructura química del ácido ascórbico.¹

1.2.2 Nombre químico

L-Ascórbico ácido, (R) 5-{(S)-1,2-dihidroxietil}-3,4-dihidroxi-5H-furan-2-ona.

1.2.3 Nombre genérico

Vitamina C; Ácido ascórbico.

1.2.4 Propiedades físicas

Cristales o polvo blanco o ligeramente amarillo, por exposición a la luz se descompone gradualmente. En estado seco es estable al aire, pero en solución se oxida rápidamente. Su pK_{a1} : 4.17 y pK_{a2} : 11.57, el punto de fusión es de 190 - 192°C.²

1.2.5 Propiedades químicas

En forma de polvo el ácido ascórbico es relativamente estable en aire. En ausencia de oxígeno y otros agentes oxidantes en calor, también es estable. El ácido ascórbico es inestable en solución, especialmente en soluciones alcalinas. El proceso de oxidación es acelerado por la luz y el calor, es catalizado por trazas de cobre y hierro. El ácido ascórbico presenta un pH de máxima estabilidad en 5.4. Es incompatible con soluciones alcalinas, iones de metales pesados, especialmente cobre y hierro, metenamina, fenilefrina, maleato de pirilamina, nitrato de sodio, salicilato de sodio.³

1.2.6 Rutas de degradación

La degradación del ácido ascórbico se puede dar en condiciones anaeróbicas y aerobias.

En condiciones aerobias, el ácido ascórbico es oxidado a ácido dehidroascórbico, en presencia de ácido (hidrólisis ácida) y oxígeno (oxidación), se produce el ácido diketogulónico y ácido oxálico. (Ver Fig.2)

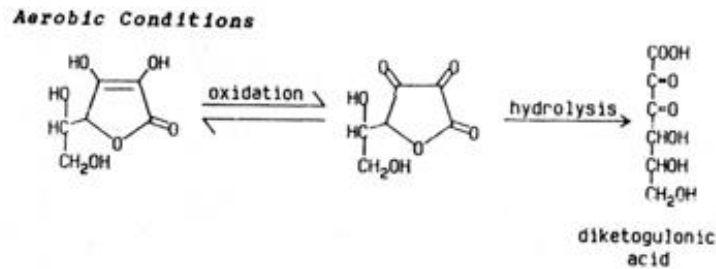


Fig. 2. Condiciones aerobias.⁴

En condiciones anaerobias el ácido ascórbico sufre hidrólisis y deshidratación, produciendo fufural y dióxido de carbono. La reacción de deshidratación es más rápida en medio ácido que en básico, debido a la catálisis provocada por el ion hidrogeno. (Ver Fig.3)

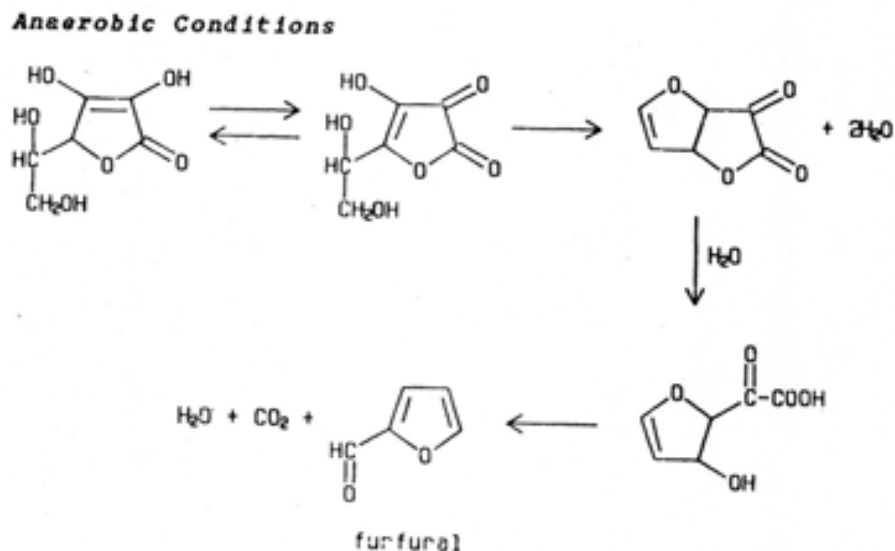


Fig. 3 Condiciones anaerobias.⁴

1.2.7 Propiedades fisicoquímicas

Tabla 1. Solubilidad del ácido ascórbico^{5,6}

Solvente	Solubilidad a 20 °C
Cloroformo	Prácticamente insoluble
Etanol	1 en 50
Etanol (95%)	1 en 25
Éter	Prácticamente insoluble
Aceites artificiales	Prácticamente insoluble
Glicerina	1 en 1000
Propilenglicol	1 en 20
Agua	1 en 3.5

1.2.8 Propiedades biológicas

a) Acción farmacológica

El ácido ascórbico desempeña un papel importante en la incorporación del oxígeno molecular al sustrato, puede actuar como cofactor en el sitio activo de enzimas hidroxilantes o como elemento protector en reacciones de hidroxilasas. Además interviene en la síntesis del colágeno, por lo cual una deficiencia de este provoca alteraciones en la piel, huesos, dientes y tejidos.

Interviene en la síntesis de la carnitina a partir de lisina, ayudando al transporte de ácidos grasos en las mitocondrias; su acción reductora y quelante explica su interacción con iones metálicos, favoreciendo su absorción en el intestino ayudando prevenir anemia.⁷

Debido a su efecto antioxidante y su habilidad de fortalecer los tejidos a través de la formación y mantenimiento del colágeno, el ácido ascórbico es usado para tratar infecciones virales, bacterianas e infecciones causadas por hongos.

b) Metabolismo

El ácido ascórbico se absorbe en el tubo digestivo por el mecanismo de transporte dependiente de Na⁺, hasta cantidades de 180mg, la absorción es del 80-90%, pero con una ingesta de 1-12g la absorción desciende al 50%. La capacidad de absorción total es de 1.200mg en 24h.

En concentraciones plasmáticas normales de 0.8-0.9mg/dL, el ácido ascórbico es filtrado por el riñón y reabsorbido en el túbulo, eliminándose en forma de metabolitos como son el ácido

fenolico ó melanico, p-hidroxifenilpirúvico y ácidos p-hidroxifeniláctico. Una pequeña parte se convierte en ácido oxálico; también puede ser eliminado por heces al no poder ser absorbido.⁷

c) Dosis y vías de administración

La ingesta de 50-100mg diarios de ácido ascórbico ayuda a impedir la aparición de escorbuto; en el embarazo y lactancia se necesita de 70-120mg/día. En situaciones extremas como lo son traumatismos, quemaduras o intervenciones quirúrgicas se necesita una dosis de 150mg/día, con el fin de regenerar el colágeno de la piel y tejidos.

Las necesidades diarias de ácido ascórbico en adultos van de 50 a 75mg, de 30mg para un lactante y de 30 a 60mg para un preescolar o escolar (se clasifican a los niños de 2 a 4 años como preescolares y de 5 a 9 años como escolares).

No evita la aparición de resfriados de naturaleza viral, aunque la administración de 1-2mg/día durante varios meses puede reducir la gravedad de los síntomas.⁷

d) Reacciones adversas

Es bastante inocuo. A dosis muy altas puede irritar el tubo digestivo o el epitelio urinario por la acción acidificante en la orina; las megadosis pueden provocar hemólisis en enfermos deficitarios en G-6-PD(glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa).

Puede alterar los resultados de laboratorio en enfermedades con glucosuria y dar falsos negativos en las hemorragias ocultas del carcinoma de colon.⁷

1.3 Gomas

Las gomas son productos sólidos, unidos, elaborados principalmente con azúcares como fuente de energía con rápida asimilación, en la obtención de ellas se pueden utilizar diversos agentes gelificantes, como la gelatina. Aromatizadas y coloreadas mediante aditivos, las gomas se presentan con formas y tamaños variados.

Como forma farmacéutica en la FEUM 10^a una goma es una preparación sólida, unidos, que contienen uno o más fármacos, cuya base puede tener componentes naturales o sintéticos. Donde su vía de administración es oral.⁸

Tabla 2. Ventajas y desventajas de las gomitas.

Ventajas	Desventajas
-Fácil administración -Dosificaciones exactas -Facilidad de manejo -Bajo costo -Producción de alta velocidad	-No apta para diabéticos -Administrarse con supervisión -Se puede confundir fácilmente con un dulce

1.3.1 Formulación de las gomitas

La formulación de la gomita consta de los siguientes excipientes: principio activo (dosis terapéutica), antioxidante (0.3 - 0.6%), acidulante (0.3 - 0.6%), gelificante (5.0 - 8.0%), edulcorante (65.0 - 70.0%), saborizante (0.15 - 0.20%), colorante (0.15 - 0.20%) y vehículo (22.0 - 25.0%).

De acuerdo a su función cumplen un papel importante dentro de la formulación, por lo que es importante mencionar para que sirven cada uno de ellos.

a) Antioxidante

Es una sustancia capaz de inhibir la oxidación que puede ser agregada con este propósito a productos farmacéuticos expuestos al deterioro por procesos oxidativos.¹

b) Acidulante

Es una sustancia que modifica la acidez, potencia y/o encubren sabores, además de modificar el pH. Inhiben hongos y bacterias incluyendo la germinación de esporas.

c) Edulcorante

Sustancia aditiva que se suele incluir en ciertos alimentos o productos farmacéuticos con el objeto de modificar su acidez o reforzar su sabor; son aceptados por su sabor dulce ya que la percepción sensorial se lleva a cabo por distintos compuestos químicos, con propiedades sensoriales agradables para los individuos.³

Los edulcorantes o dulcificantes como se les conoce generalmente, se dividen en dos categorías. Los dulcificantes intensos son muchas veces más dulces que la sacarosa y se utilizan por consiguiente en muy bajas concentraciones. Los dulcificantes por volumen son

casi tan dulces como la sacarosa y por tanto se utilizan en cantidades aproximadamente iguales.⁹

d) Gelificante

Son sustancias capaces de aumentar la viscosidad y textura a través de la formación de un gel.

e) Saborizante

Son compuestos naturales y sintéticos, líquidos o en polvo, utilizados en diferentes industrias, principalmente en la alimenticia y farmacéutica, que sirven para dar sabor y color a los productos elaborados, con el fin de que sea agradable a los individuos que consumen el producto.

El sabor es uno de los atributos más importantes de los alimentos y es detectado por los sentidos del gusto y el olfato. Los agentes saborizantes se han utilizado desde los tiempos más remotos para aumentar el atractivo de los alimentos. Originalmente, los saborizantes eran formas desecadas, y a menudo pulverizadas de especias, hierbas, bayas, raíces y tallos de plantas. Conforme aumento la demanda de saborizantes se idearon métodos para extraer los principios activos de los mismos. Los tipos más importantes de saborizantes naturales son los aceites esenciales que se extraen de los tejidos vegetales. Los saborizantes sintéticos que por lo general son copias de los aceites esenciales resultan más baratos y mucho más convenientes de utilizar que los saborizantes naturales. Se disuelven por lo general en alcohol etílico u otro solvente permitido, pero también se obtienen en formas de polvo, preparadas mediante el secado por aspersión del material saborizante que se encuentra en solución en goma arábiga.¹⁰

f) Colorante

Los tintes y pigmentos que se utilizan en los alimentos se conocen colectivamente como colorantes de los alimentos o, simple y sencillamente, colorantes. Se añaden a los alimentos para hacerlos más atractivos al consumidor o al comprador o bien para reponer los colores naturales que se pierden durante la elaboración de los alimentos.¹⁰

1.4 Suplementos alimenticios

La Food and Drug Administration(FDA) define a los suplementos nutricionales como productos elaborados a base de nutrientes y otros componentes presentes en los alimentos con

el propósito de satisfacer las necesidades particulares de nutrición determinadas por condiciones físicas, fisiológicas o metabólicas específicas.

A partir de 1994, bajo la denominación de “dietary supplements” la FDA deja de ser responsable de la seguridad de estos productos, pasando su responsabilidad a la Dietary Supplement Health and Education Act (DSHEA).

Los suplementos alimenticios están constituidos por uno o varios nutrientes, los cuales se adicionan a la dieta para corregir o prevenir deficiencias de vitaminas, minerales y proteínas, ayudan en la recuperación del paciente que sufre alguna enfermedad o ha sido sometido a intervención quirúrgica, así como para mejorar el estado general de salud.

Estos se consumen por vía oral, contienen un "ingrediente alimenticio" destinado a complementar la alimentación. Algunos ejemplos de suplementos dietéticos son las vitaminas, los minerales, las hierbas (una sola hierba o una mezcla de varias), otros productos botánicos, aminoácidos y componentes de los alimentos como las enzimas y los extractos glandulares.

Vienen en diferentes presentaciones, como pastillas, cápsulas, líquidos y polvos. No se presentan como sustitutos de un alimento convencional ni como componente único de una comida o de la dieta alimenticia.

Además el producto debe contener todos los nutrimentos en cantidades adecuadas según la edad, el estado fisiológico y el estado nutricional de la población a la que va dirigido. Debe ser tolerado clínicamente de tal manera que su ingestión en las cantidades recomendadas no cause problemas de intolerancia o mala absorción, además de que debe ser ampliamente aceptado desde el punto de vista sensorial. El suplemento debe cumplir con una serie de propiedades fisicoquímicas que permitan la facilidad de su uso, su estabilidad y su durabilidad por un periodo suficiente desde que se produce hasta que se consume.¹¹

En México, se define como suplementos alimenticios: *a todo producto a base de hierbas, extractos vegetales, alimentos tradicionales, deshidratados o concentrados de frutas, adicionados o no, de vitaminas o minerales, que se puedan presentar en forma farmacéutica y cuya finalidad de uso sea incrementar la ingesta dietética total, complementaria o suplir alguno de sus componente*.¹²

Según el Reglamento de control sanitario de productos y servicios: *los suplementos alimenticios podrán estar constituidos por carbohidratos, proteínas, aminoácidos, ácidos grasos, metabolitos, plantas, hierbas, algas, alimentos tradicionales deshidratados u otros que establezca la Secretaría, presentarse ya sea en forma aislada o en combinación, adicionados o no de vitaminas o minerales y su consumo no deberá representar un riesgo para la salud.*¹³

*Los productos a los que se les incorporen sustancias con acción farmacológica reconocida o aquéllos a los que con base en su composición se les atribuyan propiedades terapéuticas, preventivas o rehabilitatorias, no podrán comercializarse en el territorio nacional, salvo que cumplan con las disposiciones aplicables a los insumos para la salud.*¹³

1.5 Métodos analíticos

Un método analítico es la adaptación específica de una técnica, para llevar a cabo una medición determinada. Esto para determinar el analito en una muestra. Existen diferentes métodos analíticos para cuantificar el ácido ascórbico entre ellos se encuentra la volumetría por oxidoreducción, espectrofotometría y cromatografía gas-liquido y cromatografía de alta resolución, así como por polarografía y métodos enzimáticos.

1.5.1 Titulaciones volumétricas

En un análisis volumétrico se denomina valoración a una operación básica. En esta, una solución de un reactivo de concentración exactamente conocida (solución estándar) se añade a un segundo reactivo, la solución de la muestra cuya cantidad o concentración se va a determinar.

Se añade el valorante a la muestra hasta que se ha completado exactamente la reacción, es decir que la cantidad de valorante sea añadido equivale químicamente a la cantidad de muestra.

El estado en que se produce esta equivalencia se conoce como punto de equivalencia de la valoración y su estimación experimental, como punto final de la valoración. A partir de la cantidad de valorante empleado para alcanzar el punto final, de su concentración y del conocimiento de la estequiometría de la reacción de valoración, se puede calcular la cantidad de sustancia de la muestra.¹⁴

Existen diversas formas de clasificar las titulaciones: ¹⁵

- Por la forma de realizar la titulación
- Por el tipo de reacción química
- Por la cantidad de reactivo por titular

Por la forma de realizar la titulación se clasifican en: ¹⁵

- a) Titulación directa: el reactivo titulante se adiciona directamente a la disolución que contiene un reactivo por titular.
- b) Titulación por retroceso: se añade al reactivo por titular A, con una pipeta volumétrica o bureta, una cantidad conocida y en exceso de una disolución estandarizada del reactivo B. El exceso de B que no reacciona con A se titula con el reactivo titulante D.
- c) Titulación indirecta: se hace reaccionar el reactivo por titular A con un reactivo específico B, como resultado de esta reacción se tiene la cantidad químicamente equivalente de un reactivo C el cual se titula con un reactivo D.

Por el tipo de reacción química, las titulaciones se clasifican en: ¹⁵

- a) Titulaciones ácido-base acuosas
- b) Titulaciones ácido-base no acuosas
- c) Titulaciones complejométricas
- d) Titulaciones por precipitación
- e) Titulaciones por óxido-reducción(Fundamentos del análisis farmacéutico)

Distintas sustancias de interés farmacéutico tiene propiedades óxido-reductoras, como es el caso del ácido ascórbico. Por lo cual se puede titular por medio de agentes oxidantes o reductores.

1.5.2 Valoraciones óxido-reducción

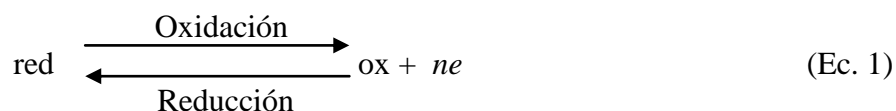
Las titulaciones redox están fundamentadas en la reacción de oxidación-reducción entre el analito y el titulante. Además de los muchos analitos comunes en la química, biología, el

medio ambiente y la ciencia de los materiales, que pueden ser medidos por valoraciones redox, también existen estados de oxidación exóticos de elementos en materiales poco comunes, tales como superconductores y materiales láser. ¹⁶

Distintas sustancias de interés farmacéutico tienen propiedades óxido reductoras, por lo que es necesario cuantificarse por medio de una valoración redox. ¹⁴

Aquí intervienen dos semireacciones; cada semireacción incluye un par conjugado redox, y el proceso neto de la reacción global es la transferencia de uno o más electrones desde un par a otro. ¹⁴

Semireacción redox general:



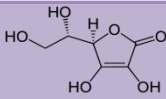
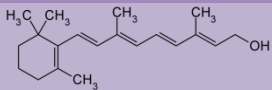
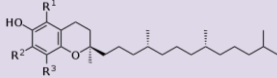
Donde red representa la forma reducida; ox la forma oxidada; n el número de electrones transferidos y e al electrón.

En esta reacción se puede observar que en la oxidación hay una pérdida de electrones y al ocurrir la reducción existe una ganancia de electrones. ¹⁴

La propiedad más importante en una disolución que contiene especies químicas con propiedades óxido reductoras es el potencial eléctrico (E), por lo que generalmente se estudia como varía este potencial durante la titulación trazando la curva $E=f(x)$. El potencial varía debido al cambio de las especies presentes en la disolución así como de sus concentraciones. ¹⁶

A continuación se presenta la siguiente tabla con los principales agentes oxidantes y reductores en el ámbito químico.

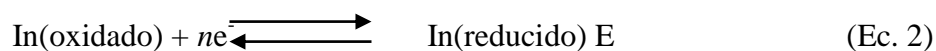
Tabla 3. Agentes oxidantes y reductores ¹⁶

Oxidantes		Reductores	
BiO_3^{-1}	Bismutato		Ácido Ascórbico
BrO_3^{-1}	Bromato	BH_4^{-1}	Boro hidruro
Br_2	Bromo	Cr^{+2}	Cromo
Ce^{+4}	Cerio	$\text{S}_2\text{O}_4^{-2}$	Ditionito
Cl_2	Cloro	Fe^{+2}	Ferroso
ClO_2	Dióxido de cloro	N_2H_4	Hidracina
CrO_3^{-2}	Dicromato	NH_2OH	Hidroxilamina
FeO_4^{-2}	Ferrato(IV)	H_2PO_2	Ácido Hipofosforoso
H_2O_2	Peróxido de hidrogeno		Retinol
IO_3^{-1}	Yodato	Sn^{+2}	Estaño
I_2	Yodo	SO_3^{-2}	Sulfito
HNO_3	Ácido nítrico	SO_2	Dióxido de sulfuro
O	Átomo de oxígeno	$\text{S}_2\text{O}_3^{-2}$	Tiosulfato
O_3	Ozono		α -Tocoferol
HClO_4	Ácido Perclórico		
IO_4^{-1}	Peryodato		
MnO_4^{-1}	Permanganato		
$\text{S}_2\text{O}_8^{-2}$	Peroxidisulfato		

a) Indicadores REDOX

Un indicador redox es un compuesto que cambia de color cuando se pasa de oxidado a estado reducido.

Para predecir la distribución potencial sobre el cual el color del indicador cambiará, primero escribimos la ecuación de Nernst para el indicador (In).



$$E = E^\circ - \frac{0.05916}{N} \log \left[\frac{\text{In(reducido)}}{\text{In(oxidado)}} \right] \quad (\text{Ec. 3})$$

Al igual que con los indicadores ácido-base, se puede observar el color de In (reducida) cuando:

$$\left(\frac{\text{In (reducido)}}{\text{In (oxidado)}} \right) \geq \frac{10}{1} \quad (\text{Ec. 4})$$

Y se puede observar el color del In (oxidado) cuando:

$$\left(\frac{\text{In (reducido)}}{\text{In (oxidado)}} \right) \leq \frac{10}{1} \quad (\text{Ec. 5})$$

Poner estos coeficientes en la ecuación (Ec. 3) nos dice que se producirá el cambio de color en todo el rango:

$$E = \left[E^\circ \pm \frac{0.05916}{n} \right] \text{ volts} \quad (\text{Ec.6})$$

Cuanto mayor sea la diferencia de potencial entre el valorante estándar y el analito, más nítida es la ruptura de la curva de valoración en el punto de equivalencia. Una valoración redox es generalmente factible si la diferencia entre valorante y el analito es de $E \geq 0.2 \text{ V}$. Sin embargo, el punto final de tal valoración no es muy fuerte y se detecta mejor potenciométricamente. Si la diferencia en los potenciales formales es $E \geq 0.4 \text{ V}$, el indicador redox por lo general da un punto satisfactorio.¹⁶

1.5.3 Valoraciones yodométricas

El yodo es un agente oxidante débil que se utiliza principalmente para la determinación de reductores fuertes. El yodo se reduce de acuerdo con la semireacción:



Algunas sustancias pueden determinarse por valoración directa con yodo, pero dos de ellas, sobre todo las valoraciones de arsenito y de tiosulfato, son de gran importancia.

Muchas sustancias son capaces de oxidar el yoduro hasta yodo y estas son susceptibles de analizarse, por valoración del yodo liberado con tiosulfato; este es el método de valoración indirecta.

Se preparan las soluciones estándares de yodo pesando exactamente el reactivo puro. Es más sencillo preparar la solución a partir de un producto que sea reactivo y luego estandarizarlo. El yodo es poco soluble en agua, pero forma un ión triyoduro soluble en soluciones de yoduro.



El uso de yoduro en la solución incrementa la solubilidad del yodo, y a la vez, hace decrecer su volatilidad, con lo que contribuye a la estabilidad de las soluciones de yodo.

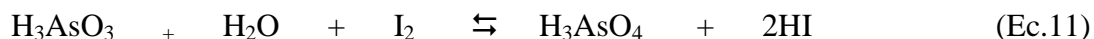


El trióxido de arsénico es el mejor patrón primario para las soluciones de yodo y es ligeramente soluble en agua fría, se disuelve más rápidamente en agua hirviendo y se solubiliza fácilmente con hidróxido de sodio en formación de arsenito de sodio, Na_3AsO_3 (Ec. 4).

Al utilizarse esta última, antes de añadirse el yodo debe neutralizarse con ácido clorhídrico, y después añadir un amortiguador de pH que mantenga la solución neutra, pues si el yodo se añade en solución alcalina que contiene H_3AsO_3 , se forman moléculas de hipoyodito de sodio NaIO (Ec.10), o un compuesto similar, por lo que el yodo no reaccionara con el ion arsénico.



Como buffer puede añadirse bicarbonato de sodio para neutralizar el ácido yodhídrico, HI, formado en la reacción reversible (Ec. 12).



Este remueve rápidamente el HI formado, causando que la reacción se lleve a cabo hacia la derecha, bajo estas condiciones de experimentación, el bicarbonato de sodio no reacciona con el yodo, pero si un exceso de yodo es añadido, podría reaccionar ligeramente.



La reacción del yodo y el arsénico se da cuantitativamente en una solución neutra (Ec. 13). A continuación se describe en esta reacción.



A partir de la cual se deduce que la posición de equilibrio depende del pH. Una posterior dependencia del pH viene impuesta por la posibilidad de ionización del ácido arsenioso.

Para la valoración cuantitativa del ácido arsenioso con yodo, a una velocidad conveniente, se ha comprobado que el pH debería estar en el intervalo aproximado de 6 a 9 es permisible un pH más bajo si se realiza lentamente la valoración mientras que un pH es satisfactorio si la solución contiene yoduro.

Puede detectarse el punto final de las valoraciones yodométricas mediante el color característico del yodo. Se utiliza como indicador al almidón ya que en presencia de yoduro, el almidón absorbe al yodo para dar un color azul intenso característico, si falta yoduro no se produce color.^{17,18}

a) El Complejo de Yodo-Almidón

Numerosos procedimientos analíticos se basan en valoraciones redox que implican yodo. El almidón es el indicador de elección para estos procedimientos, ya que forma un complejo de color azul intenso con yodo. El almidón no es un indicador redox, ya que responde específicamente a la presencia de I₂, no a un cambio en el potencial redox.

La fracción activa del almidón es amilasa (Ver Fig. 4), un polímero del azúcar α -D-glucosa, un poco con la unidad de repetición se muestra en la figura. En la presencia de almidón, el yodo forma cadenas de I₆ en el interior de la hélice de amilasa y la convierte a un color azul oscuro (Ver Fig.5).

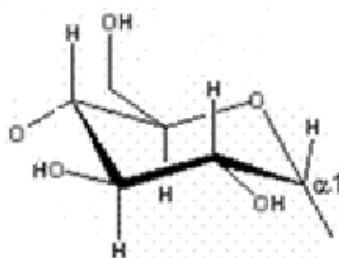


Fig.4 Estructura química de la amilasa¹⁶

El almidón se biodegrada fácilmente, por lo que debe estar recién disuelto o en solución además debe contener un conservante, como HgI₂ (~ 1 mg / ml) en timol.

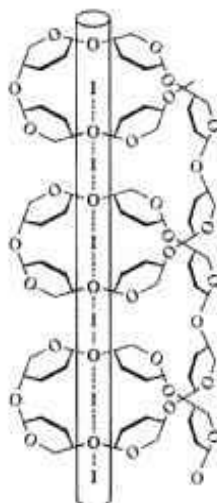


Fig. 5 Estructura esquematica del complejo yodo-almidón¹⁶

Un producto de hidrólisis de almidón es la glucosa, que es un agente reductor. Por lo tanto, la solución de almidón parcialmente hidrolizado puede ser una fuente de error en una titulación redox.¹⁶

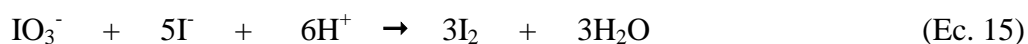
La sensibilidad del indicador aumenta en medio ácido y disminuye en presencia de sustancias orgánicas o por calentamiento.^{17, 18}

1.5.4 Análisis yodométrico del ácido ascórbico

Una oxidación poco común es la determinación del ácido ascórbico mediante titulación con yodo. El yodo se oxida al grupo funcional “enodiol” del ácido ascórbico al grupo alfa-dicetonico del ácido dehidroascórbico según la (Ec.14).



El ácido ascórbico puede determinarse por titulación directa con yodo, o bien puede añadirse un exceso medido de yodato de potasio valorado junto con yoduro de potasio y ácido ascórbico. El yodato y yoduro reaccionan en medio ácido produciendo yodo.



El yodo reacciona con el ácido ascórbico, y el yodo que no reacciona se determina mediante titulación por retroceso con tiosulfato de sodio valorado.¹⁹

1.6 Optimización de métodos analíticos

Optimización se puede definir como un proceso de seleccionar, a partir de un conjunto de alternativas posibles, aquella que mejor satisfaga el o los objetivos propuestos. Así mismo se puede considerar como una búsqueda de la mejor manera de realizar una actividad.

En la actualidad en la industria farmacéutica se busca de optimización de sus procesos de fabricación, así como de sus métodos de análisis. Con la finalidad de tener un menores costos y mayores beneficios, es decir que se disminuya los gastos en reactivos e instalaciones y se aumente la productividad.

Al reconocerse como un suplemento alimenticio las gomitas de ácido ascórbico y al no existir un método farmacopeico o compendiado, se necesita desarrollar y optimizar un método de análisis con la finalidad de conocer la concentración del principio activo.

Las razones por las cuales se debe optimizar un método analítico son:

- No hay un método apropiado para cuantificar el analito en la matriz
- Mejora la identificación del analito
- El método que existe no tiene la exactitud y precisión necesaria
- Los métodos analíticos existentes son muy caros, consumen demasiados reactivos u horas hombre
- Fácil de usar y pequeño costo de análisis
- Preparación de muestras que minimice tiempo, esfuerzo y consumo de materiales, así como disminuir el volumen de muestra

Así mismo, se debe estudiar todas las variables químicas e instrumentales para poder definir los parámetros a optimizar, estos pueden ser:

- Análisis del tipo de muestra
- Reactivos a utilizar
- Condiciones de muestra (temperatura, tiempo de disolución)
- Detección y cuantificación

Ya optimizado el método analítico se busca demostrar que éste es útil para un analito con una matriz determinada, usando la instrumentación específica, así como un tratamiento de datos

rápido que arroje datos exactos y reproducibles, y que además el método pueda ser transferido de un laboratorio a otro. Todo esto se logra por medio de la validación del método analítico

1.7 Validación

Es la evidencia documentada que demuestra que a través de un proceso específico se obtiene un producto que cumple consistentemente con las especificaciones de calidad establecidas.²⁰

La validación es la evidencia documental generada a través de la recopilación y evaluación de los datos obtenidos en la calificación y de las pruebas específicas, basadas en conocimiento del proceso, sistema o método, para demostrar funcionalidad, consistencia y robustez.²

1.8 Validación de métodos analíticos

La validación de un método es el proceso que establece, mediante estudios de laboratorio; que las características de desempeño del método, satisfacen los requisitos para su aplicación analítica.²¹

Validar un método de análisis consiste en verificar y documentar su validez, esto es, su adecuación a unos determinados requisitos previamente establecidos. La validación es pues el proceso de verificar que el método es adecuado para su finalidad, esto es, adecuado para resolver un problema analítico particular.²²

Hay unas cuantas preguntas que surge inmediatamente y que requieren respuestas prácticas:²²

a) ¿Por qué es necesario validar los métodos?

- El análisis se considera hoy en día un proceso mediante el cual obtenemos información. Se realizan millones de análisis cada día en el mundo en los ámbitos más variados: análisis de productos manufacturados, análisis clínicos, forenses, químicos y físicos,...En todos ellos se requiere una confianza en los resultados obtenidos. La validación de métodos analíticos permiten conseguir calidad, otorgado la confianza necesaria a la vez que confieren un grado elevado de comparabilidad entre los resultados de los análisis químicos.²⁰

b) ¿Cuándo y cuantas veces se debe validar un método?

- Un método analítico siempre debe validarse cuando sea necesario verificar que sus parámetros de calidad se adecuan al problema analítico particular que debemos resolver en nuestro laboratorio.²²

c) ¿Cómo se lleva a cabo?

- Debe validarse el procedimiento completo
- Debe validarse todo el intervalo de concentraciones
- Debe validarse teniendo en cuenta la variedad de matrices²²

d) ¿Quién establece estos requisitos y quién debe validarlo?

- Cabe mencionar que el laboratorio que desea utilizar para el análisis de rutina un método analítico previamente validado, es el responsable de asegurar que dicho método es válido para el uso propuesto en las condiciones de análisis rutinario.²²

e) ¿Cuántos requisitos existen y cuáles son?

-Existen 13 parámetros, los cuales son: precisión del sistema, adecuabilidad del sistema, linealidad del sistema, especificidad, exactitud, repetibilidad, linealidad del método, precisión intermedia, estabilidad, límite de detección, límite de cuantificación, robustez y tolerancia.²²

1.8.1 Parámetros de la validación

Tabla 4. Parámetros de validación según la FDA^{23,24}

Parámetro de desempeño	Contenido/ Potencia/ Valoración	Prueba de impureza/ Contenido Valoración	Prueba límite para el control de impurezas	Pruebas de Identificación
Precisión/ Adecuabilidad del sistema	Si	Si	Si	*
Linealidad del Sistema	Si	Si	No	No
Especificidad (1)	Si	Si	Si	Si
Exactitud y repetibilidad	Si	Si	No	No
Precisión intermedia(2)	Si	Si	No	No
Estabilidad analítica de la muestra(3)	*	*	No	No
Límite de detección	No	No	Si	No
Límite de cuantificación	No	*	No	No
Robustez	*	*	*	No
Tolerancia	*	*	*	No

Nota:

* Puede ser requerido dependiendo de la naturaleza del método.

(1) La falta de especificidad de un método analítico, puede ser compensada con otra alternativa analítica de soporte, como por ejemplo la cromatografía de capa fina.

(2) También es definido como un estudio de tolerancia.

(3) Un método que es exacto y lineal, por definición es específico al placebo analítico a los otros componentes de la muestra.

Además los métodos analíticos para fines de validación se clasifican en cuatro categorías según la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos 10ª edición, debido a que requieren de diferentes esquemas de estudio.⁸

Categoría I: Métodos analíticos para cuantificar a un componente específico en muestras de producto terminado o en pruebas de estabilidad, ya sea en fármacos, aditivos o preparados farmacéuticos, u otros analitos de interés (conservador, solventes).

Categoría II: Métodos analíticos para la determinación de impurezas (productos de degradación, sustancias relacionadas, isómeros óptico, etc.) en muestras de fármacos, preparados farmacéuticos y aditivos. Estos métodos pueden incluir determinaciones cuantitativas o pruebas límite. En estas últimas, el interés es establecer si el analito, excede o no, un valor límite. Los métodos de pureza quedan incluidos en esta categoría.

Categoría III: Métodos analíticos utilizados en la determinación de un analito en una muestra con el objeto de evaluar una característica de desempeño del preparado farmacéutico (disolución en cápsulas, liberación controlada en tabletas, entre otras).

Categoría IV: Pruebas de identificación de un analito en muestras de fármacos, aditivos o preparados farmacéuticos, cuyo propósito es establecer la presencia del analito de interés.

Tabla 5. Parámetros de validación según FEUM 10^a 25

Características de desempeño	Categoría I	Categoría II		Categoría III	Categoría IV
		Cuantitativas	Pruebas límite		
Verificación del sistema	*	*	*	*	NO
Precisión del sistema	SI	SI	*		NO
Linealidad del sistema	SI	SI	*	*	NO
Especificidad/ Selectividad	SI	SI	SI	*	SI
Exactitud del método	SI	SI	*	*	NO
Linealidad del método	SI	SI	*	*	NO
Precisión del método	SI	SI	NO	SI	NO
Límite de detección	NO	NO	SI	*	NO
Límite de cuantificación	NO	SI	NO	*	NO
Tolerancia	*	*	*	*	*
Robustez	*	*	*	*	*

* Puede ser necesario dependiendo de la naturaleza del método.

a) Linealidad del sistema

Es la verificación de que la respuesta analítica y la concentración del analito (puede ser una sustancia de referencia) se ajustan al modelo matemático, en un intervalo de concentraciones pertinentes a la aplicación analítica.²⁵

El analista debe preparar por lo menos por triplicado 5 niveles de concentración (intervalo) de la solución de referencia ya sea por dilución (a partir de una misma solución concentrada) o por pesadas independientes (cuando no sea posible prepáralas por dilución).²⁶

b) Precisión del sistema

Grado de concordancia relativa de la respuesta analítica de soluciones de referencia de concentración o magnitud conocida.²⁵

El analista debe preparar por lo menos un sextuplicado de soluciones a la concentración del analito que represente la concentración de la solución de referencia utilizada, o en ciertos

casos, la concentración que represente el 100% de la muestra procesada para su medición; preparadas por dilución o por pesadas independientes. ²⁶

c) Linealidad del método

Capacidad de un método analítico para dar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito (sin sesgo) dentro de un intervalo dado. ²⁵

Se debe tomar en cuenta los siguientes aspectos:

- Cuando se conocen los componentes de la muestra y es posible preparar un placebo analítico. Donde el analista debe preparar el placebo analítico con el tipo de componentes que generalmente están presentes en la muestra. A la cantidad de placebo analítico equivalente a una muestra analítica por triplicado, adicionarle la cantidad de analito (puede ser una sustancia de referencia secundaria) correspondiente al 100% de este en la muestra.
- Cuando no se conocen los componentes de la muestra. El analista debe analizar la muestra con el método, para determinar el contenido del analito. El mismo analista debe preparar por lo menos 3 muestras adicionadas por ejemplo utilizando la mitad de la muestra analítica que originalmente requiere el método y adicionar el analito (puede ser una sustancia de referencia secundaria) hasta completar lo que represente el 100% de este en la muestra.

En ambos casos se debe seleccionar al menos 2 niveles, superior e inferior de la cantidad del analito (intervalo) y preparar el placebo adicionado al menos por triplicado a cada nivel manteniendo constantemente la cantidad de placebo analítico en los tres niveles. ²⁶

d) Exactitud

Es la concordancia absoluta entre el resultado obtenido con el método y la cantidad verdadera del analito presente en la muestra a una cantidad fija. ²⁵

Se deben tomar en cuenta los siguientes aspectos:

- Se conocen los componentes de la muestra y es posible preparar un placebo analítico. El analista debe preparar el placebo analítico con el tipo de componentes que generalmente están presentes en la muestra. A la cantidad de placebo analítico

equivalente a una muestra analítica por sextuplicado, adicionarle la cantidad de analito (puede ser una sustancia de referencia analítica) correspondiente al 100% de este en la muestra. Los placebos adicionados deben ser analizados por un mismo analista bajo las mismas condiciones, utilizando como referencia, la sustancia empleada en la adición al placebo analítico.

- No se conocen los componentes de la muestra. El analista debe analizar la muestra con el método, para determinar el contenido del analito. El mismo analista debe preparar por lo menos 6 muestras adicionadas del analito, por ejemplo utilizando la mitad de la muestra analítica que originalmente requiere el método y adicionar el analito (puede ser una sustancia de referencia secundaria) hasta completar lo que represente el 100% de este en la muestra. Las muestras adicionadas deben ser analizadas por un mismo analista bajo las mismas condiciones utilizando como referencia la sustancia empleada en la adición de la muestra.²⁶

e) Especificidad

Capacidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente al analito de interés y no a otros componentes de la muestra, que pueden estar presentes.²⁵

Partiendo de la experiencia en el análisis de la muestra, se deben establecer las posibles sustancias interferentes, y adicionar cantidades conocidas de estas, solas o combinadas a la muestra y evaluar su respuesta al método, bajo las mismas condiciones de análisis.

Algunos métodos con los que podemos evaluar las sustancias interferentes son los siguientes: Métodos de identificación, de contenido/ potencia/ valoración, de contenido/ valoración de impurezas, de límite de impurezas, indicadores de estabilidad.

En el caso de métodos no selectivos como por ejemplo los métodos que utilizan sistemas de medición volumétricos, la especificidad para los componentes de una muestra, es sustentada con los resultados de exactitud y linealidad del método, si el método cumple con los criterios de aceptación.²⁶

f) Repetibilidad

Se refiere a la variación de los resultados de las muestras, al aplicar el método en una corrida analítica. La repetibilidad es una propiedad crítica del método analítico porque mide la variación del método analítico en la rutina de trabajo.²⁵

g) Reproducibilidad

Expresa la variación dentro de un mismo laboratorio, cuando el método analítico se aplica en diferentes días y con diferentes analistas.²⁵

Se debe analizar por triplicado una muestra homogénea del producto que tenga un nivel cercano o igual al 100% (en el caso de contenido/potencia/valoración) o una muestra homogénea cuyo contenido este incluido en el intervalo lineal de concentración de linealidad de método (para el caso de impurezas), en dos días diferentes y por dos analistas diferentes. Utilizar de preferencia la misma sustancia de referencia y los mismos instrumentos y/o equipos.²⁶

h) Estabilidad de la muestra

Es la propiedad de una muestra preparada para su cuantificación, de conservar su identidad fisicoquímica y la concentración de la sustancia de interés. Después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas.²⁵

El analista debe establecer la etapa de análisis en el cual se desea evaluar la estabilidad, además de determinar si en dicha etapa es posible fraccionar muestras (dependientes) o no (muestras independientes) y las condiciones de almacenaje.

Para determinar la estabilidad de muestras:

- Independientes, el analista debe procesar hasta la etapa preestablecida por lo menos por triplicado una muestra homogénea. Fraccionar cada una de las preparaciones de acuerdo a las condiciones de almacenaje de interés.
- Dependientes (a partir de una muestra homogénea) el analista debe analizar por triplicado (contenido/potencia/valoración inicial). Simultáneamente y de la misma muestra, procesar el número de muestras necesarias para cada condición de almacenaje hasta la etapa preestablecida (preparaciones) al menos por triplicado.

Para ambos casos se deberá proseguir el análisis de cada una de las fracciones o preparaciones al término de cada condición de almacenaje, utilizando una solución de referencia recientemente preparada si el método contempla el uso de una solución de referencia.²⁶

i) Límite de detección

Es la cantidad mínima de analito en una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de aplicación del método. Así las pruebas límite solamente indican que la cantidad del analito es superior o inferior a la concentración establecido.²⁵

j) Límite de cuantificación

Es la cantidad mínima de analito en una muestra que puede ser determinada con exactitud y precisión aceptable, bajo las condiciones de aplicación del método.²⁵

k) Robustez

Capacidad del método analítico de mantener su desempeño al presentarse variaciones pequeñas pero deliberadas, en las características normales de operación del método.²⁵

Se debe establecer aquellos factores instrumentales y/o no instrumentales, relacionados al propio método, que se consideren críticos. En cada condición de operación distinta; así como a la condición normal, analizar la misma muestra por lo menos por triplicado.

l) Tolerancia

Es el grado de reproducibilidad de los resultados de prueba obtenidos por el análisis de la misma muestra, bajo una variedad de condiciones tales como: diferentes laboratorios, analistas, instrumentos, lotes de reactivos, días, etc.²⁵

Se debe establecer aquellos factores ajenos al método, que se puedan presentar al reproducir el método en otras condiciones de uso, analizar la muestra por triplicado.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente la población pediátrica en México sufre de distintos problemas de salud como lo es el resfriado común y algunos problemas en la piel; al no poder sintetizar correctamente el colágeno en tejidos, huesos y cartílagos. El consumo diario del ácido ascórbico ayuda a prevenir y mejorar estos síntomas provocados por una deficiencia; por lo cual algunos médicos prescriben esta vitamina como suplemento alimenticio.

Generalmente el ácido ascórbico es administrado en soluciones poli vitamínicas, tabletas efervescentes y masticables. Hoy en día existe una formulación atractiva, versátil y novedosa considerada como golosina para la población pediátrica; puesto que es fácil de masticar, con colores y sabores agradables, como lo son las gomitas.

Al ser reconocidas las gomitas como suplementos alimenticios y al tener el ácido ascórbico una acción farmacología reconocida, es necesario que para su comercialización en el país; cumplan con las disposiciones aplicables para los insumos de salud, por lo que se busca adecuar y optimizar un método farmacopeico para su cuantificación, cumpliendo así con los parámetros de control de calidad establecidos en la industria farmacéutica dedicada a la fabricación de suplementos alimenticios.

Por lo que, en este trabajo se adecuará y optimizará un método Yodométrico para cuantificar el ácido ascórbico en gomitas de sabor lima-limón, fresa y mango; utilizando parámetros estadísticos, asegurando así que los datos sean exactos y reproducibles. Todo esto se logra por medio de la validación del método analítico propuesto.

Además se busca que este método pueda ser transferido al Laboratorio de Tecnología Farmacéutica II de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, con la finalidad de aportar conocimiento tecnológico y analítico a los alumnos.

3. OBJETIVO

Optimizar el método analítico para la cuantificación de ácido ascórbico en gomitas pediátricas.

3.1 Objetivos particulares

- Determinar los puntos críticos y optimizables del método analítico Yodométrico.
- Adecuar el método propuesto por la FEUM 8^a para materia prima, determinando así la cantidad de ácido ascórbico en las gomitas de sabor lima-limón.
- Por medio de los parámetros de validación: especificidad, exactitud y linealidad del método se sustentará el análisis para las gomitas de sabor fresa y mango.

4. HIPÓTESIS

El método analítico optimizado es útil para cuantificar ácido ascórbico en un suplemento alimenticio como lo son las gomitas pediátricas, de acuerdo a los parámetros de validación establecidas por la FDA y la FEUM 10^a.

5. DISEÑO EXPERIMENTAL

5.1 Material de laboratorio

- Agitador de vidrio
- Agitador magnético 1 pulgada
- Bulbo de látex
- Bureta de 10mL clase "A"
- Bureta de 25mL clase "A"
- Bureta de 50mL clase "A"
- Espátula metálica
- Matraz erlenmeyer de 250mL PYREX
- Papel Glassine
- Papel Parafilm
- Perilla de succión
- Pinza doble presión
- Pipeta graduada de 5mL
- Pipeta graduada de 10mL
- Pipeta volumétrica de 3mL clase "A" KIMAX
- Probeta de 50mL KIMAX
- Probeta de 100mL KIMAX
- Soporte universal
- Vaso de precipitados de 100mL KIMAX
- Vaso de precipitados de 250mL KIMAX
- Vaso de precipitados de 600mL KIMAX
- Vaso de precipitados de 1000mL KIMAX

5.2 Reactivos

Reactivos	Marca	Lote
Acido Clorhídrico	J. T. Baker	H02C08
Acido Sulfúrico	J. T. Baker	H51C01
Agua destilada libre de CO ₂	Planta Piloto	02 al 25 Marzo 09
Almidón SI	Merck	6925368
Bicarbonato de Sodio GR	J. T. Baker	36509
Hidróxido de Sodio	J. T. Baker	000008742
Trióxido de Arsénico	J. T. Baker	M28775
Yodo 0.1N	J. T. Baker	2208
Yoduro de Potasio GR	Meyer	J0212081
Yoduro mercurico rojo	Meyer	163213
Acido ascórbico	Merck	AAS-01-XC-R

5.3 Equipos

Equipo	Modelo
Balanza Analítica	OHAUS Analytical Standard
Parrilla de agitación y calentamiento	Thermo scientific Cimarec Mod.SP131635

5.4 Principio activo y materia primas

Materia Prima	Proveedor	Lote
Acido Ascórbico	Farmacia Paris	N220
Acido cítrico	Helm de México	23A1010
Agua Purificada	Planta Piloto	02 al 25 Marzo 09
Azúcar Refinada	Zulca	sin lote
Colorante amarillo huevo	Dosicolor Deiman	sin lote
Colorante rojo fresa	Dosicolor Deiman	sin lote
Colorante verde limón	Dosicolor Deiman	sin lote
Glucosa líquida	Helm de México	sin lote
Grenetina 275 bloom	Helm de México	A-1185
Sabor fresa	Helm de México	336
Sabor lima-limón	Helm de México	7A2
Sabor mango	Helm de México	678

5.5 Preparación de soluciones.

5.5.1 Ácido sulfúrico 2.0N: En un matraz volumétrico de 1000mL conteniendo 500mL de agua, agregar cuidadosamente y con agitación, 55mL de ácido sulfúrico concentrado, enfriar a 25°C y llevar a volumen.

5.5.2 Ácido sulfúrico 3.0N: En un matraz volumétrico de 1000mL conteniendo 500mL de agua, agregar cuidadosamente y con agitación, 82mL de ácido sulfúrico concentrado, enfriar a 25°C y llevar a volumen.

5.5.3 Ácido clorhídrico 2.0M: En un matraz volumétrico de 1000mL conteniendo 500mL de agua, agregar cuidadosamente y con agitación, 165mL de ácido clorhídrico concentrado, enfriar a 25°C y llevar a volumen.

5.5.4 Hidróxido de sodio 1.0M: En un matraz volumétrico de 1000mL, disolver 40g de hidróxido de sodio en agua libre de dióxido de carbono, llevar a volumen con el mismo disolvente.

5.5.5 SI Almidón soluble: Mezclar 1.0g de almidón soluble con 10mg de yoduro mercuríco rojo y suficiente agua fría para hacer una pasta fina, agregar 200mL de agua en ebullición y dejar hervir durante 1 min con agitación constante, dejar enfriar. Usar únicamente la solución clara.⁵

5.5.6 SV Yodo 0.1N: En un matraz volumétrico de 1000mL, disolver 14g de yodo en una solución de 36g de yoduro de potasio en 100mL de agua, agregar 3 gotas de ácido clorhídrico y llevar a volumen con agua.

- ⌚ Valoración: Disolver 80mg de trióxido de arsénico en 20mL de hidróxido de sodio 1.0M y 10mL de ácido clorhídrico 2.0M. Agregar 3g de bicarbonato de sodio. Titular con SV de yodo, usando SI de almidón soluble. Calcular la normalidad considerando que cada mililitro de SV de yodo 0.1N es equivalente a 4.946mg de AS_2O_3 .²

5.6 Fabricación de los placebos

Excipientes a utilizar para la elaboración de la gomita (5.0g, +/- 5.0%)

Acido ascórbico.....	0.1800 g
Acido cítrico.....	0.0300 g
Grenetina.....	0.2500 g
Glucosa.....	1.9000 g
Azúcar.....	1.6000 g
Saborizante.....	0.0075 g
Colorante.....	0.0075 g
Vehículo (agua purificada).....	1.1500 g

5.6.1 Método de fabricación

Hidratar la grenetina en al agua 1 a 60°C y dejar en baño María. Agitar ocasionalmente. Disolver la glucosa en el agua 2, agregar el azúcar y calentar hasta 115-118°C. Enfriar hasta 80°C y adicionar sabor y color. Agregar la solución de grenetina, cuidando de no incorporar aire. Depositar en cama de almidón con impresión de moldes. Dejar fraguar las gomitas 24 horas.²⁷

5.7 Optimización del método analítico

Se realizó la revisión bibliográfica para evaluar la presentación y formulación de Gomas Pediátricas sabores lima-limón, fresa y mango propuesta en el trabajo de “Estudios de Preformulación y formulación de gomas pediátricas de ácido ascórbico”²⁷.

Al realizar esta revisión documental se consideraron las propiedades tanto físicas como químicas del ácido ascórbico, así como la descomposición y disolución tanto del principio activo como de la matriz a utilizar.

El ácido ascórbico al ser un agente reductor, puede ser cuantificado siguiendo los fundamentos de la técnica de análisis por volumetría, utilizando las reacciones de oxidoreducción. Para estas reacciones se utilizan reactivos como el 2,6-dicloro fenol indofenol y el yodo.

Más sin embargo, se encontraron en distintos artículos que el ácido ascórbico también puede ser cuantificado por medio de las técnicas de análisis por espectrofotometría UV/VIS y CLAR. Puesto que es un suplemento alimenticio y pensando en la relación costo-beneficio dentro de la Industria farmacéutica dedicada a la fabricación de estos suplementos; se optó por la técnica volumétrica aunque esta fuera menos sensible que las técnicas instrumentales, debido a que implican el uso de pocos reactivos, que además son de bajo costo comparados con los utilizados en las técnicas instrumentales.

Otro criterio importante cabe mencionar que la elección de la técnica se hizo, al realizar una comparación del número de muestras a analizar debido a lo siguiente:

- ① Volumetría: Se realiza la valoración únicamente con 3 muestras, solo se necesita valorar la solución volumétrica y preparar soluciones grado reactivo.
- ① Espectrofotométrica UV/VIS: Se realiza la calibración del instrumento, se prepara un blanco y un estándar (se tiene que tomar en cuenta que se utilizan Sustancias de Referencia de alta pureza) y por último se realiza la valoración por triplicado. Se utiliza gran cantidad de material volumétrico.
- ① CLAR: Se realiza la calibración del instrumento y la adecuabilidad del sistema (realizando 6 inyecciones consecutivas del estándar), se prepara un blanco y estándar (se tiene que tomar en cuenta que se utilizan Sustancias de Referencia de alta pureza)

y por último se realiza la valoración por triplicado. Se utiliza gran cantidad de material volumétrico.

Con base a este criterio se decidió descartar completamente los métodos que presentaban técnicas instrumentales, definiendo así que se ocuparía un método volumétrico por óxido-reducción.

Se realizó la comparación entre el 2,6-dicloroindofenol y el yodo obteniendo tomando en cuenta los siguientes criterios:

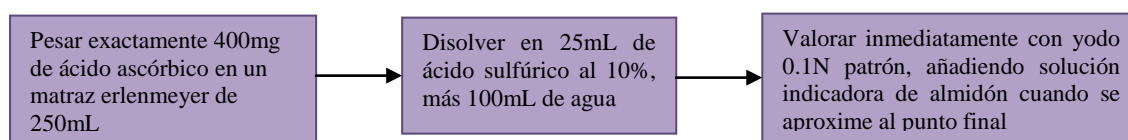
- 2,6-dicloro fenol indofenol: Este método se fundamenta en la reducción de una solución de sal sódica del 2,6 – dicloro fenol indofenol por el ácido ascórbico. Este se oxida y pasa de ácido deshidroascorbico, reacción que ocurre a medida que se añade solución titulante 2,6-dicloro fenol indofenol sobre la solución que contiene el ácido ascórbico. El punto final está determinado por la aparición de una coloración rosada debida a la presencia del indicador sin reducir, en medio ácido. Se utiliza principalmente para la cuantificación de extractos vegetales.
- Yodométrico: Al ser método de titulación directa, se puede detectar el punto final mediante el color característico del yodo utilizando como indicador al almidón ya que en presencia de yoduro, el almidón absorbe al yodo para dar un color azul intenso característico.

Se descarta el método de 2,6-dicloro fenol indofenol, puesto que este no reacciona directamente con el ácido ascórbico, siendo un problema al analizarlo, debido a que el principio activo se encuentra incorporado a la matriz o gomita. Otro punto crítico por lo que se descarta este método es la valoración del 2,6-dicloro fenol indofenol, debido a que se utiliza una sustancia de referencia de alto contenido de pureza.

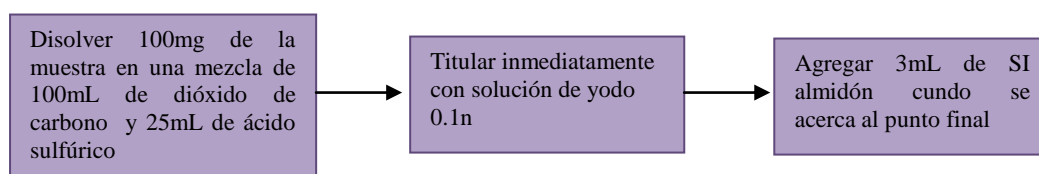
Seleccionando por este motivo las valoraciones yodométricas, ya que son fáciles de realizar de bajo costo, no necesitan grandes cantidades de material volumétrico y se utiliza únicamente un patrón primario de trióxido de arsénico para la valoración del yodo.

Ya determinado el método se realizó la investigación en diferentes fuentes bibliográficas donde se utilizara la yodometría para la cuantificación de ácido ascórbico, los métodos propuestos son los siguientes:

1. Análisis de ácido ascórbico²⁸



2. Análisis de ácido ascórbico materia prima.²



Conforme a la composición del placebo, se decidió usar el **método 2**, debido a que a esa concentración del ácido sulfúrico teóricamente se disuelven las gomitas sin degradarse el principio activo.

Con este método se detectaron los puntos optimizables como son:

- La concentración de ácido sulfúrico
- La temperatura de la muestra para poder lograr la completa disolución de las gomitas
- El tiempo que tarda en liberarse el principio activo.

Para empezar a realizar la optimización del método, se realizó la fabricación de los placebos sabor lima-limón, fresa y mango, de acuerdo con el punto 1.3.2 Método de fabricación. Al concluir la fabricación se prepararon las soluciones necesarias para dar inicio a la optimización, empezando con la SV de Yodo 0.1N debido a que se tiene que valorar antes de su uso, con la finalidad de obtener la concentración real de la misma. A su vez se prepararon las soluciones de ácido sulfúrico 2.0N, ácido sulfúrico 3.0N, ácido clorhídrico 2.0M, hidróxido de sodio 1.0M y SI Almidón soluble, de acuerdo con el punto 5.5 Preparación de soluciones.

Concluida la preparación de los placebos y soluciones se dio inicio a la optimización del método de acuerdo con lo siguiente:

Prueba 1

Se pesaron aproximadamente 5.0g de las gomitas sabor lima-limón, fresa y mango, respectivamente y 180mg de SRef ácido ascórbico GR.

Se colocaron individualmente en matraces erlenmeyer de 250mL, así mismo se agregó 100mL de agua destilada a temperatura ambiente y 25mL de ácido sulfúrico 2.0N a cada uno.

Adicionándole un agitador magnético, posteriormente se colocó el matraz sobre la parrilla de agitación y calentamiento a una temperatura ambiente, con la finalidad de observar la disolución de la gomita.

Prueba 2

Se pesaron aproximadamente 5.0g de las gomitas sabor lima-limón, fresa y mango, respectivamente y 180mg de SRef ácido ascórbico GR.

Se colocaron individualmente en matraces erlenmeyer de 250mL, así mismo se agregó 100mL de agua destilada a temperatura ambiente y 25mL de ácido sulfúrico 3.0N a cada uno.

Adicionándole un agitador magnético, posteriormente se colocó el matraz sobre la parrilla de agitación y calentamiento a una temperatura ambiente, con la finalidad de observar la disolución de la gomita.

Prueba 3

Se pesaron aproximadamente 5.0g de las gomitas sabor lima-limón, fresa y mango, respectivamente y 180mg de SRef ácido ascórbico GR.

Se colocaron individualmente en matraces erlenmeyer de 250mL, así mismo se agregó 100mL de agua destilada a temperatura ambiente y 25mL de ácido sulfúrico 2.0N a cada uno.

Adicionándole un agitador magnético, posteriormente se colocó el matraz sobre la parrilla de agitación y calentamiento a una temperatura 60°C, con la finalidad de observar la disolución de la gomita.

Prueba 4

Se pesaron aproximadamente 5.0g de las gomitas sabor limón, fresa y mango, respectivamente y 180mg de SRef ácido ascórbico GR.

Se colocaron individualmente en matraces erlenmeyer de 250mL, así mismo se agregó 100mL de agua destilada a temperatura ambiente y 25mL de ácido sulfúrico 3.0N a cada uno.

Adicionándole un agitador magnético, posteriormente se colocó el matraz sobre la parrilla de agitación y calentamiento a una temperatura de 60°C, con la finalidad de observar la disolución de la gomita.

Prueba 5

Se pesaron aproximadamente 5.0g de las gomitas sabor limón, fresa y mango, respectivamente y 180mg de SRef ácido ascórbico GR.

Se colocaron individualmente en matraces erlenmeyer de 250mL, así mismo se agregó 100mL de agua destilada a temperatura ambiente y 25mL de ácido sulfúrico 2.0N a cada uno.

Adicionándole un agitador magnético, posteriormente se colocó el matraz sobre la parrilla de agitación y calentamiento a una temperatura de 50°C, con la finalidad de observar la disolución de la gomita.

Prueba 6

Se pesaron aproximadamente 5.0g de las gomitas sabor limón, fresa y mango, respectivamente y 180mg de SRef ácido ascórbico GR.

Se colocaron individualmente en matraces erlenmeyer de 250mL, así mismo se agregó 100mL de agua destilada a temperatura ambiente y 25mL de ácido sulfúrico 3.0N a cada uno.

Adicionándole un agitador magnético, posteriormente se colocó el matraz sobre la parrilla de agitación y calentamiento a una temperatura 50°C, con la finalidad de observar la disolución de la gomita.

Prueba 7

Se pesaron aproximadamente 5.0g de las gomitas sabor lima-limón, fresa y mango, respectivamente y 180mg de SRef ácido ascórbico GR.

Se colocaron individualmente en matraces erlenmeyer de 250mL, así mismo se agregó 100mL de agua destilada a temperatura ambiente y 25mL de ácido sulfúrico 2.0N a cada uno.

Adicionándole un agitador magnético, posteriormente se colocó el matraz sobre la parrilla de agitación y calentamiento a una temperatura de 40°C, con la finalidad de observar la disolución de la gomita.

Prueba 8

Se pesaron aproximadamente 5.0g de las gomitas sabor lima-limón, fresa y mango, respectivamente y 180mg de SRef ácido ascórbico GR.

Se colocaron individualmente en matraces erlenmeyer de 250mL, así mismo se agregó 100mL de agua destilada a temperatura ambiente y 25mL de ácido sulfúrico 3.0N a cada uno.

Adicionándole un agitador magnético, posteriormente se colocó el matraz sobre la parrilla de agitación y calentamiento a una temperatura de 40°C, con la finalidad de observar la disolución de la gomita.

En todas las pruebas se tituló la cantidad de ácido ascórbico adicionada a cada muestra, con SV de Yodo 0.1N, agregando 3mL de SI Almidón cuando se acercaba al punto final.

Todos estos resultados se registraron en tablas con la finalidad de recopilar la información necesaria para definir cuál sería el método final a utilizar. A continuación se anexan las tablas correspondientes para concentración de ácido sulfúrico, temperatura y tiempo de disolución de la gomita.

Tabla 6. Efecto de la concentración y temperatura.

Condiciones	Ac. Ascórbico adicionado (mg)	Volumen de I ₂ 0.1N	Ac. Ascórbico recuperado(mg)	% Recobro	Promedio
H ₂ SO ₄ 0.2N T amb					
H ₂ SO ₄ 0.3N T amb					
H ₂ SO ₄ 0.2N 60°C					
H ₂ SO ₄ 0.3N 60°C					
H ₂ SO ₄ 0.2N 50°C					
H ₂ SO ₄ 0.3N 50°C					
H ₂ SO ₄ 0.2N 40°C					
H ₂ SO ₄ 0.3N 40°C					

Tabla 7. Tiempo de disolución de la gomita.

Condiciones	Tiempo de disolución (min)
H ₂ SO ₄ 0.2N T amb	
H ₂ SO ₄ 0.3N T amb	
H ₂ SO ₄ 0.2N 60°C	
H ₂ SO ₄ 0.3N 60°C	
H ₂ SO ₄ 0.2N 50°C	
H ₂ SO ₄ 0.3N 50°C	
H ₂ SO ₄ 0.2N 40°C	
H ₂ SO ₄ 0.3N 40°C	

5.8 Validación del método analítico

Comprobada la disolución de las gomitas, se inicio la validación del método optimizado.

Se hizo una revisión bibliográfica para definir que parámetros son validables, debido a que el método optimizado proviene de la técnica analítica de volumetría.

El primer parámetro a verificar fue la Especificidad del Método, utilizando el método analítico optimizado de la **Prueba 7** ubicado en el punto 5.5.1, se pesaron los distintos sabores de la gomita omitiendo la adición del ácido ascórbico. Con este resultado se decidió cual sabor se utilizaría para realiza la validación, escogiendo así el placebo que tiene mayor respuesta analítica, siendo este el posible causante de alguna interferencia entre el analito y el reactivo titulante.

Posteriormente se evaluaron los siguientes parámetros:

a) Linealidad del sistema

Se determinó preparando una solución d SRef de ácido ascórbico conteniendo 50mg/mL. Utilizando así cinco niveles de concentración (80, 90, 100, 110 y 120%) por triplicado, preparados a partir de la misma SRef.

b) Precisión del sistema

Se realizó la determinación a partir de una solución de SRef de ácido ascórbico conteniendo 50mg/mL. Determinándola con seis alícuotas de esta solución equivalente al 100%.

c) Linealidad del método

Se determinó por medio de placebos analíticos adicionados preparados independientemente, estos incluyeron todos los componentes del producto. Se realizó por triplicado a cinco niveles de concentración de ácido Ascórbico 80, 90, 100, 110 y 120%, respectivamente.

d) Exactitud del método

Se determinó por medio de placebos analíticos adicionados preparados independientemente, estos incluyeron todos los componentes del producto, se realizó por sextuplicado adicionándoles una concentración del ácido ascórbico al 100%.

e) Repetibilidad

Se determinó por medio de placebos analíticos adicionados preparados independientemente, estos incluyeron todos los componentes del producto, se realizó por sextuplicado adicionándoles una concentración del ácido ascórbico al 100%.

f) Precisión intermedia

Se determinó por medio de placebos analíticos adicionados preparados independientemente, estos incluyeron todos los componentes del producto, se realizó por triplicado adicionándoles una concentración del ácido ascórbico al 100%. Este análisis lo realizaron dos analistas en dos diferentes días.

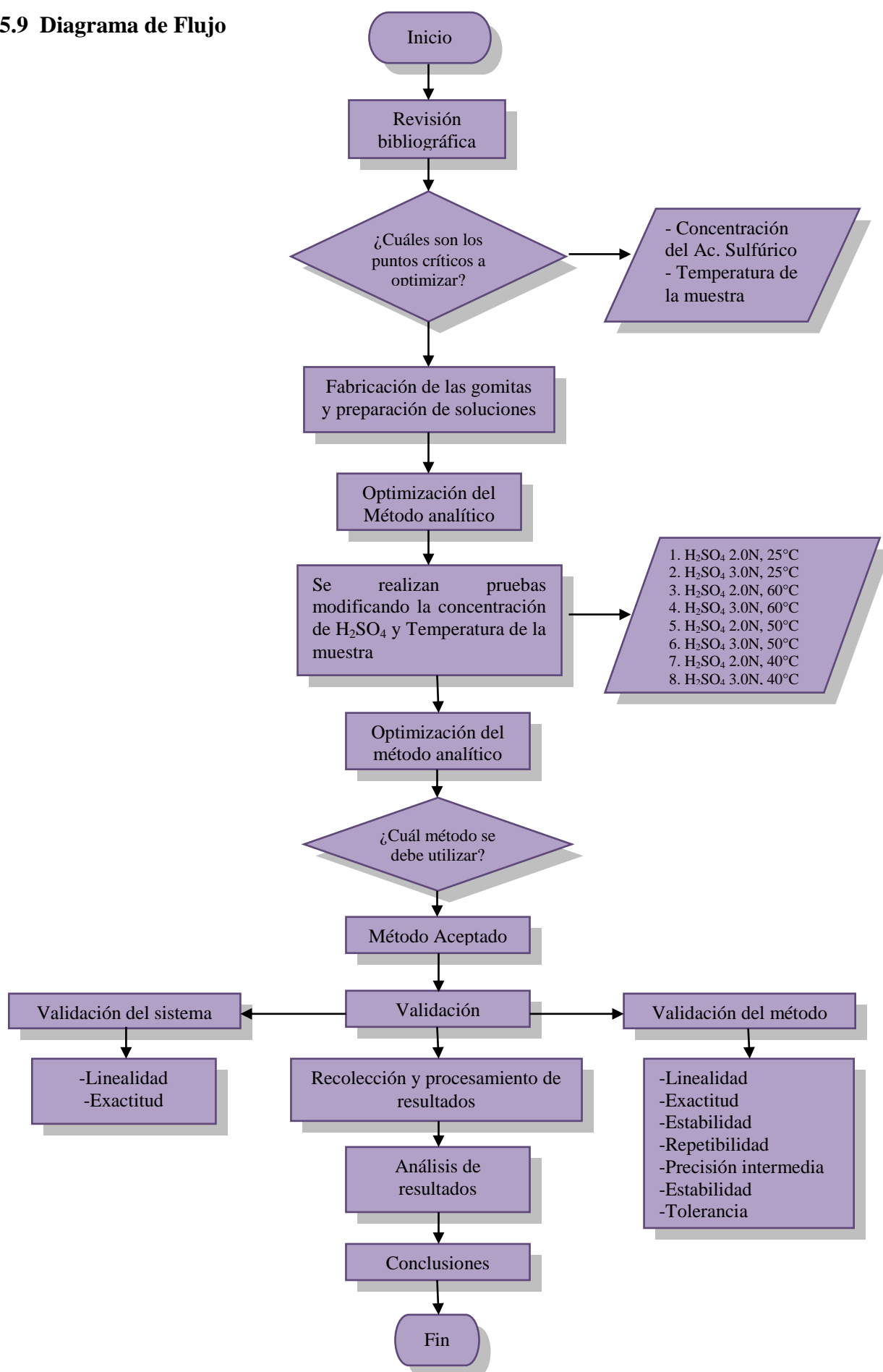
g) Estabilidad de la muestra

Se determinó por medio de placebos analíticos adicionados preparados independientemente, estos incluyeron todos los componentes del producto, se realizó por triplicado para cada condición y tiempo establecido, adicionándoles una concentración del analito al 100%, almacenando las muestras bajo distintas condiciones (temperatura ambiente, refrigeración y oscuridad) durante el tiempo establecido de (inicial, 30, 60 y 90 min)

h) Tolerancia

Se determinó por medio de placebos analíticos adicionados preparados independientemente, estos incluyeron todos los componentes del producto, se realizó por triplicado adicionándoles una concentración del ácido ascórbico al 100%. Este análisis se realizó con dos buretas (25mL y 50mL), respectivamente.

5.9 Diagrama de Flujo



6. RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS

6.1 Optimización del método analítico

Se realizó la optimización del método analítico para la cuantificación de ácido ascórbico materia prima de la FEUM 8^a para la cuantificación de ácido ascórbico en las gomitas pediátricas, para esto se modificó la cantidad de ácido sulfúrico y la temperatura de la disolución de la gomita.

Para poder definir la concentración de ácido y la temperatura de la muestra, se realizaron distintas pruebas modificando estas variables, esta fue realizada únicamente con el sabor lima-limón. (Ver Tabla 8).

Se analizó la concentración de ácido ascórbico presente para poder determinar la Cantidad Recuperada y el % de Recobro de las muestras. Debido a que el ácido ascórbico puede romperse en medio ácido, por apertura del anillo lactónico, ocurriendo así una descarboxilación de la molécula.

Así mismo se modificó la temperatura que sirvió para disolver completamente la gomita, esto es debido a su alto contenido de azúcares y grenetina impide su fácil disolución.

La disolución de la gomita tiene como finalidad liberar el principio activo de la muestra, para su fácil cuantificación.

Tabla 8. Resultados de análisis de la optimización de método. Efecto de la concentración y temperatura.

Prueba	Condiciones	Ac. Ascórbico adicionado (mg)	Volumen de I ₂ 0.1N	Ac. Ascórbico recuperado(mg)	% Recobro	Promedio
1	H ₂ SO ₄ 0.2N T amb	180.3	20.4	186.8281	103.6207	102.8853
		180.9	20.3	185.9123	102.7707	
		180.9	20.2	184.9964	102.2645	
2	H ₂ SO ₄ 0.3N T amb	180.8	20.4	186.8280	103.3341	101.8707
		180.6	20.2	184.9964	102.4344	
		180.7	19.7	180.4173	99.8436	
3	H ₂ SO ₄ 0.2N 60°C	180.6	20.4	186.8281	103.4486	103.1105
		180.5	20.4	185.9123	102.9985	
		180.7	20.3	185.9123	102.8845	
4	H ₂ SO ₄ 0.3N 60°C	180.5	20.1	184.0806	101.9837	102.5861
		180.2	20.2	184.9964	102.6617	
		180.3	20.3	185.9123	103.1127	
5	H ₂ SO ₄ 0.2N 50°C	180.0	20.5	187.7439	104.3022	104.2636
		180.0	20.5	187.7439	104.2443	
		180.1	20.5	187.7439	104.2443	
6	H ₂ SO ₄ 0.3N 50°C	180.5	20.6	188.6597	104.5206	103.8442
		180.7	20.4	186.8281	103.3913	
		180.3	20.4	186.8281	103.6207	
7	H ₂ SO ₄ 0.2N 40°C	180.7	20.6	188.6597	104.4049	104.7093
		180.4	20.7	189.5756	105.0862	
		180.3	20.6	188.6597	104.6366	
8	H ₂ SO ₄ 0.3N 40°C	180.5	20.5	187.7439	104.0133	104.2403
		180.3	20.5	187.7439	104.1286	
		180.4	20.6	188.6597	104.5786	

A continuación se muestran los resultados obtenidos después de realizar las distintas pruebas modificando concentración y temperatura. (Ver Tabla 9)

Tabla 9. Resultados de análisis de la optimización de método. Tiempo de disolución de la gomita.

Condiciones	Tiempo de disolución (min)
H ₂ SO ₄ 0.2N T amb	105
	100
	108
H ₂ SO ₄ 0.3N T amb	85
	90
	88
H ₂ SO ₄ 0.2N 60°C	6
	5
	6
H ₂ SO ₄ 0.3N 60°C	5
	4
	4
H ₂ SO ₄ 0.2N 50°C	7
	7
	9
H ₂ SO ₄ 0.3N 50°C	8
	6
	9
H ₂ SO ₄ 0.2N 40°C	10
	11
	10
H ₂ SO ₄ 0.3N 40°C	9
	9
	7

Observando el efecto de la concentración, temperatura de la muestra y el tiempo de disolución, se obtiene como resultado que será utilizado el siguiente método analítico:

Pesar el equivalente a 180mg de Acido Ascórbico (aproximadamente 5.0g de la gomita), pasar a un matraz erlenmeyer de 250mL, adicionar 100mL de agua destilada a temperatura ambiente y 25mL de acido sulfúrico 2.0N. Colocar el matraz sobre una parrilla de agitación y calentamiento a una temperatura de 40°C hasta la disolución de la muestra, dejar enfriar. Adicionar 3mL de SI Almidón, titular con SV de Yodo 0.1N hasta que vire a color azul intenso. Cada mL de solución SV Yodo 0.1N equivale a 8.806mg de Acido Ascórbico.

Para realizar la validación, debido a que se recupera mayor cantidad de ácido ascórbico a una temperatura de 40°C con una concentración de ácido sulfúrico de 2.0N en un tiempo aproximado de 10min

6.2 Validación del método analítico

Al iniciar la validación del sistema se realizó la valoración de la SV de Yodo 0.1N, con la finalidad de conocer la concentración real de la solución (Ver Tabla 10). Obteniendo los siguientes resultados:

Tabla 10. Resultados de la valoración del Yodo 0.1N

Peso As_2O_3 (mg)	Volumen de I_2 (mL)	Normalidad	
150.1	27.6	0.1099	
149.8	27.7	0.1093	Prom = 0.1101N
157.0	28.5	0.1113	C.V. = 0.9316%

La fórmula utilizada para conocer la Concentración real del Yodo 0.1N es la siguiente:

$$N = \frac{\text{Peso del } As_2O_3(\text{mg})}{\text{Vol. } I_2 \text{ (mL)} * \text{Eq de } As_2O_3}$$

Ejemplo:

$$N = \frac{150.1\text{mg}}{(27.6\text{mL}) * (49.46\text{eq})} = 0.1099$$

6.2.1 Linealidad del sistema

Se obtuvieron los siguientes datos después de realizar el análisis a 5 niveles de concentración (Ver Tabla 11).

Tabla 11. Datos obtenidos de la valoración por Nivel de Concentración.

Nivel (%)	Concentración de Ac ascórbico por nivel (mg)	Cantidad Adicionada Ac. Ascórbico (mL)	Volumen de Yodo 0.1101N (mL)
80	144	2.40	14.9
80	144	2.40	14.8
80	144	2.40	14.9
90	162	2.70	16.7
90	162	2.70	16.6
90	162	2.70	16.6
100	180	3.00	18.7
100	180	3.00	18.7
100	180	3.00	18.6
110	198	3.30	20.7
110	198	3.30	20.6
110	198	3.30	20.5
120	216	3.60	22.5
120	216	3.60	22.3
120	216	3.60	22.4

Para poder calcular la cantidad recuperada de ácido ascórbico se tomo en cuenta que 1mL de Yodo equivale a 8.806mg de ácido ascórbico.

Ejemplo:

$$\begin{array}{l}
 1\text{mL de Yodo } 0.1\text{N} \quad \text{—————} \quad 8.806\text{mg de Acido Ascórbico} \\
 1\text{mL de Yodo } 0.1101\text{N} \quad \text{—————} \quad X= 9.6954 \text{ mg de Acido Ascórbico}
 \end{array}$$

Por lo tanto la cantidad recuperada de la muestra se calcula con los equivalentes de la concentración real de SV de Yodo 0.1101N, donde el peso equivalente del ácido ascórbico a esa normalidad es de 9.6954mg por mililitro.

Ya obtenida la cantidad recuperada se realizan los cálculos necesarios para determinar las sumatorias tanto para X como Y, la Ordenada al origen (b), la Pendiente (m), el Coeficiente de correlación(r), el Coeficiente de determinación (r^2), así como la Suma de Cuadrados(SC), y el Intervalo de confianza (IC).

Tabla 12. Nivel de concentración vs. Volumen de Yodo gastado (mL).

(X) Nivel	(Y) Vol. I ₂	Cantidad Recuperada (mg)	%Recobro	\hat{y}	yi- \hat{y}	xi-x	(xi-x) ²
80	14.9	144.4615	100.3205	14.8267	0.0733	-2556.0000	6533136.0000
80	14.8	143.4920	99.6472	14.8267	-0.0267	-2556.0000	6533136.0000
80	14.9	144.4615	100.3205	14.8267	0.0733	-2556.0000	6533136.0000
90	16.7	161.9133	99.9465	16.7300	-0.0300	-2538.0000	6441444.0000
90	16.6	160.9437	99.3480	16.7300	-0.1300	-2538.0000	6441444.0000
90	16.6	160.9437	99.3480	16.7300	-0.1300	-2538.0000	6441444.0000
100	18.7	181.3041	100.7245	18.6333	0.0667	-2520.0000	6350400.0000
100	18.7	181.3041	100.7245	18.6333	0.0667	-2520.0000	6350400.0000
100	18.6	180.3346	100.1859	18.6333	-0.0333	-2520.0000	6350400.0000
110	20.7	200.6949	101.3611	20.5367	0.1633	-2502.0000	6260004.0000
110	20.6	199.7254	100.8714	20.5367	0.0633	-2502.0000	6260004.0000
110	20.5	198.7558	100.3817	20.5367	-0.0367	-2502.0000	6260004.0000
120	22.5	218.1466	100.9938	22.4400	0.0600	-2484.0000	6170256.0000
120	22.3	216.2076	100.0961	22.4400	-0.1400	-2484.0000	6170256.0000
120	22.4	217.1771	100.5450	22.4400	-0.0400	-2484.0000	6170256.0000

Con base a los resultados de la Tabla 12, se obtuvieron los siguientes datos que se utilizan para calcular b , m , r^2 , IC y F_{cal} . Para calcular la regresión lineal se utilizaron las formulas que se encuentran en el Anexo.

Tabla 13. Valores de las sumatorias.

Σx	2700	S_x	26.34930
Σy	279.5000	S_x^2	694.2857
Σx^2	495720	x^2	32400
Σy^2	5316.8100	S_y	2.7876
Σxy	51337.8	S_y^2	7.7710
N	15	x	180

A continuación en la Tabla 14 se muestran los resultados para la Linealidad del sistema.

Tabla 14. Resultados de Linealidad del Sistema

Estimación estadística	Criterios	Resultados
Modelo	$y = mx+b$	$y = 0.1057x + (-0.4000)$
m	$m=1$	0.1057
b	$b=0$	-0.4000
r ²	$r^2 \leq 0.98$	0.9990
I.C. Ordenada al origen	El intervalo debe incluir al cero	(-0.89079, 0.09079)
$t_{tab(0.975)}$ Ordenada al origen	-----	2.160
t_{calc} Ordenada al origen	$t_{tab} \geq t_{calc}$	-1.7604
$F_{tab(0.975)}$	-----	6.41
F_{calc}	$F_{tab} \geq F_{calc}$	570877.5133
C.V.	$C.V. \leq 2.0\%$	0.58204%

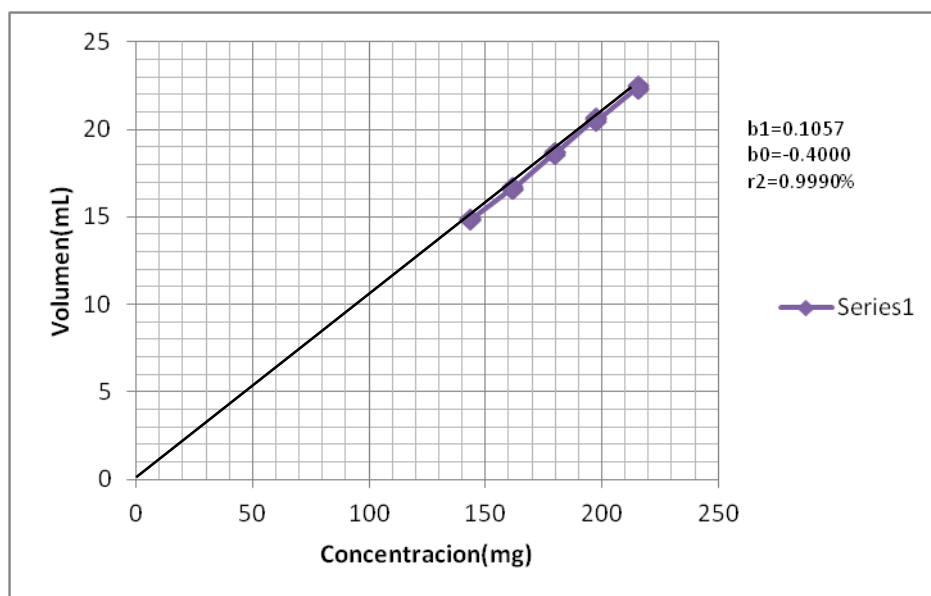


Fig. 6. Grafica de Linealidad del sistema. Concentración vs. Volumen

En base a los resultados obtenidos se observa que es un método lineal, debido a que cumple con la ecuación de la línea recta. Mas sin embargo también se evaluó el coeficiente de variación indicado que el método es homogéneo, es decir que sus valores tienen poca variabilidad entre sí, al tener un $CV= 0.58204\% \leq 2.0\%$ indicado para métodos volumétricos.

También se realizó el estadígrafo de contraste t de Student para la ordenada al origen donde se plantearon las hipótesis ($H_0: b=0$, $H_a: b \neq 0$) obteniendo como resultado una $t_{cal} < t_{tab}$, por lo cual se acepta la $H_0: b=0$ al ser menor de cero ($t_{cal} = -1,7604$). Así mismo se evaluó el Intervalo de confianza de la ordenada obteniendo como resultado $(-0.89079, 0.090079)$, es decir que el intervalo incluye al cero.

Otra estimación estadística que se realizó fue un análisis de varianza (ANADEVA) para una regresión lineal, al igual que en la t de Student se plantearon dos hipótesis ($H_0=$ El volumen no depende de la concentración, $H_a =$ el volumen depende de la concentración), al obtener una $F_{tab} \geq F_{calc}$, indica que se Rechaza la H_0 al ser un método donde el volumen depende de la concentración de la muestra.

6.2.2 Precisión del sistema

A continuación se muestran los datos obtenidos en la valoración de 6 muestras independientes, se utilizó la misma normalidad de la Tabla 10 para realizar los cálculos.

Tabla 15. Datos obtenidos para el Nivel de concentración del 100%

CANTIDAD ADICIONADA (mg)	EQUIVALENTE CANTIDAD ADICIONADA (mL)	VOLUMEN DE YODO (mL)	CANTIDAD RECUPERADA (mg)
180	3.00	18.70	181.3041
180	3.00	18.70	181.3041
180	3.00	18.60	180.3346
180	3.00	18.80	182.2736
180	3.00	18.70	181.3041
180	3.00	18.60	180.3346

Tabla 16. Valores Estadísticos

\bar{y}	181.1425
Σy	1086.8550
Σy^2	196878.300
n	6
Desviación estándar	0.7298
C.V.	0.4029%

Se evaluó la precisión del sistema que tiene como finalidad determinar si los resultados tienen un grado de concordancia entre sí. Esto en una muestra homogénea mediante el resultado del C.V. al ser menor al 2.0%

6.2.3 Linealidad del método

Para realizar la validación del método se valoró la SV de Yodo 0.1N, con la finalidad de conocer la concentración real de la solución (Ver Tabla 17). Obteniendo los siguientes resultados:

Tabla 17. Resultados de la valoración del Yodo 0.1N

Peso As_2O_3 (mg)	Volumen de I_2 (mL)	Normalidad	
153.8	27.9	0.1114	
153.0	27.5	0.1124	Prom = 0.11206N
153.5	27.6	0.1124	C.V. = 0.5152%

La fórmula utilizada para conocer la Concentración real del Yodo 0.1N es la siguiente:

$$N = \frac{\text{Peso del As}_2\text{O}_3(\text{mg})}{\text{Vol. I}_2 (\text{mL}) * \text{Eq de As}_2\text{O}_3}$$

Ejemplo:

$$N = \frac{153.8\text{mg}}{(27.9\text{mL}) * (49.46\text{eq})} = 0.1114$$

Se obtuvieron los siguientes datos después de realizar el análisis a 5 niveles de concentración (Ver Tabla 18).

Tabla 18. Datos obtenidos de la valoración por Cantidad recuperada

Nivel (%)	Cantidad Adicionada Ac. Ascórbico (mg)	Volumen de Yodo 0.11206N (mL)	Cantidad Recuperada Ac. Ascórbico (mg)
80	143.1	14.6	144.0729
80	144.0	14.7	145.0597
80	143.8	14.7	145.0597
90	162.7	16.5	162.8221
90	162.4	16.6	163.8089
90	167.7	17.0	167.7561
100	181.3	18.4	181.5713
100	182.8	18.5	182.5581
100	182.9	18.7	184.5317
110	204.0	20.5	202.2941
110	197.9	20.1	198.3469
110	197.9	20.1	198.3469
120	220.5	22.5	222.0301
120	214.0	21.7	214.1357
120	215.8	21.7	214.1357

Para poder calcular la cantidad recuperada de Acido ascórbico se tomo en cuenta que 1mL de Yodo equivale a 8.806mg de Acido Ascórbico.

Ejemplo:

1mL de Yodo 0.1N ————— 8.806mg de Acido Ascórbico
 1mL de Yodo 0.11206N ————— X= 9.8680 mg de Acido Ascórbico

Por lo tanto la cantidad recuperada de la muestra se calcula con los equivalentes de la concentración real de SV de Yodo 0.11206N, donde el peso equivalente del ácido ascórbico a esa normalidad es de 9.8680mg por mililitro.

Ya obtenida la cantidad recuperada se realizan los cálculos necesarios para determinar las Sumatorias tanto para X como Y, la Ordenada al origen (b), la Pendiente (m), el Coeficiente de correlación(r), el Coeficiente de determinación (r^2), así como la Suma de Cuadrados(SC), y el Intervalo de confianza (IC).

Tabla 19. Nivel de concentración vs. Volumen de Yodo gastado (mL).

(X) Nivel	(Y) Vol. I ₂	Cantidad Recuperada (mg)	%Recobro	\hat{y}	yi- \hat{y}	xi-x	(xi-x) ²
80	14.6	144.0729	100.6798	143.7926	0.2803	-2577.700	6644537.2900
80	14.7	145.0597	100.7359	144.6791	0.3806	-2576.800	6639898.2400
80	14.7	145.0597	100.8760	144.4821	0.5776	-2577.000	6640929.0000
90	16.5	162.8221	100.0750	163.0989	-0.2768	-2558.100	6543875.6100
90	16.6	163.8089	100.8675	162.8034	1.0055	-2558.400	6545410.5600
90	17.0	167.7561	100.0334	168.0239	-0.2679	-2553.100	6518319.6100
100	18.4	181.5713	100.1496	181.4201	0.1511	-2539.500	6449060.2500
100	18.5	182.5581	99.8677	182.8977	-0.3396	-2538.000	6441444.0000
100	18.7	184.5317	100.8921	182.9962	1.5355	-2537.900	6440936.4100
110	20.5	202.2941	99.1638	203.7800	-1.4859	-2516.800	6334282.2400
110	20.1	198.3469	100.2258	197.7714	0.5755	-2522.900	6365024.4100
110	20.1	198.3469	100.2258	197.7714	0.5755	-2522.900	6365024.4100
120	22.5	222.0301	100.6939	220.0327	1.9973	-2500.300	6251500.0900
120	21.7	214.1357	100.0634	213.6301	0.5055	-2506.800	6284046.2400
120	21.7	214.1357	99.2288	215.4032	-1.2675	-2505.000	6275025.0000

En base a los resultados de la Tabla 19, se obtuvieron los siguientes datos que se utilizan para calcular b, m, r^2 , IC y F_{calc}. Para calcular la regresión lineal se utilizaron las formulas que se encuentran en el Anexo.

Tabla 20. Valores de las sumatorias

X	181.3867	y	181.7686
Σx	2720.8000	Σy	2726.5294
Σx^2	503529.0400	Σy^2	505286.9529
Sx	26.7424	Sy	26.3079
S^2x	715.1570	S^2y	692.1036
x^2	32901.1228	Σxy	504399.5502
n	15		

A continuación en la Tabla 21 se muestran los resultados para la linealidad del método.

Tabla 21. Resultados de Linealidad del Método

Estimación estadística	Criterios	Resultados
Modelo	$y = mx+b$	$y = 0.9831x + (3.4387)$
	$y = mx+b+\xi_i$	$y = 0.9831x + (3.4387) - (3.9466949)$
m	$m=1$	0.9831
b	$b=0$	3.4387
r ²	$r^2 \leq 0.98$	0.9988
I.C. Ordenada al origen	El intervalo debe incluir al cero	(-4.2858, 3.2698)
$t_{\text{tab}(0.975)}$ Ordenada al origen	-----	2.160
t_{calc} Ordenada al origen	$t_{\text{tab}} \geq t_{\text{calc}}$	-0.2795
I.C. Pendiente	El intervalo debe incluir la unidad	(0.9599, 1.0090)
$t_{\text{tab}(0.975)}$ Pendiente	-----	2.160
t_{calc} Pendiente	$t_{\text{tab}} \geq t_{\text{calc}}$	103.0398
$F_{\text{tab}(0.975)}$	-----	6.41
F_{calc}	$F_{\text{tab}} \geq F_{\text{calc}}$	556.1114
C.V.	$C.V. \leq 2.0\%$	0.55255%

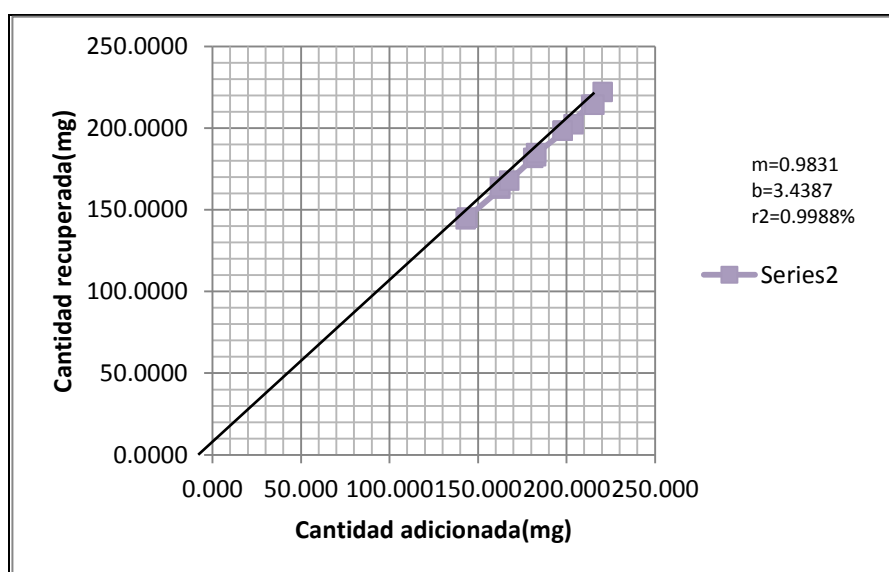


Fig. 7. Grafica de Linealidad del método. Cantidad adicionada vs. Cantidad recuperada

Para poder determinar la linealidad del método se tomó en cuenta el error experimental y al corregir con este valor se cumple así con la ecuación de la línea recta ($y = mx+b$).

También se evaluó el coeficiente de variación indicado que el método es homogéneo al realizar el análisis, es decir que sus valores tienen poca variabilidad entre sí al tener un $CV = \% \leq 2.0\%$ indicado para métodos volumétricos.

Se realizó el estadígrafo de contraste t de Student tanto para la ordenada al origen como para la pendiente, donde se plantearon las siguientes hipótesis:

Ordenada al Origen ($H_0: b=0$, $H_a: b \neq 0$) obteniendo como resultado una $t_{cal} < t_{tab}$, por lo cual se acepta la $H_0=0$ al tener una ($t_{cal} = -0.2795$). El cálculo del estadígrafo de contraste se realizó con la ordenada al origen (b) corregida, al restarle el error experimental.

Pendiente ($H_0: m=0$, $H: m < 1$) obteniendo como resultado una $t_{cal} < t_{tab}$, por lo cual se acepta la $H_0=0$ al ser menor de cero ($t_{cal} = 103$).

Así mismo se evaluó el Intervalo de confianza tanto de la ordenada al origen como de la pendiente obteniendo como resultado:

Ordenada al Origen (-4.2858, 3.2698), el intervalo incluye al cero.

Pendiente (0.9599, 1.0090), el intervalo incluye la unidad

Otra estimación estadística que se realizó fue un análisis de varianza (ANADEVA) para una regresión lineal, al igual que en la t de Student se plantearon dos hipótesis ($H_0 =$ El volumen no depende de la concentración, $H_a =$ el volumen depende de la concentración), al obtener una $F_{tab} \geq F_{calc}$, esto indica que se Rechaza la H_0 al ser un método donde el volumen depende de la concentración de la muestra.

6.2.4 Exactitud del método

A continuación se muestran los datos obtenidos en la valoración de 6 muestras independientes, se utilizó la misma normalidad de la Tabla 15 para realizar los cálculos.

Tabla 22. Datos obtenidos para el Nivel de Concentración del 100%

PLACEBO ANALITICO ADICIONADO	CANTIDAD ADICIONADA (mg)	VOLUMEN DE YODO (mL)	CANTIDAD RECUPERADA (mg)	% DE RECOBRO (y)
1	181.300	18.400	181.5713	100.1496
2	182.800	18.500	182.5581	99.8677
3	182.900	18.700	184.5317	100.8921
4	182.700	18.500	182.5581	99.9223
5	182.800	18.600	183.5449	100.4075
6	182.500	18.600	183.5449	100.5725

Tabla 23. Valores Estadísticos

Promedio	100.3020%
Desviación estándar	0.3971
C.V.	0.3959%
N	6
IC μ	(99.8851, 100.7188)

En base a estos resultados se realizó la determinación del intervalo de confianza de la media poblacional (IC μ) obteniendo como resultado un intervalo de (99.8851, 100.7188), con esto se puede concluir que el método es exacto al incluir el valor del 100%.

6.2.5 Precisión intermedia

a) Repetibilidad

Con base a los resultados de la Tabla 23 se calculó la interferencia estadística aplicando el estadígrafo de contraste χ^2 . En la cual se propusieron dos hipótesis (Ho: $\sigma = 2.0\%$; Ha: $\sigma \neq 2.0\%$), al final se concluye aceptando la Ho debido a que la varianza poblacional es igual al 2.0%, esto se confirma con la $\chi^2_{\text{calc}} < \chi^2_{\text{tab}}$

Tabla 24. Resultados del estadígrafo de contraste

Ho: $\sigma_0 = 2\%$	$\chi^2_{\text{tab}} = 12.83$
Ha: $\sigma_0 \neq 2\%$	$\chi^2_{\text{cal}} = 0.1971$
0.1971 < 12.83 Ho se acepta	

b) Reproducibilidad

Para realizar los cálculos de la reproducibilidad se utilizó la SV de Yodo 0.11206N mencionada en la Tabla. 17.

Se evaluó la reproducibilidad del método evaluando el efecto del analista, el día y la interacción entre analista/día, para ello se realizó el análisis en dos días y con dos analistas. Obteniéndose los siguientes datos:

Tabla 25. Resultados del Primer día/Primer Analista

PLACEBO ANALITICO ADICIONADO	CANTIDAD ADICIONADA (mg)	VOLUMEN DE YODO (mL)	CANTIDAD RECUPERADA (mg)	% DE RECOBRO (y)
1	182.600	18.5	182.5581	99.9770
2	182.800	18.7	184.5317	100.9473
3	182.500	18.5	182.5581	100.0318

Tabla 26. Resultados Primer día/Segundo Analista

PLACEBO ANALITICO ADICIONADO	CANTIDAD ADICIONADA (mg)	VOLUMEN DE YODO (mL)	CANTIDAD RECUPERADA (mg)	% DE RECOBRO (y)
1	181.900	18.5	182.5581	100.3618
2	180.300	18.3	180.5845	100.1578
3	177.700	18.2	179.5977	101.0679

Tabla 27. Resultados Segundo día/ Primer Analista

PLACEBO ANALITICO ADICIONADO	CANTIDAD ADICIONADA (mg)	VOLUMEN DE YODO (mL)	CANTIDAD RECUPERADA (mg)	% DE RECOBRO (y)
1	181.900	18.4	181.5713	99.8193
2	182.300	18.6	183.5449	100.6829
3	182.600	18.5	182.5581	99.9770

Tabla 28. Resultados Segundo día/Segundo Analista

PLACEBO ANALITICO ADICIONADO	CANTIDAD ADICIONADA (mg)	VOLUMEN DE YODO (mL)	CANTIDAD RECUPERADA (mg)	% DE RECOBRO (y)
1	180.500	18.5	182.5581	101.1402
2	179.700	18.3	180.5845	100.4922
3	179.900	18.3	180.5845	100.3805

Para poder realizar los cálculos para el Análisis de Varianza (ANADEVA) se realizó un condensado de los resultados, dividiéndolos entre días y analistas (Ver Tabla 29).

Tabla 29. Resultados condensados para ANDEVA

		ANALISTA	
		1	2
DIA	1	99.9770	100.3618
		100.9473	100.1578
		100.0318	101.0679
	2	99.8193	101.1402
		100.6829	100.4922
		99.9770	100.3805

Para poder calcular este parámetro se realizó un ANADEVA proponiendo el modelo estadístico:

$$y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \delta_j (i) + \xi_k(ij)$$

Así mismo se propusieron las siguientes hipótesis con el fin de conocer la fuente de posible variación, esto es debido a que se tiene que tener la certeza de que cualquier analista y en cualquier día, el análisis arrojara resultados reproducibles.

- a) Ho: No hay efecto del Analista
Ha: Si hay efecto del Analista
- b) Ho: No hay efecto del Día
Ha: Si hay efecto del Día
- c) Ho: No hay efecto de la interacción analista/día
Ha: Si hay efecto de la interacción analista/día

Tabla 30. Modelo estadístico

FUENTE	g.l.	SC	MC	F calculada
ANALISTA	a-1	$\Sigma y_{2i..}/jk - y_{2...}/ijk$	SCa/gla	Mca/Mce
DIA	b-1	$\Sigma y_{2.j}/ik - y_{2...}/ijk$	SCd/gdl	MCd/Mce
INTERACCION	(a-1)(b-1)	$\Sigma \Sigma y_{2ij./k} - \Sigma y_{2i..}/jk - \Sigma y_{2.j}/ik + y_{2...}/ijk$	SCad/glad	Mcad/Mce
ERROR	ab(c-1)	$\Sigma \Sigma \Sigma y_{2ijk} - \Sigma \Sigma y_{2ij./k}$	SCe/gle	

Los resultados obtenidos para el Análisis de Varianza son: (Ver Tabla 31)

Tabla 31. Resultados de la ANDEVA

FUENTE	gl	SC	MC	F calculada	F tablas
ANALISTA	1	0.000221553	0.00022155	4.16452E-05	5.32
DIA	1	0.390595022	0.39059502	0.073420117	
INTERACCION	1	0.067858365	0.06785836	0.012755332	
ERROR	8	1.8099	0.22623214		

En base a los resultados obtenidos se observa que no hay efecto del analista, día y de su interacción debido a que se obtuvo una $F_{\text{calc}} < F_{\text{tab}}$, por lo cual se concluye que para este modelo estadístico fijo, se acepta para los tres casos la H_0 al no haber efecto del analista/día ni de la interacción entre ambos, es decir el método es reproducible.

6.2.6 Estabilidad

En el caso de la estabilidad se realizó en tres distintas condiciones (Temperatura ambiente, Oscuridad y Refrigeración) en tres tiempos (45min, 90 min y 120min), debido a que en ocasiones no es posible realizar el análisis por distintos factores ajenos al analista.

La finalidad de este análisis es conocer las condiciones en que se puede almacenar la muestra antes de ser analizada asegurando así que las propiedades fisicoquímicas del principio activo no afecten el resultado, al dar concentraciones erróneas.

Esto es debido a la propia naturaleza del ácido ascórbico ya que es una vitamina fotosensible, que además puede presentar una degradación por hidrólisis acida debido a la cantidad considerable de ácido sulfúrico utilizado para su disolución.

Para realizar los cálculos de la estabilidad se utilizo la SV de Yodo 0.11206N mencionada en la Tabla. 17.

Tabla 32. Resultados Temperatura Ambiente

INICIAL				
PLACEBO ANALITICO ADICIONADO	CANTIDAD ADICIONADA (mg)	VOLUMEN DE YODO (mL)	CANTIDAD RECUPERADA (mg)	% DE RECOBRO (y)
1	182.800	18.4	181.5713	99.3278
2	182.900	18.7	184.5317	100.8921
3	182.900	18.5	182.5581	99.8130
45 min				
1	182.800	18.7	184.5317	100.9473
2	183.100	18.6	183.5449	100.2430
3	182.200	18.5	182.5581	100.1965
90 min				
1	183.200	18.7	184.5317	100.7269
2	182.500	18.5	182.5581	100.0318
3	183.500	18.9	186.5053	101.6377
120 min				
1	182.300	18.5	182.5581	100.1416
2	181.900	18.7	184.5317	101.4468
3	183.200	18.9	186.5053	101.8042

Tabla 33. Resultados Oscuridad

INICIAL				
PLACEBO ANALITICO ADICIONADO	CANTIDAD ADICIONADA (mg)	VOLUMEN DE YODO (mL)	CANTIDAD RECUPERADA (mg)	% DE RECOBRO (y)
1	182.800	18.4	181.5713	99.3278
2	182.900	18.7	184.5317	100.8921
3	182.900	18.5	182.5581	99.8130
45 min				
1	180.400	18.4	181.5713	100.6493
2	180.500	18.3	180.5845	100.0468
3	180.500	18.3	180.5845	100.0468
90 min				
1	179.900	18.3	180.5845	100.3805
2	180.200	18.6	183.5449	101.8562
3	180.100	18.4	181.5713	100.8169
120 min				
1	180.000	18.3	180.5845	100.3247
2	180.600	18.5	182.5581	101.0842
3	180.300	18.2	179.5977	99.6105

Tabla 34. Resultados Refrigeración

INICIAL				
PLACEBO ANALITICO ADICIONADO	CANTIDAD ADICIONADA (mg)	VOLUMEN DE YODO (mL)	CANTIDAD RECUPERADA (mg)	% DE RECOBRO (y)
1	182.800	18.4	181.5713	99.3278
2	182.900	18.7	184.5317	100.8921
3	182.900	18.5	182.5581	99.8130
45 min				
1	183.600	18.8	185.5185	101.0449
2	182.900	18.7	184.5317	100.8921
3	182.800	18.5	182.5581	99.8677
90 min				
1	182.700	18.6	183.5449	100.4624
2	182.300	18.5	182.5581	100.1416
3	182.500	18.6	183.5449	100.5725
120 min				
1	183.400	18.5	182.5581	99.5409
2	183.900	19	187.4921	101.9533
3	183.100	18.8	185.5185	101.3208

Se realizó un análisis de la Diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición respecto a la media aritmética del análisis inicial ($|d_i|$), obteniendo los siguientes resultados. (Ver Tabla 35).

Tabla 35. Resultados $|d_i|$ para las distintas condiciones y tiempos

	Temperatura ambiente	Oscuridad	Refrigeración
45 min	0.4513	0.2366	0.5906
90 min	0.7878	1.0069	0.3812
120 min	1.1198	0.3288	0.9274

Todas las muestras cumplen al ser la $|d_i| > 2.0\%$, por lo cual la muestra es estable en todas las condiciones, así mismo se realizó un análisis de la media aritmética (\bar{y}_0), teniendo como especificación para el Factor I del 97.0% al 103.0% ya que se trata de un método volumétrico, siendo que la muestra es estable en todas las condiciones. (Ver Tabla 36)

Tabla 36. Resultados de la Media Aritmética a distintas condiciones y tiempos

	Temperatura Ambiente	Oscuridad	Refrigeración
45 min	100.4571	100.2422	100.5945
90 min	100.7947	101.0070	100.3864
120 min	101.1213	100.3304	100.9256

En base a estos resultados y al realizar la comparación de la $|d_i|$ y (\bar{y}_0) , se determina que las muestras se deben almacenar en refrigeración (entre 2-8°C) después de ser preparadas en un tiempo máximo de 120min para poder realizar la valoración del ácido ascórbico, sin que exista alguna degradación.

6.2.7 Tolerancia

Para determinar la tolerancia del método analítico se realizó el análisis utilizando dos buretas de distinta capacidad (25mL y 10mL). Al realizar los cálculos de la tolerancia se utilizó la SV de Yodo 0.11206N mencionada en la Tabla. 17.

Tabla 38. Resultados utilizando la bureta 25mL

PLACEBO ANALITICO ADICIONADO	CANTIDAD ADICIONADA (mg)	VOLUMEN DE YODO (mL)	CANTIDAD RECUPERADA (mg)	% DE RECOBRO (y)
1	182.900	18.700	184.5317	100.8921
2	182.800	18.600	183.5449	100.4075
3	182.500	18.600	183.5449	100.5725

Tabla 39. Resultados utilizando la bureta 10mL

PLACEBO ANALITICO ADICIONADO	CANTIDAD ADICIONADA (mg)	VOLUMEN DE YODO (mL)	CANTIDAD RECUPERADA (mg)	% DE RECOBRO (y)
1	179.100	18.900	186.5053	104.1347
2	180.700	18.800	185.5185	102.6666
3	179.000	18.900	186.5053	104.1929

Se utilizó una bureta de 10mL con la finalidad de conocer que tan tolerante es el método analítico al utilizar una bureta de menor capacidad. Esta bureta se debe llenar en 3 ocasiones para poder llegar al punto final de la valoración, por lo tanto se arrastra un error sistemático.

Para poder determinar la tolerancia del método analítico se realizó la comparación de los resultados para cada una de las buretas, por medio del C.V., el cual no debe ser mayor al 2.0% entre ambas muestras. Obteniendo un resultado de 1.7230%, siendo que hay tolerancia en el método.

6.2.8 Especificidad del método

Para realizar la especificidad del método se prepararon 3 placebos de gomitas, es decir solo se utilizaron los componentes de la gomita sin adicionarle el ácido ascórbico para cada uno de los sabores (lima-limón, fresa y mango), estas muestras fueron valoradas con SV de Yodo 0.1N obteniendo los siguientes resultados:

Tabla 40. Resultados de la especificidad

Gomita	mL gastados de Yodo 0.1N
Limón	0.3mL
Fresa	0.2mL
Mango	0.2mL

Debido a estos resultados se decidió realizar la validación completa para el sabor lima-limón, debido a que es el placebo que causa mayor interferencia de los excipientes en el análisis. Con lo que respecta a los otros sabores (fresa y mango), solo se realizó el análisis de la linealidad y exactitud del método, esto tuvo como objetivo el conocer si afecta el color y el sabor de la gomita, puesto que están formuladas con la misma cantidad de excipientes y principio activo.

6.2.9 Linealidad del método para el sabor Fresa

Se obtuvieron los siguientes resultados para la linealidad de método del sabor Fresa. (Ver tabla 41).

Tabla 41. Resultados de la linealidad del método.

Estimación estadística	Criterios	Resultados
Modelo	$y = mx+b$	$y = 1.0163x + (-2.7153)$
	$y = mx+b+\xi_i$	$y = 1.0163x + (-2.7153) - (-5.00591)$
m	$m=1$	1.0163
b	$b=0$	-2.7153
r ²	$r^2 \leq 0.98$	0.9979
I.C. Ordenada al origen	El intervalo debe incluir al cero	-10.08586, 0.07468
$t_{\text{tab}(0.975)}$ Ordenada al origen	-----	2.160
t_{calc} Ordenada al origen	$t_{\text{tab}} \geq t_{\text{calc}}$	-2.7523
I.C. Pendiente	El intervalo debe incluir la unidad	0.9885, 1.0441
$t_{\text{tab}(0.975)}$ Pendiente	-----	2.160
t_{calc} Pendiente	$t_{\text{tab}} \geq t_{\text{calc}}$	79.0894
$F_{\text{tab}(0.975)}$	-----	6.41
F_{calc}	$F_{\text{tab}} \geq F_{\text{calc}}$	964.5036
C.V.	$C.V. \leq 2.0\%$	0.67522%

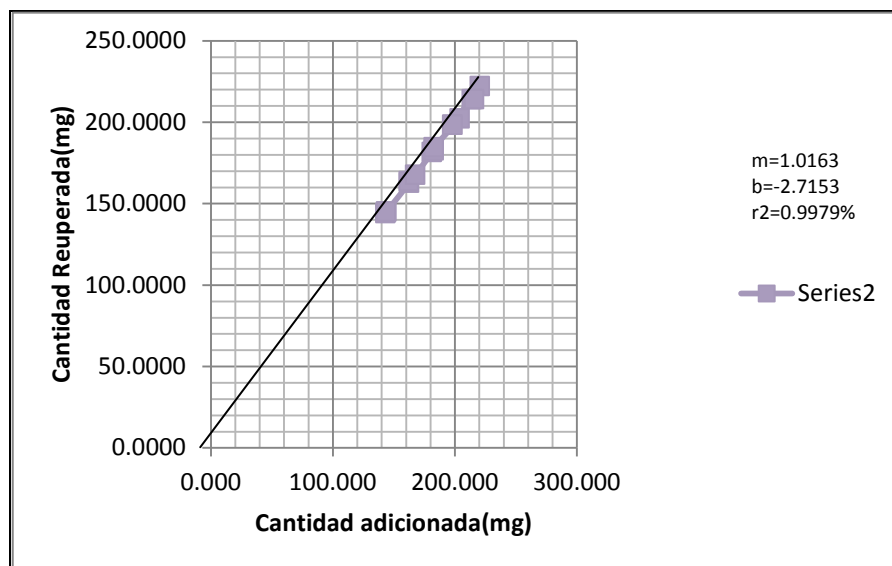


Fig. 8. Grafica de Linealidad del método. Cantidad adicionada vs. Cantidad recuperada

Para poder determinar la linealidad del método se tomó en cuenta el error experimental y al corregir con este valor se cumple así con la ecuación de la línea recta ($y = mx+b$).

También se evaluó el coeficiente de variación indicado que el método es homogéneo al realizar el análisis del principio, es decir que sus valores tienen poca variabilidad entre sí mismos al tener un $CV = \% \leq 2.0\%$ indicado para métodos volumétricos.

Se realizó el estadígrafo de contraste t de Student tanto para la ordenada al origen y como para la pendiente, donde se plantearon las siguientes hipótesis:

Ordenada al Origen ($H_0: b=0$, $H_a: b \neq 0$) obteniendo como resultado una $t_{cal} < t_{tab}$, por lo cual se acepta la $H_0=0$ al tener una ($t_{cal} = -2.7523$). El cálculo del estadígrafo de contraste se realizó con la ordenada al origen (b) corregida, al restarle el error experimental.

Pendiente ($H_0: m=0$, $H_a: m < 1$) obteniendo como resultado una $t_{cal} < t_{tab}$, por lo cual se acepta la $H_0=0$ al ser menor de cero ($t_{cal} = 79.0894$).

Así mismo se evaluó el Intervalo de confianza tanto de la ordenada al origen como de la pendiente obteniendo como resultado:

Ordenada al Origen (-10.08586, 0.07468), el intervalo incluye al cero.

Pendiente (0.9885, 1.0441), el intervalo incluye la unidad

Otra estimación estadística que se realizó fue un análisis de varianza (ANADEVA) para una regresión lineal, al igual que en la t de Student se plantearon dos hipótesis (H_0 = El volumen no depende de la concentración, H_a = el volumen depende de la concentración), al obtener una $F_{tab} \geq F_{calc}$, esto indica que se Rechaza la H_0 al ser un método donde el volumen depende de la concentración de la muestra.

6.2.10 Linealidad del método para el sabor Mango

Se obtuvieron los siguientes resultados para la linealidad de método del sabor Mango. (Ver tabla 42).

Tabla 42. Resultados de la linealidad del método.

Estimación estadística	Criterios	Resultados
Modelo	$y = mx+b$	$y= 0.9994x + (0.1118)$
	$y = mx+b+\xi_i$	$y= 0.9994x + (0.1118)-(-0.592922)$
m	$m=1$	0.9994
b	$b=0$	0.1118
r^2	$r^2 \leq 0.98$	0.9978
I.C. Ordenada al origen	El intervalo debe incluir al cero	-4.54922, 3.36337
$t_{tab(0.975)}$ Ordenada al origen	-----	2.160
t_{calc} Ordenada al origen	$t_{tab} \geq t_{calc}$	-0.3237
I.C. Pendiente	El intervalo debe incluir la unidad	0.9713,1.0275
$t_{tab(0.975)}$ Pendiente	-----	2.160
t_{calc} Pendiente	$t_{tab} \geq t_{calc}$	76.8178
$F_{tab(0.975)}$	-----	6.41
F_{calc}	$F_{tab} \geq F_{calc}$	3137.9098
C.V.	$C.V. \leq 2.0\%$	0.67880%

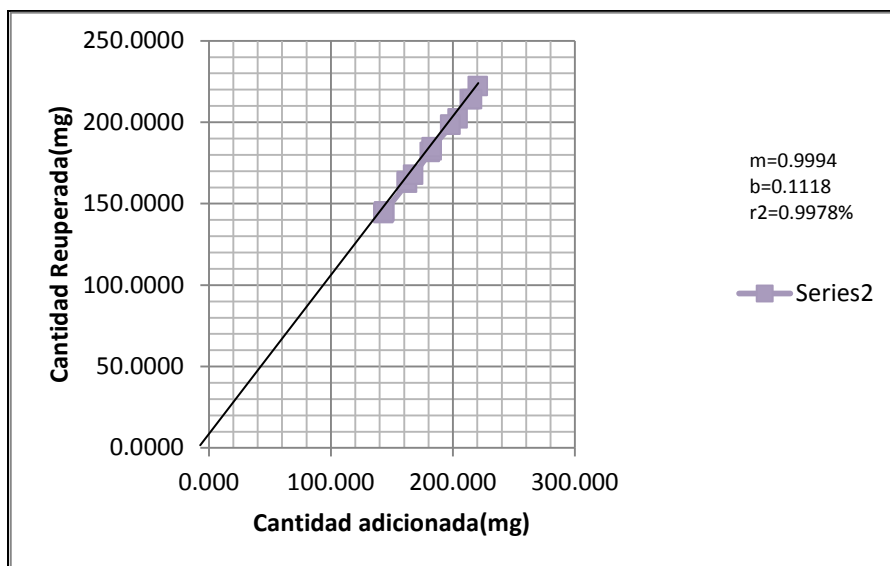


Fig. 9. Grafica de Linealidad del método. Nivel de Concentración vs. Cantidad recuperada

Para poder determinar la linealidad del método se tomó en cuenta el error experimental y al corregir con este valor se cumple así con la ecuación de la línea recta ($y = mx+b$).

También se evaluó el coeficiente de variación indicado que el método es homogéneo al realizar el análisis del principio, es decir que sus valores tienen poca variabilidad entre sí mismos al tener un $CV = \% \leq 2.0\%$ indicado para métodos volumétricos.

Se realizó el estadígrafo de contraste t de Student tanto para la ordenada al origen y como para la pendiente, donde se plantearon las siguientes hipótesis:

Ordenada al Origen ($H_0: b=0$, $H_a: b \neq 0$) obteniendo como resultado una $t_{cal} < t_{tab}$, por lo cual se acepta la $H_0=0$ al tener una ($t_{cal} = -0.3237$). El cálculo del estadígrafo de contraste se realizó con la ordenada al origen (b) corregida, al restarle el error experimental.

Pendiente ($H_0: m=0$, $H: m < 1$) obteniendo como resultado una $t_{cal} < t_{tab}$, por lo cual se acepta la $H_0=0$ al ser menor de cero ($t_{cal} = 76.8178$).

Así mismo se evaluó el Intervalo de confianza tanto de la ordenada al origen como de la pendiente obteniendo como resultado:

Ordenada al Origen (-4.54922, 3.36337), el intervalo incluye al cero

Pendiente (0.9713, 1.0275), el intervalo incluye la unidad

Otra estimación estadística que se realizó fue un análisis de varianza (ANADEVA) para una regresión lineal, al igual que en la t de Student se plantearon dos hipótesis (H_0 = El volumen no depende de la concentración, H_a = el volumen depende de la concentración), al obtener una $F_{\text{tab}} \geq F_{\text{calc}}$, esto indica que se Rechaza la H_0 al ser un método donde el volumen depende de la concentración de la muestra.

6.2.11 Exactitud del método para el sabor Fresa

Se obtuvieron los siguientes resultados para la linealidad de método del sabor Fresa. (Ver tabla 43).

Tabla 43. Valores Estadísticos

Promedio	99.6460%
Desviación estándar	0.5898
C.V.	0.5919%
N	6

En base a estos resultados se realizó la determinación del intervalo de confianza de la media poblacional (IC μ) obteniendo como resultado un intervalo de (99.0269, 100.2650), con esto se puede concluir que el método es exacto al incluir el valor del 100%.

6.2.12 Exactitud del método para el sabor Mango

Se obtuvieron los siguientes resultados para la linealidad de método del sabor Fresa. (Ver tabla 44).

Tabla 44. Valores Estadísticos

Promedio	99.9474%
Desviación estándar	0.6231
C.V.	0.6235%
N	6

En base a estos resultados se realizó la determinación del intervalo de confianza de la media poblacional (IC μ) obteniendo como resultado un intervalo de (99.2933, 100.6014), con esto se puede concluir que el método es exacto al incluir el valor del 100%.

7. CONCLUSIONES

☞ Se optimizó el método analítico para la cuantificación de Acido ascórbico FEUM 8^a en materia prima, proponiendo el siguiente método:

Pesar el equivalente a 180mg de Acido Ascórbico (aproximadamente 5.0g de la gomita), pasar a un matraz erlenmeyer de 250mL, adicionar 100mL de agua destilada a temperatura ambiente y 25mL de acido sulfúrico 2.0N. Colocar el matraz sobre una parrilla de agitación y calentamiento a una temperatura de 40°C hasta la disolución de la muestra, dejar enfriar. Adicionar 3mL de SI Almidón, titular con SV de Yodo 0.1N hasta que vire a color azul intenso. Cada mL de solución SV Yodo 0.1N equivale a 8.806mg de Acido Ascórbico.

☞ Ya establecido el método analítico para la cuantificación de acido ascórbico en gomitas, se validó de acuerdo con lo establecido en la FEUM 10^a ed.

☞ Por tanto se concluye que este método es capaz de cuantificar acido ascórbico, ya que es específico para gomitas pediátricas de sabor lima-limón, fresa y mango. Siendo un método lineal, preciso, exacto y reproducible al obtener resultados dentro de las especificaciones de $C.V. \leq 2.0\%$ y $r^2 \geq 0.98\%$, para métodos volumétricos.

☞ La muestra es estable a temperatura ambiente, más aún así se concluye que en el caso de no realizar inmediatamente la titulación, esta se debe conservar en refrigeración (2-8°C) por no más de 2h.

☞ Se concluye que este método de análisis es adecuado y confiable para la cuantificación de ácido ascórbico en gomitas pediátricas.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Genaro A, Remington Farmacia. Tomo 2. 20^a ed. Buenos Aires: Editorial Medica Panamericana; 2003. p. 2152-2155
2. Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos 8^a ed. México: Secretaria de Salud; 2004.
3. Badui S. Química de los alimentos. 3^a ed. México: Alhambra Mexicana; 1993.
4. Connors K, Amidon G, Stella V. Chemical Stability of Pharmaceuticals, A Handbook for pharmacists. 2^a ed. EUA: John Wiley and Sons, Inc.; 1986. p.208-211
5. Florey Klaus. Analytical profiles of drug substances. Vol.3. New York: Academic Press Inc.; 1974. p. 45-73
6. Kebbe A. Handbook of Pharmaceutical excipients. 3^a ed.. EU: APHA; 2000.
7. Florez J. Farmacología humana. 5^a ed. Barcelona: Elsevier España S.L.; 1994. p. 1119-1121
8. Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos 10^a ed. México: Secretaria de Salud; 2012.
9. ACIDO ASCORBICO. Acido Ascorbico.com. WWW[en línea] 2009 Disponible en Google [fecha de acceso 27 de enero del 2009]; Disponible en: <http://www.acidoascorbico.com.mx>
10. Fox B, Cameron A. Ciencia de los alimentos. Nutrición y salud. México: Limusa S.A. de C.V.; 2006. p. 424-439.
11. Rosado J, Rivera J, López G. Desarrollo y evaluación de suplementos alimenticios para el programa de educación, salud y alimentación. Salud Pública Mex. 1999; 41: 153-162.
12. “Prácticas de Higiene para el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios.” Norma Oficial Mexicana NOM-251-SSA1-2009. Diario Oficial de la Federación, 10 de octubre del 2008.
13. “Reglamento de Control Sanitario de Productos y Servicios”, Titulo primero. Diario Oficial de la Federación, 9 de agosto de 1999.
14. Skoog D, West D. Fundamentos de química analítica. 8^aed. México: Thomson; 2005. p. 146- 173, 584-587.

-
-
15. Pérez F, Vaquero G. Fundamentos del análisis farmacéutico. México: Facultad de Estudios Superiores Zaragoza; 1997. p. 7-9.
 16. Harris D. Quantitative Chemical Analysis. 6^a ed. EUA: Freeman and Company; 2003. p. 90-93, 346-365.
 17. Flaschka H. Química analítica cuantitativa. Introducción a la práctica Vol.2. México: Continental; 1982. p. 199-213.
 18. Salazar N. Desarrollo y validación de un método analítico a microescala para cuantificar ácido ascórbico en jarabe. Tesis de Licenciatura. FES Zaragoza. México; 2006.
 19. Schenk G. Química analítica. Principios y aplicaciones de las ciencias de la vida. México: Continental; 1984.
 20. “Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria química farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos” Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2006. Diario Oficial de la Federación, 22 de diciembre de 2008.
 21. “Buenas prácticas de fabricación de medicamentos” Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2013. Diario Oficial de la Federación, 22 de julio de 2013.
 22. Rius X, Maroto A, Bouqué R, Riu J. *La validación de métodos analíticos*. Universitat Rovira i Virgili. Google [fecha de acceso 21 julio del 2013] 43005; 1-7. Disponible en : argo.urv.es/quimio/general/qualit.pdf.
 23. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH-Q2A). Guideline for Industry: Text on Validation of analytical Procedures. USA(1995):A1-A3.
 24. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH-Q2B). Validation of analytical Procedures. Methodology USA (1995):2-8.
 25. Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos 10^a ed. México: Secretaría de Salud; 2012.
 26. García Al. Métodos analíticos. Guía de validación. México: Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, AC.; 2002.
 27. Hernández M. Incidencia y control en la deficiencia de vitamina “C” en población infantil. México: Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Servicio Social: 2008; 2008-12/48-4207

-
-
28. Connors K. Curso de análisis farmacéutico. Ensayo del medicamento. España: Editorial Reverté S.A.;1981.p. 120
 29. Barragán A. *Aseguramiento de la calidad en la determinación de ácido ascórbico*. Simposio de Metrología. Google [fecha de acceso 15 de julio del 2013] 2004; 1-7. Disponible en: <https://mensor.cenam.mx/simposio2004/memorias/TA-133.pdf>
 30. Clarke E. Isolation and identification of drugs in pharmaceuticals, body fluids and post-mortem material. Londres: London Pharmaceuticals press; 1974.
 31. Connors A. Curso de análisis farmacéutico.2^a ed. EU: Reverté; 1991.
 32. Davies M. Vitamin C: Its chemistry and biochemistry. Cambridge: Society of Chemistry; 1991.
 33. Day R, Underwood A. Química analítica cuantitativa. 5^a ed. México: Pearson Educación; 1989. p. 358-367.
 34. De Rettier E. Vitamins in Pharmaceutical formulations. J. Pharm. Sci. 1982; 71(10): 1073-7095.
 35. Diccionario de especialidades farmacéuticas. 41^a ed. México: Ediciones PLM. S.A.; 1995. Redoxón; p. 878.
 36. Guerra J. Validation of analytical methods by FDA laboratories part 1 and part 2. Pharm. Tach. 1986; 10: 74-84.
 37. Gutiérrez T, Hoyos L, Páez M. Determinación del contenido de ácido ascórbico en Uchuva (*Physalis peruviana* L.), por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR). Facultad de ciencias agropecuarias. 2007; 5(1): 70-79.
 38. Hitner H. Introducción a la farmacología. 5^a ed. México: Mc Graw Hill; 2007. p. 314-315.
 39. Jaselskis B, Nelapaty J. Spectrophotometric determination of microamounts of ascorbic acid in citrus fruits. Anal. Chem. 1972; 44 (2): 379-381.
 40. Kumar N. Spectrophotometric and titrimetric determinations of ascorbic acid. Anal. Chem. 1982; 54(4): 793-796.
 41. Ley General de Salud. Reglamento de Insumos para la Salud.
 42. Miller D. Química de los alimentos. Manual de laboratorio. México: Limusa S.A. de C.V.; 2007. p. 83-89.
 43. “Para la atención a la salud del niño”. Norma Oficial Mexicana NOM-031-SSA2-1999. Diario Oficial de la Federación, 22 de septiembre de 1999

-
-
44. Pirone B, Ochoa M, Kessler A, Michelis A. Evolución de la concentración de ácido ascórbico durante el proceso de deshidratación de frutos de la rosa mosqueta. *RIA*. 2002; 31(1) 85-98
 45. Proyecto de Norma Oficial Mexicana NOM-008-SSA-1993. Control de la nutrición, crecimiento y desarrollo del niño y de adolescente. Criterios y procedimientos para la prestación del servicio.
 46. Proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-043-SSA2-1999. Servicios básicos de salud. Promoción y educación para la salud en materia alimentario. Criterios para brindar orientación.
 47. Proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-217-SSA1-2002. Productos y servicios. Producto de confitería. Especificaciones sanitarias. Métodos de prueba.
 48. Rebollo M. *Suplementos nutricionales en pediatría*. *Rev. Chil Nutr.* Google [fecha de acceso 21 julio del 2013]; 29 (3) 1-12. Disponible en: www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717.
 49. Sahin S, Güllum S. Propiedades físicas de los alimentos. España: Acribia S.A.; 2009. p. 212-219.
 50. Salinas R. Alimentos y nutrición. Introducción a la Bromatología. 3ª ed. Buenos Aires: El Ateneo; 2000. p. 197-209.
 51. Velasco M, Roman L, Serrano J. Farmacología Fundamental. Madrid: Mc Graw Hill Interamericana; 2003. p. 717-719.
 52. Flores I. Manual de validación de métodos analíticos. México: Facultad de Estudios Superiores Zaragoza; 2004

9. ANEXO

9.1 Linealidad del sistema

a) Media Aritmética

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

b) Desviación Estándar

$$s = \sqrt{\frac{n(\Sigma y^2) - (\Sigma y)^2}{n(n-1)}}$$

c) Coeficiente de Variación

$$C.V. = \frac{s}{\bar{y}} * 100$$

d) Pendiente

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

e) Ordenada al Origen

$$b = \frac{\Sigma y - m\Sigma x}{n}$$

f) Coeficiente de Determinación

$$r^2 = \frac{(n(\Sigma xy) - (\Sigma x)(\Sigma y))^2}{(n(\Sigma x^2) - (\Sigma x)^2)(n(\Sigma y^2) - (\Sigma y)^2)}$$

g) Error experimental

$$\sum_{i=1}^n \xi_i = \Sigma (y_i - \hat{y}_i)$$

h) Intervalo de Confianza para la Ordenada al Origen

$$IC = m \pm t_{0.975(n-2)} \frac{S_{y/x}}{(n-1)S_x}$$

$$S_{y/x} = \frac{\Sigma y^2 - m(\Sigma xy) - b(\Sigma y)}{n}$$

i) ANADEVVA

$$SCt = m(\Sigma xy) + b(\Sigma y) - \frac{(\Sigma y)^2}{n}$$

$$SCerror = \Sigma y^2 - m(\Sigma xy) - b(\Sigma y)$$

9.2 Precisión del sistema

a) Media Aritmética

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

b) Desviación Estándar

$$s = \sqrt{\frac{n(\Sigma y^2) - (\Sigma y)^2}{n(n-1)}}$$

c) Coeficiente de Variación

$$C.V. = \frac{s}{\bar{y}} * 100$$

9.3 Linealidad del método

a) Media Aritmética

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

b) Desviación Estándar

$$s = \sqrt{\frac{n(\Sigma y^2) - (\Sigma y)^2}{n(n-1)}}$$

c) Coeficiente de Variación

$$C.V. = \frac{s}{\bar{y}} * 100$$

d) Pendiente

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

e) Ordenada al Origen

$$b = \frac{\Sigma y - m \Sigma x}{n}$$

f) Coeficiente de Determinación

$$r^2 = \frac{(n(\Sigma xy) - (\Sigma x)(\Sigma y))^2}{(n(\Sigma x^2) - (\Sigma x)^2)(n(\Sigma y^2) - (\Sigma y)^2)}$$

g) Error experimental

$$\sum_{i=1}^n \xi_i = \Sigma (y_i - \hat{y})$$

h) Intervalo de Confianza para la Ordenada al Origen

$$IC = m \pm t_{0.975(n-2)} \frac{S_{y/x}}{(n-1)S_x}$$

$$S_{y/x} = \frac{\Sigma y^2 - m(\Sigma xy) - b(\Sigma y)}{n}$$

d) Intervalo de Confianza para la Pendiente

$$IC = b_1 \pm t_{0.975, (n-2)} S_{b_1}$$

$$S_{b_1} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\Sigma x^2 - (\Sigma x)^2/n}}$$

$$\frac{S_y}{x} = \sqrt{\frac{\Sigma y^2 - b_1 \Sigma xy - b_0 \Sigma y}{n-2}}$$

i) ANADEVIA

$$SCt = m(\Sigma xy) + b(\Sigma y) - \frac{(\Sigma y)^2}{n}$$

$$SC_{error} = \Sigma y^2 - m(\Sigma xy) - b(\Sigma y)$$

9.4 Exactitud del método

a) Media Aritmética

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

b) Desviación Estándar

$$s = \sqrt{\frac{n(\Sigma y^2) - (\Sigma y)^2}{n(n-1)}}$$

c) Coeficiente de Variación

$$C.V. = \frac{S}{\bar{y}} * 100$$

d) Intervalo de confianza para la media poblacional

$$IC(\mu) = \bar{y} \pm t_{0.975} \frac{S}{\sqrt{n}}$$

9.5 Repetibilidad

a) Media Aritmética

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

b) Desviación Estándar

$$s = \sqrt{\frac{n(\Sigma y^2) - (\Sigma y)^2}{n(n-1)}}$$

c) Coeficiente de Variación

$$C.V. = \frac{S}{\bar{y}} * 100$$

d) Estadígrafo de contraste

$$\chi^2_{calc} = \frac{(n-1)S^2}{\sigma^2}$$

9.6 Reproducibilidad

a) ANADEVVA

FUENTE	g.l.	SC	MC	F calculada
ANALISTA	a-1	SCa	SCa/gla	Mca/Mce
DIA	b-1	SCd	SCd/gdl	MCd/Mce
INTERACCION	(a-1)(b-1)	SCad	SCad/glad	Mcad/Mce
ERROR	ab(c-1)	SCe	SCe/gle	

$$SCt = m(\Sigma xy) + b(\Sigma y) - \frac{(\Sigma y)^2}{n}$$

$$SCerror = \Sigma y^2 - m(\Sigma xy) - b(\Sigma y)$$

9.7 Estabilidad de la muestra

a) Media aritmética del análisis inicial

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

b) Media aritmética del análisis de cada condición de almacenaje

$$y_i = \frac{\Sigma y_i}{n_i}$$

c) Diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición de almacenaje respecto de la media aritmética del análisis inicial.

$$|d_i| = |\bar{y}_i - \bar{y}_0|$$

d) Varianza Ponderada

$$Sp1^2 = \frac{2S^2_0 + 2S^2_1}{2(C + 1)}$$

9.8 Tolerancia

a) Media Aritmética

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

b) Desviación Estándar

$$s = \sqrt{\frac{n(\Sigma y^2) - (\Sigma y)^2}{n(n-1)}}$$

c) Coeficiente de Variación

$$C.V. = \frac{s}{\bar{y}} * 100$$