



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**DESARROLLO DE UN MÉTODO AUTOMÁTICO PARA  
DETERMINAR VITAMINA C**

**T E S I S**

Que para obtener el título de:

**QUIMICA DE ALIMENTOS**

PRESENTA:

**ARACELI RUIZ BOLAÑOS**



México D.F.

2006



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **AGRADECIMIENTOS**

A la profesora Pilar Cañizares Macías por su gran ayuda y sobre todo su enorme paciencia al asesorarme en este trabajo.

A las profesoras Josefina Elizalde Torres y Sandra Sánchez del Ángel por sus amables comentarios y por darse el tiempo de revisar este trabajo.

A la Facultad de Química, y a todos sus profesores, GRACIAS

## **DEDICATORIAS**

A los dos seres humanos que más admiro, mis padres, la Sra. Lourdes Bolaños Jasso y el Sr. Rafael Ruiz Cruz. por todo lo que han hecho por mi, mil gracias.

A mis mejores y más queridos compañeros de juegos y peleas, mi hermano Francisco y mis hermanas Esthela, Carmen, Lulú y Nancy. Por su paciencia y apoyo gracias.

Familia LOS AMO

A mis cómplices de aventuras y travesuras, confidentes y hasta psicólogas, mis amigas: Vero Juárez, Tony Badillo, Lucky, Ivonne, Ana María López, Lulú, Cintyia, Fabiola, Noemí Ángeles, Rosario, Arminda, también Armando y Jahir.

# ÍNDICE

## CAPÍTULO I

Resumen

Objetivos

## CAPÍTULO II

### 2.1 Introducción

### 2.2 Antecedentes

- Definición de dispositivos automáticos y automatizados
- Tipos generales de métodos automáticos

#### 2.2.1 Análisis por inyección en flujo continuo

- Fundamentos físicos del FIA
- Dispersión
- Características esenciales del FIA
- Esquema general
- Diagrama

#### 2.2.2 Vitamina C

- Generalidades
- Funciones
- Requerimientos
- Síntomas por su carencia
- Determinaciones analíticas

#### 2.2.3 Jugos y néctares

- Definición

## CAPÍTULO III

### 3.1 Metodología

#### 3.1.1.1 Reactivos

#### 3.1.1.2 Equipo e instrumental

#### 3.1.1.3 Disoluciones y muestras

#### 3.1.2 Fundamento de la reacción

#### 3.1.3 Optimización de los parámetros hidrodinámicos

#### 3.1.4 Optimización de los parámetros químicos

#### 3.1.5 Metodología para establecer los límites de confianza

#### 3.1.6 Determinación del límite de detección y límite de cuantificación

#### 3.1.7 Precisión

## CAPÍTULO IV

### 4.1 Resultados y discusión

#### 4.1.1 Optimización de los parámetros hidrodinámicos

##### 4.1.1.1 Caudal a 3.2 mL/min

##### 4.1.1.2 Estudio de la optimización del caudal

##### 4.1.1.3 Longitud del reactor

##### 4.1.1.4 Volumen de inyección

#### 4.1.2 Optimización de los parámetros químicos

#### 4.1.3 Evaluación del intervalo lineal

#### 4.1.4 Determinación de los límites de detección y de cuantificación

#### 4.1.5 Precisión del método

#### 4.1.6 Análisis de muestras

### 4.2 Conclusiones

### 4.3 Bibliografía

## CAPÍTULO I

### **RESUMEN**

El presente trabajo propone un método para determinar ácido ascórbico en jugos y néctares a partir de un sistema automático de Análisis por Inyección en Flujo (FIA).

La cuantificación de ácido ascórbico con el sistema FIA se determinó inyectando 146  $\mu\text{L}$  de muestra, a través de una válvula de inyección, en un portador de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0.01 M). A lo largo de un reactor de 200 cm, el ácido ascórbico reduce al  $\text{Fe}^{3+}$  en  $\text{Fe}^{2+}$  para confluir posteriormente con un flujo de 1,10 – fenantrolina (0.25 %), donde se lleva a cabo la formación del complejo  $\text{Fe}^{2+}$  - fenantrolina. Finalmente el producto de la reacción pasa a través de una celda de flujo, que se localiza en un espectrofotómetro UV-VIS, donde se mide a 510 nm. Los parámetros hidrodinámicos optimizados fueron: caudal, volumen de inyección y longitud del reactor. Se realizó la curva de calibración encontrando dos intervalos lineales.

Para la determinación de ácido ascórbico en jugos y néctares se escogió el primer intervalo lineal, de 2 a 50 mg/L con un límite de detección de 1.48 mg/L y un límite de cuantificación de 4.93 mg/L. La precisión fue de 1.35 % y la frecuencia de muestreo de 36 inyecciones por hora.

## **OBJETIVO GENERAL**

Desarrollar un método por Análisis por Inyección en Flujo (FIA) para la determinación de vitamina C en diferentes tipos de jugos y néctares.

## **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Optimizar las condiciones químicas e hidrodinámicas del sistema FIA
- Establecer el intervalo lineal, límite de detección, límite de cuantificación y precisión del método para cuantificar la vitamina C por FIA
- Determinar vitamina C en jugos y néctares

## CAPÍTULO II

### **2.1 INTRODUCCIÓN**

Los jugos de fruta y néctares representan una fuente significativa de ácido ascórbico, la variedad y el crecimiento en su consumo, es una consecuencia de la demanda de bebidas que son compatibles con la idea de adaptar un estilo de vida saludable, por lo que la cantidad de ácido ascórbico es entre otros, una determinante en la calidad del producto que se consume. El resultado de esto es la consecuencia del proceso que se lleva a cabo durante su elaboración (sustituciones o adulteraciones), almacenaje, distribución y posiblemente durante su exhibición.

La cantidad de ácido ascórbico contenida en un fruto varía de acuerdo a las diferencias en la composición del suelo, localización del cultivo, variedad y madurez de la planta, entre otros.

El ácido ascórbico es altamente sensible a varias maneras de deterioro, por lo que es necesario contar con un método rápido y selectivo para su determinación particularmente en análisis de rutina en la industria de alimentos. El método de cuantificación de ácido ascórbico desarrollado en este trabajo es por Análisis por Inyección en Flujo (FIA), el cual ofrece una determinación continua automática de ácido ascórbico en jugos y néctares y el análisis de un gran número de muestras. Las ventajas que presenta esta técnica en comparación con otros métodos son:

- a) La reducción del tiempo en las determinaciones.
- b) Disminución del material utilizado, lo cual permite minimizar el consumo de reactivos.
- c) Una mayor reproducibilidad, la muestra no se encuentra expuesta por largo tiempo al oxígeno del ambiente ya que el diseño en FIA reduce el contacto con el oxígeno.
- d) No presenta un flujo segmentado (lavado-aire- muestra –aire-lavado), como sucede en el método semiautomático lo que provoca un aumento



en el tiempo de análisis y disminución del número de muestras a analizar.

## 2.2 ANTECEDENTES

### *Definición de dispositivos automáticos y automatizados*

El uso de los Métodos Automáticos de Análisis va ligado al concepto de la sustitución de una operación o medida estática realizada manualmente por un operador y medida continua o secuencial. La incorporación de un sistema automático se lleva a cabo en alguna operación específica dentro de los métodos instrumentales, de tal manera que se automatiza parcial o totalmente la operación, lográndose dos objetivos: mejorar la técnica analítica o bien simplemente reducir el esfuerzo humano,

En la aclaración de los conceptos Automático (el empleado en este trabajo) y automatizado se dan las siguientes definiciones según la IUPAC.

- Se define como “dispositivos automáticos” aquellos que originan unas acciones previamente requeridas, para ser llevadas a cabo en unos puntos (momentos) de un proceso, sin la intervención humana. El sistema no toma decisiones y la secuencia de las operaciones y acciones es siempre la misma. No tienen incorporado un sistema de realimentación.
- Se define como “dispositivos automatizados”, aquellos que realizan la acción de automatizar. Se diseñan para que un sistema de realimentación les permita tomar decisiones sin la intervención humana. El sistema se autocontrola y autoajusta. La secuencia de operaciones es distinta para cada situación (muestra). Son sistemas con mayor independencia y a veces se les denomina “completamente automáticos”

## *Tipos generales de métodos automáticos*

Los métodos automáticos de análisis de una serie de muestras, generalmente en disolución, pueden clasificarse en tres tipos:

1. **Métodos Automáticos Discontinuos (discrete or batch methods).**- cada muestra se mantiene separada en un receptáculo, llamado copa, cubeta o pocillo, en el que tienen lugar las diferentes etapas analíticas: dilución, adición de reactivo(s), etc, mediante procesos mecánicos que transportan cada una de estas copas a unidades dispensadoras de los diluyentes y reactivos, que se añaden de manera secuencial, existiendo sistemas intermedios de agitación para realizar la mezcla, por último cada muestra es llevada al detector (Fig.1). Existen dos tipos de métodos discontinuos: en serie y en paralelo.

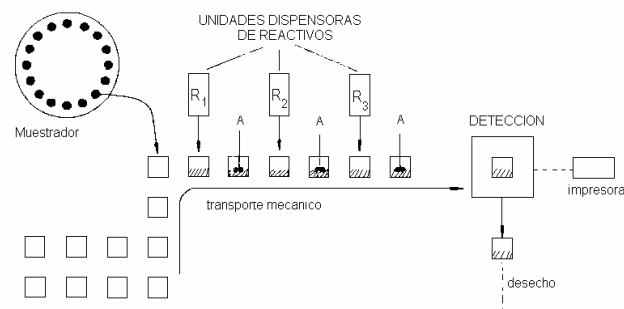


Figura 1. Esquema del método automático discontinuo.

2. **Métodos Automáticos Continuos (continuous methods).**- La concentración del analito se mide sin interrumpir el flujo de líquido o gas. Las muestras se introducen de manera sucesiva y a intervalos regulares de tiempo en un canal por el que fluye un líquido en el que se encuentra disuelto el reactivo, o bien es introducido posteriormente en canales que confluyen con el principal. El flujo pasa a través de una cubeta de flujo que forma parte de un sistema de detección. El flujo de salida se desprecia, la señal obtenida se recoge en un registrador y es de tipo continuo (Fig.2).

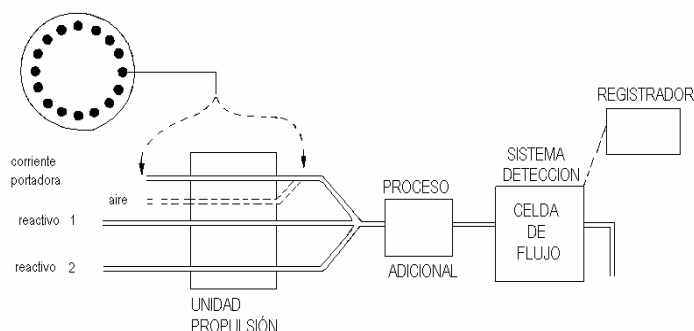


Figura 2. Esquema del método de análisis continuo.

Existen dos tipos de métodos automáticos continuos de acuerdo a las características del flujo:

a) Flujo segmentado:

- Análisis en Flujo Continuo Segmentado (SFA)

b) Flujo no segmentado:

I. *Con inyección:*

- **Análisis por Inyección en Flujo (FIA)**
- Análisis en Flujo no segmentado, interrumpido y almacenado (SF/USA)
- Análisis por inyección secuencial (SIA)

II. *Sin inyección:* - Análisis en Flujo Completamente Continuo

3. Métodos robotizados.- se basan en el uso de un mini robot controlado por un microprocesador que mimetiza las funciones llevadas a cabo por un operador en el desarrollo de un método analítico. A pesar de que estos montajes se han utilizado con anterioridad en ciertas áreas su uso sistemático para llevar a cabo una determinación analítica completa, no ha tenido un amplio desarrollo.

Debido a las características de análisis para el ácido ascórbico en este trabajo se definirá y explicará exclusivamente las características principales de

los sistemas de flujo continuo con inyección y en particular al análisis por inyección en flujo.

## **2.2.2 Análisis por inyección en flujo continuo**

### *Fundamentos físicos del FIA (1)*

Los fundamentos físicos del FIA están relacionados con la “dispersión”, que se define como la dilución que sufre un volumen de muestra inyectada en el flujo en un sistema determinado. Esta se caracteriza por el perfil de concentración que en un momento dado adquiere el “trozo” o bolo intercalado en un lugar determinado del sistema sin interrumpir el flujo.

### *Dispersión*

Como anteriormente se mencionó la dispersión es la dilución que sufre la muestra inyectada en un sistema. Esta dispersión varía con respecto al tiempo, dando como resultado los siguientes comportamientos:

Cuando la muestra se inyecta, tiene un perfil de concentración rectangular (Fig. 3a), al ir circulando por el interior del reactor, tiene un lugar de ensanchamiento de la zona (dispersión, Fig. 3b), El perfil resultante depende de dos fenómenos: uno a la convección asociada al flujo laminar en el que el centro del fluido avanza más rápidamente que el líquido adyacente a las paredes, lo que da lugar a la zona curvada con el perfil parabólico y dos se produce ensanchamiento de zona por la difusión (Fig. 3c) que es la que al final predomina sobre las demás (Fig. 3d).

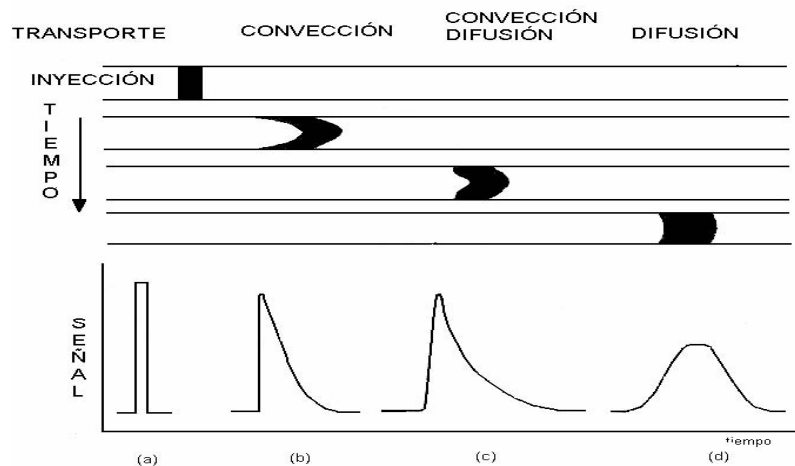


Figura 3. Efecto de la convección y difusión del analito en el detector sin dispersión (a), dispersión por convección (b), dispersión por convección y difusión radial (c), dispersión por difusión (d).

El análisis por inyección en flujo se realiza en condiciones en la que la dispersión se produce tanto por convección como por difusión radial y se obtienen picos similares a los de la Figura 3c. En este caso la dispersión radial desde las paredes hacia el centro deja las paredes sin analito y así se elimina la contaminación entre muestras.

La dispersión (D) se define con la siguiente ecuación

$$D = c_0/c$$

En la que  $c_0$  es la concentración del analito en la muestra inyectada y  $c$  la concentración correspondiente al pico obtenido en el detector.

En la dispersión influyen tres variables interrelacionadas y controlables: volumen de la muestra, longitud del reactor y velocidad de flujo.

- a) Volumen de la muestra.- cuando el volumen de muestra es muy grande existe una proporción del bolo que no ha sufrido dilución y por tanto durante el tiempo en la que la muestra que pasa por el detector, la máxima señal, corresponde a la concentración original y  $D = 1$ .
- b) Longitud del reactor.- al aumentar la longitud del reactor se aumenta el tiempo de residencia, provocando la aparición de difusión de tipo axial y por lo tanto de un aumento en la dispersión así como en el tiempo de reacción.

- c) Velocidad de flujo.- son inversamente proporcionales, es decir, al disminuir el flujo existe un aumento en la dispersión.

En FIA se realiza el análisis más rápido, con una mayor frecuencia de muestreo y una mejor reproducibilidad, lo que garantiza confiabilidad en la determinación a un bajo costo (1).

#### *Características esenciales del FIA*

EL FIA es una modalidad del análisis en flujo continuo (CFA). Se trata, en principio de un apartado de los Métodos Automáticos de Análisis, pero que presenta una diferencia importante en relación con el conjunto de los mismos.

Esta consiste en su diseño para el análisis de muestras inyectadas, que es la situación más frecuente en FIA. En esta metodología se sustituye el material de vidrio, reduciendo el tiempo de análisis con resultados reproducibles. Al tratarse de un sistema cerrado, se minimiza el contacto entre operador y reactivos tóxicos así como los reactivos y muestras son protegidos frente a los gases atmosféricos.

Los aspectos clave en la metodología FIA son: flujo no segmentado, inyección directa, dispersión parcial controlada y tiempo de operación reproducible, como a continuación se explica:

1. El flujo no está segmentado por burbujas de aire, lo que constituye la diferencia fundamental con los métodos clásicos de CFA.
2. La muestra líquida es inyectada o insertada directamente en el flujo en lugar de ser aspirada por el mismo.
3. Se realiza un transporte del "trozo" inyectado a través del sistema.
4. La dispersión o dilución parcial del analito en este transporte puede ser perfectamente manipulada mediante un control de las características geométricas e hidrodinámicas del sistema.
5. Un sistema de detección continuo proporciona una señal transitoria.

6. En el momento de la detección de la señal no se ha alcanzado el equilibrio físico, ni el equilibrio químico. Por ello las técnicas FIA pueden considerarse dentro de los Métodos Cinéticos de Análisis.

### *Esquema General*

El sistema FIA consta de las siguientes partes:

- a. Una unidad de propulsión, establece un flujo de caudal lo más constante posible de una disolución (o de varias) que lleva disuelto un reactivo o hace de simple portador. Puede ser una bomba peristáltica (Fig.4), un sistema de presión gaseosa o bien simplemente la fuerza de la gravedad.



Figura 4. Bomba peristáltica

- b. Un sistema de inyección, permite insertar o introducir en el flujo un volumen exactamente medido de la muestra con gran reproducibilidad de operación sin interrumpir el mismo (Fig.5)



Figura 5. Válvula de inyección.

- c. Un reactor, donde tiene lugar el transporte con o sin proceso adicional, Puede ser un tubo recto en forma de serpentin, relleno o no de bolitas inertes o bien tener una cámara de mezcla, un tubo relleno de material inerte o activo químicamente (Fig. 6)



Figura 6. Reactor.

- d. Una celda de flujo, incorporada a un sistema de medida, que transduce la señal continua a un registrador (Fig. 7)



Figura 7. Celda de flujo

En la Figura 8 se representa el esquema de una configuración FIA.

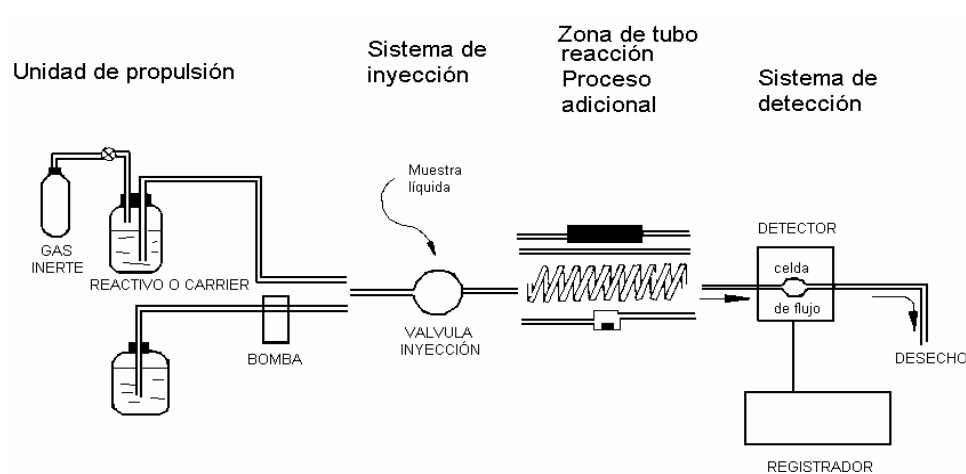


Figura 8. Esquema del sistema FIA. V.I : válvula de inyección, r : reactor.



## Fiagrama

La respuesta de la unidad de detección de un sistema FIA es una señal transitoria, típica de muchas técnicas analíticas. Es la representación gráfica de la señal (absorbancia, intensidad de fluorescencia, etc.) en función del tiempo.

Una representación esquemática de los registros FIA son denominados fiagramas (Fig. 9).

Las características esenciales de un fiagrama son:

- La altura del pico,  $h$ , que se relaciona con la concentración del componente de la muestra inyectada que se determina.
- Tiempo de residencia,  $t$ , es el tiempo transcurrido desde la inyección, hasta que se alcanza la máxima señal.
- Tiempo de retorno,  $t'$ , que es el tiempo comprendido entre el momento en que se alcanza la máxima señal y el instante en que la señal vuelve a la línea base.
- El tiempo en el cual aparece la señal,  $\Delta t$ , que se define como el periodo en el cual la señal sale y vuelve de nuevo a la línea base ("base line – base time"), y que es una manera de definir la dispersión o dilución del analito.

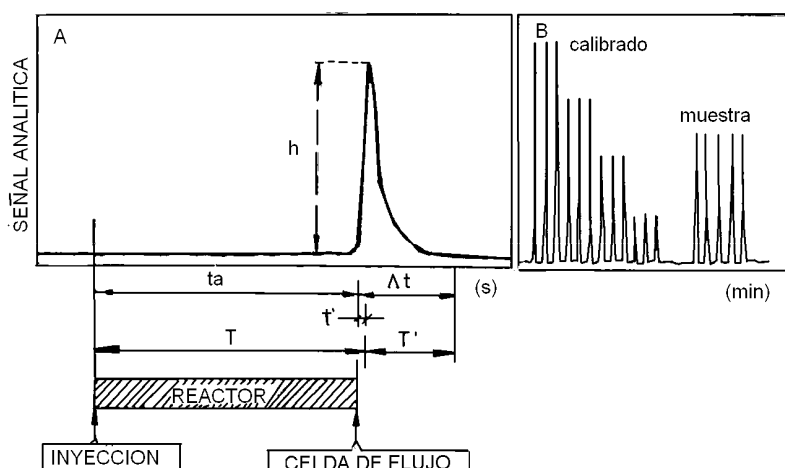


Figura 9. Representación gráfica de la señal en un sistema FIA. A.- Características de una señal analítica para cada inyección de muestra al sistema. B.- Diagrama obtenido de una serie de inyecciones del analito en el sistema.

### 2.2.3 Vitamina C

#### *Generalidades*

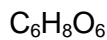
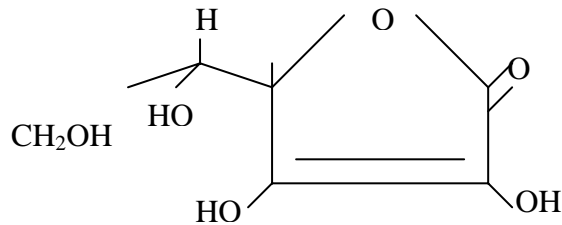
Entre las enfermedades por deficiencias nutricionales el escorbuto es una de las que causó un gran número de muertes humanas. Sus síntomas característicos son descritos desde los egipcios, griegos y romanos.

La enfermedad aumentó entre los marineros exploradores de los siglos XVI al XVIII, en quienes aparecían los síntomas típicos (hemorragia, inflamación articular, manchas oscuras en la piel), durante este periodo las expediciones se vieron muy afectadas a causa del escorbuto. En 1747 James Lind administró 6 diferentes complementos dietéticos a marineros escorbúticos, los resultados demostraron la eficacia de las naranjas y limones para curar el escorbuto. Sin embargo después de 48 años de realizado el experimento, el jugo de limón comenzó a formar parte de las provisiones de los navíos. En el siglo XIX el escorbuto afectó Europa durante la hambruna de las papas, a los ejércitos de Crimea y de la guerra civil de E.U. y las comunidades de la fiebre del oro en California.

La vitamina C (ácido ascórbico), fue identificada como vitamina en 1928 y sintetizada en 1933. Pertenece al grupo de vitaminas hidrosolubles, se encuentra de manera natural ampliamente distribuida en frutas y verduras como: melón, fresas, tejocote, zapote negro, frutas cítricas, chiles secos, pimiento morrón, coles de brucas, hojas de nabo entre otras. La cantidad de vitamina C está en menor proporción en los tejidos animales, es ópticamente activa y su estructura de cetolactona de seis carbonos, tiene relación estructural con la glucosa y otras hexosas. Se oxida de modo reversible en el organismo hacia ácido dehidroascórbico, donde su carácter ácido deriva del carácter enólico de los grupos hidroxilos en la posición C<sub>2</sub> y C<sub>3</sub> siendo el OH del C<sub>3</sub> el más ácido.

## ÁCIDO ASCÓRBICO (2)

Vitamina C, L - ácido ascórbico, Vitamina antiescorbútica.



PM 176.13

PF 190-192 °C

$E^\circ$  (pH 5) = 0.127 V

$\text{pk}_1 = 4.2$   $\text{pk}_2 = 11.57$

Diversos factores pueden influir en los mecanismos de degradación del ácido ascórbico como lo son: la temperatura, pH, el oxígeno, enzimas, concentraciones de sal, azúcar, carga microbiológica y catalizadores metálicos ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ), entre otros. La pérdida del ácido ascórbico es proporcional al tiempo de cocción, a la temperatura y a la superficie exterior de los vegetales (cuanto más pequeños son los trozos mayor es la superficie expuesta), si al cocer se les añade bicarbonato, la vitamina que pasa al agua de cocción queda totalmente destruida (3).

Los seres humanos y otros primates, así como los cobayas y algunos murciélagos, son los únicos mamíferos conocidos que son incapaces de sintetizar ácido ascórbico carecen de la enzima hepática necesaria en la conversión de L-gulonolactona en ácido L-ascórbico (4), por lo que requieren de vitamina C en la dieta para la prevención del escorbuto.

### *Funciones*

#### En alimentos

El ácido ascórbico se emplea en la prevención del pardeamiento en jugos actuando como antioxidante y para enriquecer el producto en vitamina C (4) en la fortificación de harinas, a si como también en la inhibición de la formación de nitrosaminas en carnes curadas y reducción de los iones metálicos (5)

Los jugos tratados térmicamente conservan aproximadamente un 97% del contenido inicial de ácido ascórbico (3).

### Metabólicas

Participa como cofactor en diversas reacciones de hidrolización y amidación al transferir electrones a enzimas que proporcionan equivalentes reductores. De este modo se facilita la conversión de algunos residuos de prolina y lisina que se encuentran en el procolágeno en hidroxiprolina e hidroxilisina en el transcurso de la síntesis de colágeno, la oxidación de cadenas laterales de lisina en proteínas, para proporcionar hidroxitrimetilisina para la síntesis de carnitina, el metabolismo microsómico de fármacos, y la hidroxilación de dopamina para formar noradrenalina, síntesis de las hormonas suprarrenales. También funciona en la transferencia de iones  $H^+$ , regula el potencial de oxidoreducción intracelular de algunos sistemas enzimáticos y actúa como un oxidante para las vitaminas A y E. Al reducir el hierro férrico no hemo al estado ferroso en el estómago, el ácido ascórbico favorece la absorción intestinal de hierro. A nivel tisular el ácido ascórbico se relaciona con la síntesis de colágeno, proteoglucanos y otros constitutivos orgánicos de la matriz intercelular en tejidos tan diversos como dientes, huesos y endotelio capilar.

La vitamina C se administra por vía oral; en situaciones que evitan la absorción adecuada a partir del tubo digestivo, pueden proporcionarse soluciones por vía parenteral (3,4,6).

### Requerimientos

Varían con la edad, sexo, aumentando durante el embarazo, en casos de estrés y en fumadores.

Siendo la ingesta diaria recomendada (IDR) 60 mg para adultos sanos (7), embarazadas 70 mg y en los fumadores de 100 mg/día (Food and Nutrition Board 1989), alimentos ricos en vitamina C disminuye el riesgo de enfermedades cardiovasculares, de varios tipos de cáncer, escorbuto y posiblemente de enfermedades neurodegenerativas (8).

A continuación se citan algunos ejemplos de alimentos que contienen ácido ascórbico.

Cantidad de vitamina C mg/100 g de porción comestible	Alimento	Cantidad de vitamina C mg/100 g de porción comestible	Alimento
Menos de 25 mg	Plátano	De 60 a 80 mg	Naranja, mandarina
	Toronja		Nanche
	Jitomate		Zapote negro
	Piña		Coliflor cruda (80mg)
De 25 a 60 mg	Camote al horno	Más de 80 mg	Coliflor cocida (55mg)
	Nabo		brócoli crudo(110mg)
	Lima, limón		Brócoli cocido (90mg)
	fresa		pimiento
	papaya		guayaba
	tejocote		Chile poblano

Tabla1. Valor nutritivo de los alimentos por ración.

El organismo humano no puede sintetizar ni almacenar por mucho tiempo esta vitamina (su duración de reserva es de 2 a 4 meses), por lo que se tiene que ingresarla mediante el aporte alimenticio (9).

No toda la vitamina que se ingiere se aprovecha por el organismo, ya que un 50% de la misma es destruida a causa de la alcalinidad intestinal.

### *Síntomas de la carencia de vitamina C*

La mayor parte de síntomas de la carencia de vitamina C se puede relacionar directamente con sus papeles metabólicos. Entre los síntomas de la carencia leve de vitamina C se encuentran: la facilidad de producirse heridas y rotura de los capilares que conducen a la aparición de abundantes petequias

(pequeñas hemorragias en forma de punto en la piel) y su coalescencia para formar equimosis.

La enfermedad por deficiencia de vitamina C es el escorbuto, la cual está asociada con una disminución en la capacidad de curar heridas, osteoporosis, hemorragias y anemia. La osteoporosis resulta de la incapacidad de mantener la matriz orgánica colagenosa del hueso, lo que va seguido de la desmineralización. La anemia se debe a la extensa hemorragia, asociada con defectos en la absorción del hierro (10).

### Manifestaciones clínicas por la carencia de vitamina C

Se manifiesta por múltiples síntomas entre los cuales se encuentran:

- Fatiga
- Debilidad
- Letargia
- Irritabilidad
- Hemorragia gingival
- Dolor muscular y articular
- Pérdida de peso

Fumar disminuye los niveles séricos de vitamina C, la aspirina parece bloquear la captación de vitamina C por los leucocitos. Los anticonceptivos orales y los corticosteroides también disminuyen los niveles séricos de vitamina C (10).

### *Determinación analítica de vitamina C*

En la determinación de ácido ascórbico se encuentran tres métodos oficiales descritos por la AOAC (11).

- 1) 2,6-diclorofenol-indofenol
- 2) Fluorimétrico
- 3) Semiautomático

Sin embargo son varios los métodos utilizados en la determinación de ácido ascórbico (12) basados en sus propiedades reductoras y su habilidad de producir compuestos coloridos, entre los cuales encontramos:

1) Los métodos titulométricos como el 2,6-diclorofenolindofenol de uso común (método oficial según la (AOAC). Donde el ácido ascórbico reduce al 2,6-diclorofenol indofenol en solución ácida.

Mediante este método de titulación son reportados el uso de otros reactivos como la tetraclorobenzoquinona que utiliza al EDTA.

El yodo, yoduro de potasio los cuales utilizan almidón como indicador al igual que el bromuro de potasio. Otros compuestos yodados son reportados como el *o*-benzoato de yodo, *o*-diacetoxiyodobenzoate. Otros reactivos como la N-bromosuccinamida, el perclorato de talio (III), y sulfato de cobre (II) han sido reportados para la determinación de ácido ascórbico requiriendo de una atmósfera inerte en la determinación. Aunque los métodos titulométricos son de uso simple las dificultades que se encuentran en estos es que por tratarse de un método visual el punto final en la titulación puede ser impreciso, además del problema que se presenta con las muestras coloreadas.

2) Dentro de los métodos electroquímicos que se utilizan en la determinación de ácido ascórbico encontramos los polarográficos que a pesar de que se reportan varias metodologías todavía no es ampliamente usada, una de las razones es el requerimiento de remover las interferencias por medio de otras técnicas de separación, tal como extracción, intercambio iónico y cromatografía. Los análisis voltamperométricos donde se hace uso de diferentes electrodos la funcionabilidad de tales electrodos decrece ya que puede contaminarse por productos de oxidación debido al uso repetitivo en las determinaciones lo que hace que su tiempo de vida sea limitada. Las titulaciones potenciométricas han sido empleadas para la determinación de ácido ascórbico usando 2,6-diclorofenolindofenol, N-bromosuccinamida, sulfato de cobre, iodo, tetraclorobenzoquinona como titulantes.

3) Método fluorimétrico (método oficial según AOAC) se determina tanto ácido ascórbico como dehidroascórbico. El ácido ascórbico se convierte a la forma dehidro mediante el tratamiento con norit. El grupo  $\alpha$ -diceto de este

compuesto reacciona con la *o*-fenilenediamina y la quinoxalina así formada se determina fluorimétricamente. Los métodos fluorimétricos no determinan directamente al ácido ascórbico, este método requiere cálculos que implica la corrección de la altura máxima de los picos. Además se necesita un control cuidadoso en el pH puesto que la intensidad de la fluorescencia de muchas sustancias es dependiente del pH de la solución.

4) Métodos cromatográficos: han sido usados para la separación y determinación del ácido ascórbico. Estos métodos requieren precauciones especiales para prevenir pérdidas de ácido ascórbico durante la preparación de la muestra además del elevado costo que representan los equipos.

5) El método semiautomático (oficial según AOAC) La presencia de burbujas de aire obliga a incorporar mecanismos de eliminación de las mismas por lo que su ciclo de lavado es esencial, provocando posibles contaminaciones y haciendo más lenta la técnica, además presenta un gasto de reactivos alto comparado con la metodología FIA.

### **2.2.3 Jugos y Néctares**

Los jugos de alguna forma han sido consumidos durante muchos años, no es sino hasta 1869 que se inicia la industria de los jugos con el embotellado de uva sin fermentar, posteriormente en la segunda mitad del los años 70's se vio favorecido por la aplicación de tratamientos de esterilización UHT y envasado aséptico.

Se define como jugo de fruta al jugo sin fermentar pero fermentable destinado al consumo humano. Obtenido por procedimiento mecánico a partir de frutas sanas y maduras conservando por medios físicos exclusivamente. Podrán añadirse pulpa y células obtenidas por procedimientos físicos adecuados del mismo tipo de fruta (13) El jugo debe tener las características de color, olor y sabor típicas de la fruta de la que procede.



Se define néctar a los productos no pulposos o pulposos sin fermentar pero fermentable destinado al consumo directo, obtenido mediante la adición de agua y de azúcares de miel y/o jarabes, y/o edulcorantes o una mezcla de estos, conservados por medios físicos exclusivamente. Podrá permitirse la adición de aromatizante y células (13).

Una declaración de “ácido ascórbico” como ingrediente, cuando se emplee como antioxidante, no constituye de por sí una declaración de “vitamina C” (13).

Dentro de la industria de bebidas no alcohólicas, en México el segmento de jugos y néctares de fruta es uno de los más dinámicos y ha demostrado ser una atractiva opción, siendo los sabores de naranja, manzana y mango las de mayor demanda, con presentaciones en tetrapack de 200 mL y un litro, en botellas de vidrio de 250 mL, lata de 340 mL y pet de medio litro.

En la Figura 10 se muestra el ascenso que han tenido los jugos y néctares en México en el periodo 1995-2001 INEGI (14).

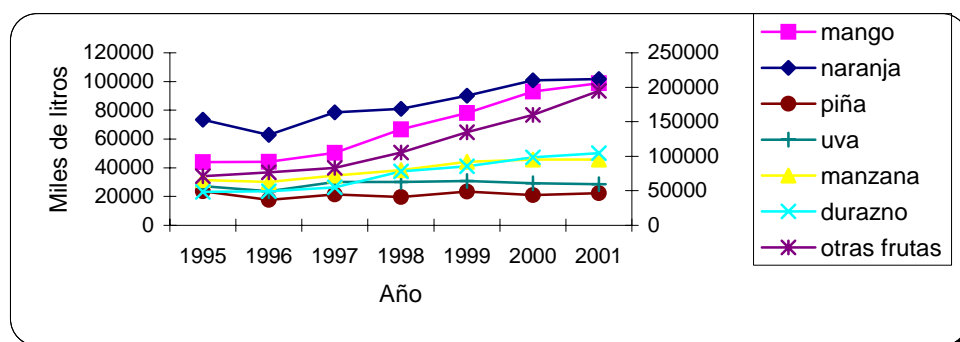


Figura 10. Representación grafica del volumen de jugos y néctares vendidos en el periodo 1995-2001.

En este trabajo se propone utilizar la técnica FIA con detección espectrofotométrica para la determinación del ácido ascórbico en jugos y néctares ya que se muestra como una técnica sencilla, rápida y eficiente. El FIA se ha aplicado a diferentes tipos de muestras como es la determinación de nitratos y nitritos en aguas (15), de pesticidas (16) o glucosa en jugos (17), entre otros. Es una técnica que no es tan laboriosa y alcanza precisiones por debajo del 1 % favoreciendo su aplicación en diferentes procesos analíticos y favoreciendo la automatización para mejorar los sistemas de control de calidad de los laboratorios de rutina o de procesos.

## CAPÍTULO III

### DESARROLLO EXPERIMENTAL

#### **3.1.1 Reactivos**

Todos los reactivos utilizados fueron grado analítico

- Ácido ascórbico ( $C_6H_8O_6$ ). 99.9% de Sigm.a
- 1,10-fenantrolina monohidratada ( $C_{12}H_8N_2 \cdot H_2O$ ). 99% de Sigma.
- Cloruro férrico hexahidratado ( $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ ). 99% de J.T. Baker.
- Ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) 98.2% de J.T. Baker.

#### **3.1.1.2 Equipo e Instrumental**

- Tubos de bomba de Tygon, Technicon, Francia
- Bomba peristáltica de cuatro canales Gilson Minipuls 2, Francia
- Válvula de inyección de seis pasos, Rheodyne
- Reactores de teflón de 0.8 mm d.i de diferente longitud
- Espectrofotómetro UV-VIS Varian modelo Cary 1, Australia, acoplado a una computadora.
- Celda de flujo de cuarzo con 18.0  $\mu$ L de volumen interno, Hellma
- Celda de plástico
- Papel filtro 47 mm
- Pipetas volumétricas
- Baño de ultrasonido, Branson Model 251 OR-Mi, USA
- Balanza analítica con precisión  $\pm 0.1$  mg, Ohaus, USA

### 3.1.1.3 Disoluciones y muestras

#### *Disoluciones*

##### Ácido ascórbico

Se pesaron aproximadamente 0.1g de ácido ascórbico y se disolvieron con agua destilada hasta un aforo de 100 mL. Se tomaron las alícuotas correspondientes para la realización de los estándares de concentración de la curva patrón.

La disolución debe prepararse cada vez que se trabaje con ella.

##### Cloruro férrico hexahidratado (0.01 M)

Se pesó aproximadamente 0.6757g de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  y se disolvieron en una disolución ácida de 0.05 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  hasta un aforo de 250 mL. Esta disolución se debe guardar en refrigeración.

##### 1,10 - fenantrolina (0.25 %)

Se pesó aproximadamente 0.6250 g de 1,10 - fenantrolina y se disolvieron en una disolución de ácido sulfúrico 0.05 M hasta un aforo de 250 mL.

#### *Muestras*

##### Jugos y Néctares

Se tomo 1 mL de muestra y se pesó, llevando, al aforo correspondiente con ácido cítrico 0.5 % para estabilizarlas (18). En el caso de los néctares se dejó sedimentar antes de hacer la cuantificación. Para las pruebas de fortificación se realizaron dos adiciones a cada una de las muestras (1 y 10 mg/L).

## METODOLOGÍA

### 3.1.2 Fundamento de la reacción

La metodología propuesta en este trabajo para la cuantificación de ácido ascórbico en jugos y néctares, se basa en la reducción de  $\text{Fe}^{3+}$  en presencia de la 1,10 - fenantrolina para formar rápidamente el complejo estable  $\text{Fe}^{2+}$ - fenantrolina en medio ácido, que se mide a 510 nm.

La estequiometría de la reacción es 1:2 ácido ascórbico:  $\text{Fe}^{3+}$

La reacción general es:



#### Espectro de absorción

Se determinó el máximo de absorción del complejo formado  $\text{Fe}^{2+}$  - fenantrolina, a partir de una disolución de 40 mg/L de ácido ascórbico. Con una celda de plástico se realizó la determinación, y se consideró un intervalo entre 450 y 750 nm.

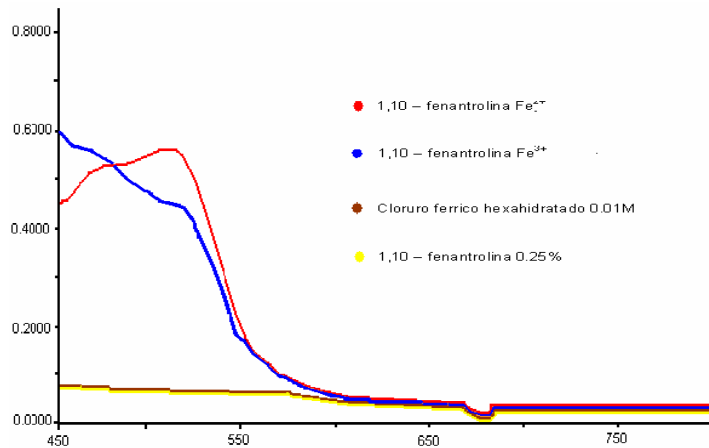


Figura 11. Espectro de absorción del complejo formado así como de los reactivos utilizados en esta determinación.

El complejo formado de Fe<sup>2+</sup> - fenantrolina presentó un máximo de absorción a 510 nm por lo que se eligió esta longitud de onda para cuantificar al ácido ascórbico y optimizar los parámetros químicos e hidrodinámicos del sistema FIA.

### Configuración

En la configuración propuesta se inyectan 146 µL de muestra, a través de la válvula de inyección (VI), en un portador de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O. El ácido ascórbico reduce el Fe<sup>3+</sup> del portador a Fe<sup>2+</sup> para confluir posteriormente con la 1,10 - fenantrolina donde se lleva a cabo la formación del complejo Fe<sup>2+</sup> - fenantrolina, a lo largo del reactor. Finalmente el producto de la reacción pasa a través de la celda de flujo que se localiza en un espectrofotómetro UV-VIS donde se mide a 510nm (Fig. 12).

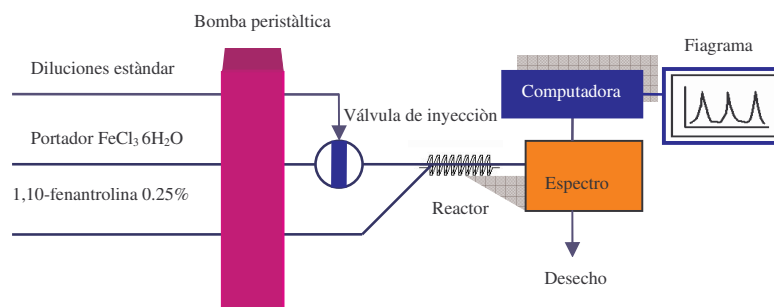


Figura 12. Configuración FIA utilizada para determinar ácido ascórbico.

### 3.1.3 Optimización de los parámetros hidrodinámicos

En el análisis por inyección en flujo, las muestras que se analizan se inyectan dentro de una corriente de flujo. La señal analítica obtenida está determinada por la dispersión del bolo de muestra dentro del sistema por lo que hay que optimizar: el caudal, el volumen de inyección y la longitud del reactor, los cuales están considerados como parámetros hidrodinámicos esenciales en un sistema de flujo continuo.

La señal obtenida es un pico cuya altura máxima es proporcional a la concentración del ácido ascórbico. Para elegir las mejores condiciones de análisis se eligió la señal que diera un pico más alto y que su forma fuera gaussiana.

#### *Caudal*

Considerado como la velocidad de flujo la cual nos proporciona el número de muestras que serán determinadas dentro del sistema en un determinado tiempo. Se estudio un intervalo entre 0.8 y 3.2 mL/min.

#### *Reactor*

La longitud de éste va a proporcionar el tiempo que se necesita para que la reacción se lleve a cabo y para que posteriormente el producto de la reacción sea medido en el detector (espectrofotómetro). Se estudio un intervalo entre 30 y 200 cm.

#### *Volumen de inyección*

Es el volumen de la muestra ( $\mu\text{L}$ ), introducido en el flujo del portador, mediante un sistema de inyección (válvula de inyección), el cual permite que la operación tenga una gran reproducibilidad de operación sin interrumpir el flujo. Se estudio un intervalo entre 100 y 200  $\mu\text{L}$ .

### 3.1.4 Optimización de parámetros químicos

La optimización en la concentración de los reactivos depende de la estequiometría de la reacción.

Las concentraciones de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  y 1,10 - fenantrolina se estudiaron de acuerdo a lo reportado en la bibliografía (19-21,23).

### 3.1.5 Metodología para establecer los límites de confianza de la ecuación de regresión (22)

La capacidad de las técnicas de análisis instrumental para manejar un intervalo amplio de concentraciones de analito significa que se calculan los resultados, y se evalúan los errores aleatorios de una manera concreta, que difiere de la que se utiliza cuando se repite una sola medición varias veces.

Buscando la mejor línea recta que minimice las desviaciones en dirección  $y$ , entre los puntos de la gráfica de calibración, y en donde cada una de estos puntos esta sujeto a un error experimentales conocida como recta de regresión de  $y$  sobre  $x$ .

Donde 
$$a = \bar{y} - b\bar{x} \quad (1)$$

que nos indica como varia  $y$  cuando  $x$  se ajusta a los valores. Es de importancia mencionar que la recta de regresión de  $x$  sobre  $y$  no es la misma recta, esta recta de  $x$  sobre  $y$  supone que todos los errores ocurren en la dirección  $x$ .

Si la señal analítica se representa siempre sobre el eje  $y$  y la concentración sobre el eje  $x$ , se debe usar siempre la recta de regresión de  $y$  sobre  $x$  en los experimentos de calibración.

La ecuación de la recta se utilizará para estimar la concentración de las muestras problema por interpolación.



Los errores aleatorios en los valores de la pendiente y de la ordenada en el origen se calculan de acuerdo a las siguientes ecuaciones. En primer lugar se calcula el dato estadístico  $S_{y/x}$  dado por:

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

Esta ecuación utiliza los residuos de  $y$ ,  $y_i - \hat{y}$  donde los valores de  $\hat{y}$  son los puntos sobre la recta de regresión calculada, correspondientes a los valores individuales de  $x$ , o sea a los valores de  $y$  ajustados. La forma de la ecuación difiere en que las desviaciones  $(y_i - \hat{y})$  son sustituidas por los residuos  $(y_i - \hat{y})$  y el denominador contiene el término  $(n-2)$  en lugar de  $(n-1)$ .

Una vez obtenido el valor de  $S_{y/x}$  se puede calcular  $S_b$  y  $S_a$ , las desviaciones estándar para la pendiente (b) y la ordenada al origen (a) están dadas por:

$$S_b = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad (3)$$

$$S_a = S_{y/x} \sqrt{\frac{\sum_i x_i^2}{n \sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad (4)$$

Los valores de  $S_b$  y  $S_a$  se pueden utilizar para estimar los límites de confianza para la pendiente y ordenada al origen. De tal manera los límites de confianza, para la pendiente están dados por  $b \pm t_{s_b}$  donde el valor de  $t$  se obtiene para un nivel de confianza deseado y  $(n-2)$  grados de libertad. De manera similar, los límites de confianza para la ordenada al origen están dados por  $a \pm t_{s_a}$ .

En el cálculo de las concentraciones una vez determinadas la pendiente y la ordenada en el origen de la recta de regresión es fácil calcular un valor de  $x$  correspondiente a cualquier valor de  $y$  medido.

### 3.1.6 Límite de detección y cuantificación

#### *Límite de detección (LD)*

El límite de detección puede ser definido, como la cantidad de concentración de analito que proporciona una señal igual a la señal del blanco  $y_B$ , más tres veces la desviación estándar del blanco  $s_B$

- Límite de detección (LD) =  $y_B + 3s_B$

#### *Límite de cuantificación (LC)*

El límite de cuantificación o límite de decisión es la concentración mínima del analito que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables, bajo las condiciones de operación establecidas.

- Límite de cuantificación (LC) =  $y_B + 10s_B$

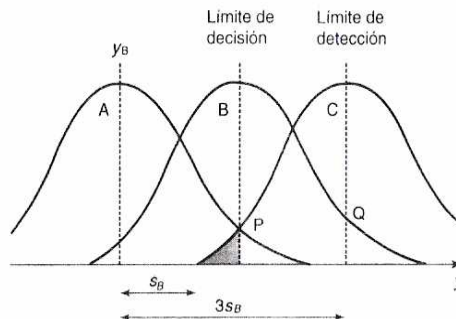


Figura 13. Definiciones del límite de detección y límite de cuantificación (decisión).

### 3.1.7 Precisión

La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una muestra homogénea del producto. Usualmente se expresa en términos de desviación estándar relativa o del coeficiente de variación. Es un ejemplo de error relativo.

$$\% \text{ der} = \sigma / \bar{x} * 100$$

$\sigma$  = desviación estándar

$\bar{x}$  = media

## CAPÍTULO IV

### **4.1 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

A partir de la configuración FIA propuesta en la Figura 8 se inició la optimización de los parámetros para la cuantificación de ácido ascórbico.

#### **4.1.1 Optimización de los parámetros hidrodinámicos**

##### *4.1.1.1 Caudal a 3.2 mL/min*

Inicialmente se consideró un caudal de 3.2 mL/min en la determinación de ácido ascórbico y las siguientes condiciones: volumen de inyección 100 $\mu$ L, longitud del reactor 50 cm de acuerdo a lo reportado por Salah M. y colaboradores (23) y para las condiciones químicas H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.05 M, FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O 0.01 M, 1,10 - fenantrolina 0.25 % (19-21,23).

Se hizo una curva de calibración en el intervalo de 40 a 1000 mg/L.

Se observó que la curva pierde linealidad entre 355 y 1000 mg/L. En el intervalo entre 40 y 355 mg/L se obtiene la ecuación de la recta  $y = 0.00187x - 0.0084$  con un coeficiente de correlación de 0.9998.

En el figura 14 se observa el fiagrama obtenido con los estándares de concentraciones de 40 a 355 mg/L a un caudal de 3.2 mL/min.

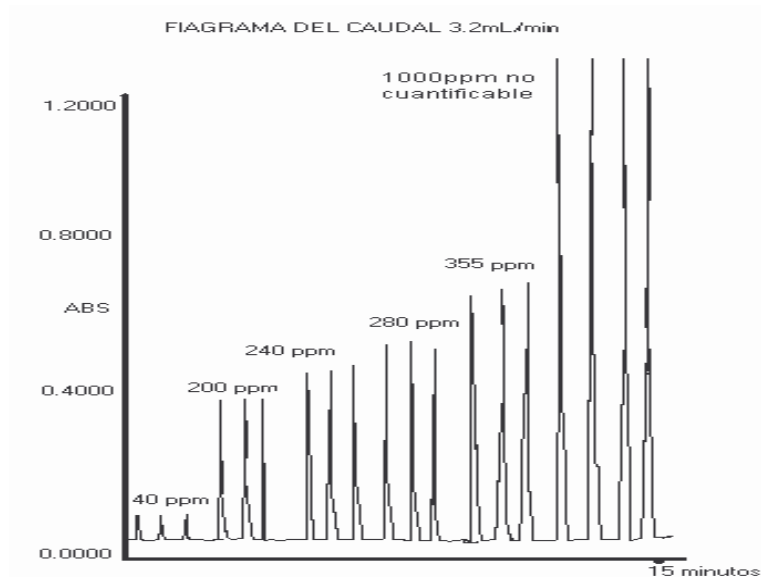


Figura 14. Diagrama a un caudal de 3.2 mL/min.

Las concentraciones empleadas para este caudal fueron estándares de concentraciones elevadas (de 40 mg/L a 355 mg/L), al emplear concentraciones menores a estas, la señal no pudo ser observada. Debido al insuficiente tiempo de reacción, por lo que, los estándares sufren una dilución muy grande.

Cuando se trabaja a caudales elevados es importante considerar las desventajas que se tienen, ya que en estos flujos la presión se incrementa dando lugar a fugas en el sistema, provocando la aparición de burbujas, así como un mayor gasto de reactivos.

Para el análisis de jugos y néctares el intervalo de concentración que se estimó fue como máximo de 60 mg tomando en cuenta que en adultos sanos es la cantidad recomendada como ingesta diaria de ácido ascórbico (7). Por lo que esta curva de calibración, representada en el diagrama de la Figura 14 no sería adecuada en el análisis de estas muestras.

Con este fin, se estudiaron caudales más bajos para poder cuantificar concentraciones más pequeñas.

#### 4.1.1.2 Estudio de la optimización del caudal

Se probaron los siguientes caudales 0.8, 1.1 y 1.3 mL/min, inyectando por triplicado un estándar de concentración de 100 mg/L de ácido ascórbico.

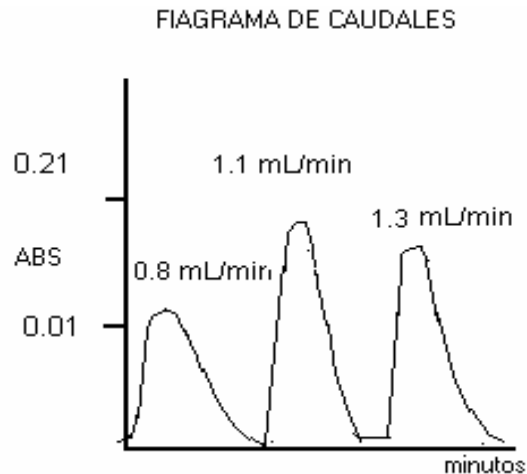


Figura 15. Señales obtenidas para una concentración de 100 mg/L de ácido ascórbico a 0.8, 1.1 y 1.3 mL/min.

Para elegir el caudal óptimo fue necesario tomar un compromiso entre el tiempo de análisis y de reacción con la señal obtenida. En este caso a menor caudal la dispersión supera a la reacción, obteniéndose un pico muy ancho; a un caudal de 1.3 mL/min la forma del pico es mejor pero la señal es baja ya que no hay suficiente tiempo de reacción aunque disminuya en gran medida la dispersión. Como puede observarse en la Figura 15 el caudal óptimo es 1.1 mL/min donde la señal es más alta y existe una relación señal/dispersión adecuada.

A partir de este caudal se optimizó el volumen de inyección y la longitud del reactor.

#### 4.1.1.3 Longitud del reactor

Partiendo de una disolución de 10 mg/L, se realizó el estudio para cada longitud de reactor. Se estudiaron tres longitudes: 30, 100 y 200 cm.

En la Figura 16 se muestra la diferencia en las señales para cada reactor estudiado.

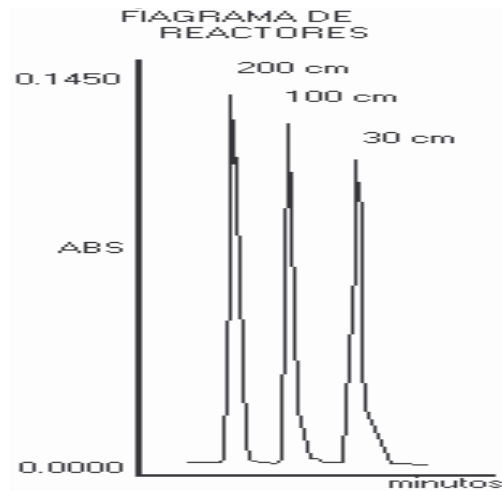


Figura 16. Señales obtenidas para cada longitud de reactor a un caudal de 1.1mL/min.

En el fiagrama obtenido se observa que el que presenta mejor señal es el reactor de 200 cm por lo que se eligió como óptimo.

#### 4.1.1.4 Volumen de inyección

A un volumen de 146  $\mu\text{L}$  se obtuvo una señal de un solo pico, angosto y alto. A volúmenes menores del óptimo la señal es menor, el tiempo de residencia es pequeño pero la dispersión mayor. A volúmenes mayores del establecido, se presenta una señal con meseta y dobleteada y hay un aumento en el ancho de la misma, por lo que al aumentar el volumen de inyección no se logra un mezclado adecuado ya que el volumen inyectado es muy grande provocando que el bolo se divida.

El intervalo estudiado y el valor óptimo para cada parámetro se resumen en la Tabla 2.

<b>Parámetros hidrodinámicos</b>	<b>Intervalo estudiado</b>	<b>Valor óptimo</b>
Caudal	0.8 -3.2 mL/min	1.1 mL/min
Volumen de inyección	100-200 $\mu$ L	146 $\mu$ L
Reactor	30-200 cm	200 cm

Tabla 2. Optimización de parámetros hidrodinámicos en el sistema FIA.

#### 4.1.2 Optimización de los parámetros químicos

La concentración de los reactivos se determinó de acuerdo con lo reportado con anterioridad (19-21,23). Se estudiaron concentraciones mayores y menores a las reportadas siendo las reportadas las óptimas. En la Tabla 3 se muestran los valores.

<b>Reactivos</b>	<b>Concentración</b>
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.05 M
FeCl <sub>3</sub> . 6H <sub>2</sub> O	0.01 M
1,10 - fenantrolina	0.25 %

Tabla 3. Parámetros químicos, (concentración de reactivos).

#### 4.1.3 Evaluación del intervalo lineal para la determinación de ácido ascórbico

Se prepararon diferentes disoluciones con concentraciones de ácido ascórbico en un intervalo entre 2 y 400 mg/L y se inyectaron por triplicado en la configuración de flujo continuo. El fiagrama obtenido se muestra en la Figura 17 y la curva de calibración en la gráfica de la Figura 18.



## FIAGRAMA

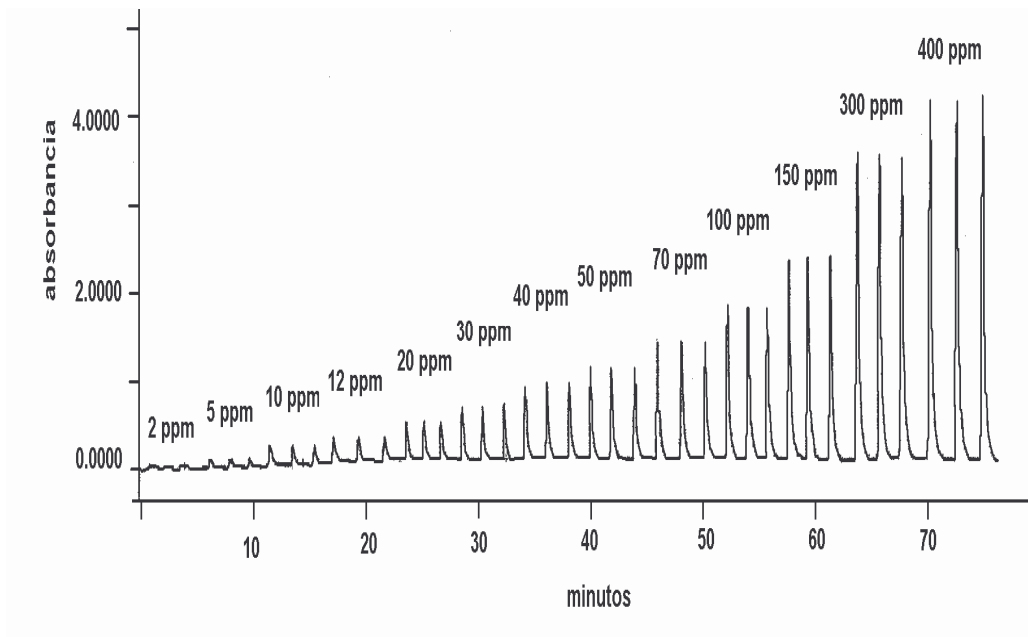


Figura 17. Diagrama obtenido de los estándares de ácido ascórbico 2 – 400 mg/L.

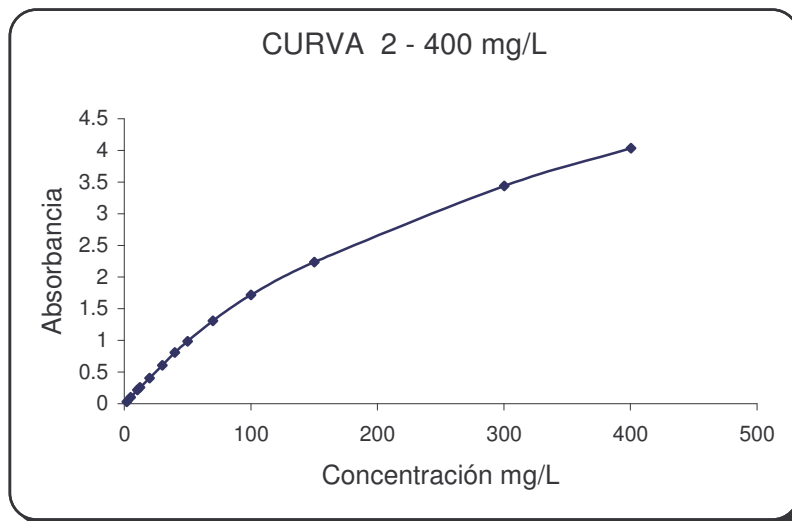


Figura 18. Curva de calibración realizada con concentraciones de 2 – 400 mg/L de ácido ascórbico.

En la gráfica de la Figura 18 se observa que al aumentar la concentración de ácido ascórbico la curva comienza a desviarse de la linealidad. Las desviaciones son el resultado del efecto de la concentración debido a los equilibrios disociación

– asociación ya que su posición depende de las concentraciones de las especies participantes. En el intervalo de concentraciones bajas la disociación es completa, mientras más alta sea la concentración menor será el grado de disociación.

Esto es por lo que de las concentraciones trabajadas en la determinación de ácido ascórbico, se propusieron dos intervalos de linealidad, y se determinó la sensibilidad en cada uno.

Las características de cada intervalo se presentan en la tabla 4.

Intervalo mg/L	Pendiente	Ordenada al origen	r
2 – 50	0.0199	0.0030	0.9996
100 – 400	0.0077	1.0257	0.9962

Tabla 4. Ecuaciones de cada intervalo lineal encontrado en la determinación de ácido ascórbico.

El aumento o disminución de las concentraciones, fuera de los intervalos lineales establecidos, le resta sensibilidad a la curva, lo cual se ve reflejado en el coeficiente de correlación y la pendiente

Las gráficas de las Figuras 19 y 20 muestran la representación gráfica de las curvas de calibración obtenidas.

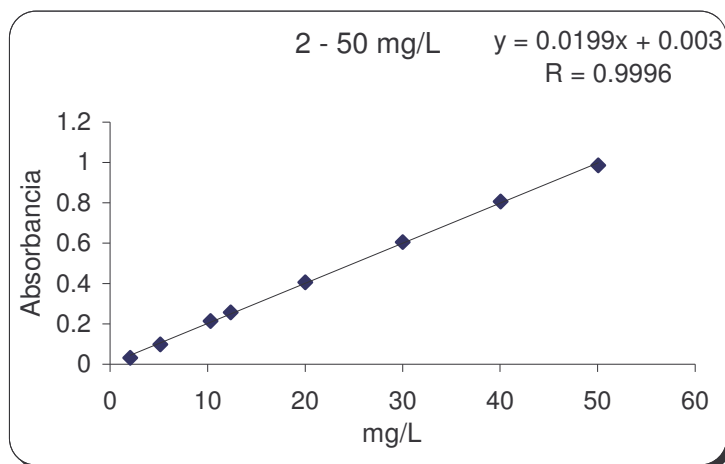


Figura 19. Curva de calibración de ácido ascórbico 2 – 50 mg/L.

La curva cuyo intervalo es de 2 a 50 mg/L tiene mayor sensibilidad que la curva de 100 a 400 mg/L como se observa en la pendiente

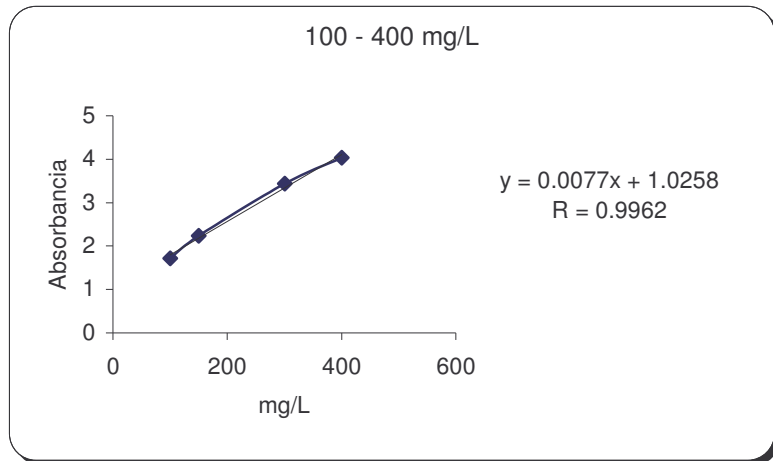


Figura 20. Curva de ácido ascórbico 100 – 400 mg/L.

En la curva entre 100 y 400 mg/L, la ordenada al origen va aumentando conforme aumentan las concentraciones, la pendiente va disminuyendo de igual forma que el coeficiente de correlación. A mayores concentraciones la pendiente disminuye lo que provoca un aumento en la ordenada al origen y hace que esta curva sea poco sensible.

Por lo tanto para la cuantificación de ácido ascórbico en jugos y néctares se eligió la curva con mayor sensibilidad representada por la gráfica de la Figura 19, además de que en este intervalo se espera encontrar la concentración de ácido ascórbico presente en jugos y néctares.

#### 4.1.4 Determinación del límite de detección (L.D.) y límite de cuantificación (LC)

A continuación en la Tabla 5 se describen los datos utilizados para calcular la desviación estándar y los límites de confianza para la pendiente y la ordenada en el origen de la recta de regresión.

$x_i$	$x_i^2$	$x_i - \hat{x}$	$(x_i - \hat{x})^2$	$y_i$	$y_c$	$y_i - y_c$	$(y_i - y_c)^2$
2.06	4.2436	-19.19125	368.304077	0.0318	0.04402134	-	0.00014936
5.15	26.5225	-16.10125	259.250252	0.0987	0.10552003	-	4.6513E-05
10.3	106.09	-10.95125	119.929877	0.2147	0.20801786	0.00668214	4.4651E-05
12.36	152.7696	-8.89125	79.0543266	0.2574	0.24901698	0.00838302	7.0275E-05
20.02	400.8004	-1.23125	1.51597656	0.4061	0.40147006	0.00462994	2.1436E-05
30.03	901.8009	8.77875	77.0664516	0.6056	0.60069399	0.00490601	2.4069E-05
40.04	1603.2016	18.78875	353.017127	0.8073	0.79991791	0.00738209	5.4495E-05
50.05	2505.0025	28.79875	829.368002	0.9862	0.99914184	-	0.00016749
$\Sigma =$	170.0	5700.4311	0	2087.50609			0.00057829

Tabla 5. Datos obtenidos para la determinación del límite de detección y cuantificación del ácido ascórbico con  $n = 8$ , donde  $y_c = y$  calculada

A partir de la Tabla 5 y haciendo uso de la Ecuación 2 (pag. 28) se calcula el dato estadístico  $S_{y/x}$

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{0.00057829}{6}} = 0.00981743$$

$$S_{y/x} = 0.00981743$$

De la Ecuación 3 y 4 (sección 3.1.5) se calculan  $S_b$  y  $S_a$ , las desviaciones estándar para la pendiente (b) y la ordenada al origen (a) respectivamente.

$$S_b = \frac{0.00981743}{\sqrt{2087.50609}} = 0.000214874$$

$$S_b = 0.000214874$$

Para  $S_a$

$$S_a = 0.00981743 \left( \sqrt{\frac{57000.4311}{8(2087.50609)}} \right) = 0.005735784$$

$$S_a = 0.0005735784$$

Como anteriormente se había mencionado (sección 3.1.5), los límites de confianza para la pendiente están dados por  $b \pm tS_b$  donde el valor de t se obtiene para un nivel de confianza deseado y (n-2) grados de libertad. De igual manera, los límites de confianza para la ordenada al origen están dados por  $a \pm tS_a$ .

Entonces tenemos que, el valor calculado de t se compara tabulando al nivel de significación, usando una prueba t de dos colas y (n-2) = 6 grados de libertad y un nivel de confianza del 95 % siendo t = 2.45.

$$\text{dest pendiente} = 2.45 (S_b) = 0.000526441$$

$$\text{dest ordenada} = 2.45 (S_a) = 0.014052671$$

Teniendo la ecuación de la recta del sistema, de la siguiente forma.

$$**y = 0.0199 (\pm 0.0005)x + 0.003 (\pm 0.014)**$$

Conociendo la ordenada al origen y la pendiente de la curva, así como de sus intervalos de confianza ( $S_a$  y  $S_B$ ), y el estadístico  $S_{y/x}$  se puede calcular el límite de detección y de cuantificación.

Para el cálculo del límite de detección o concentración mínima del analito que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, se utilizó la siguiente ecuación:

$$y = y_B + 3S_B$$

Donde

$$y_B = a$$

$$S_B = S_{y/x}$$

$y$  = absorbancia

$$y = 0.003022207 + 0.02945229 = 0.0324744$$

El resultado (0.0324744), se interpola en la ecuación de la recta de la curva de calibración obteniéndose así la concentración del límite de detección.

$$y = 0.0199x + 0.0030$$

$$x = \frac{0.0324 - 0.0030}{0.0199} = 1.48 \text{ mg / L}$$

En el límite de cuantificación se calcula la concentración mínima del analito, que puede ser determinada con precisión y exactitud, utilizando la siguiente fórmula:

$$y = y_B + 10S_B$$

Donde

$$y_B = a$$

$$S_B = S_{y/x}$$

y = absorbancia

$$y = 0.003022207 + 0.0981743 = 0.1011965$$

0.1011965 es interpolado en la ecuación de la curva de calibración obteniendo:

$$x = \frac{0.1011 - 0.0030}{0.0199} = 4.93 \text{ mg/L}$$

El límite de detección y cuantificación del sistema FIA propuesto para la determinación de ácido ascórbico en jugos y néctares de fruta son:

**L.D. = 1.48 mg/L**

**L.C. = 4.93 mg/L**

#### 4.1.5 Precisión del método

La precisión del método, es expresada como la desviación estándar relativa (der), que a partir de una concentración conocida de ácido ascórbico, distinta a las concentraciones empleadas en la curva de calibración, fue inyectada en 7 ocasiones en el sistema de flujo continuo. La absorbancia de cada inyección se interpola en la ecuación de la curva de calibración, calculándose así la concentración de cada absorbancia. Se calculó la desviación estándar y el promedio de las concentraciones obtenidas. Una vez obtenidos los resultados se dividieron y multiplicaron por 100, dando como resultado la precisión del método expresada como % der .

$$X = 11.1852 \text{ mg/L}$$

$$\sigma = 0.1511$$

$$\%der = \left( \frac{0.1511}{11.1852} \right) 100 = 1.35$$

#### 4.1.6 Análisis de muestras

Con el método FIA propuesto se analizaron 5 jugos y 3 néctares de fruta de diferente marca comercial, para la cuantificación de ácido ascórbico de cada uno de ellos.

La presentación tetrapack se consideró apropiada para el análisis, ya que evita el contacto de la luz solar y la de los anaqueles (durante su exposición), con los jugos y por ser más práctica que la presentación en lata. Por lo consiguiente, las pérdidas del ácido ascórbico son menores a las que se pueden presentar el envase de vidrio y/o plástico.

Los jugos analizados fueron:  
Naranja, Manzana y Uva

Para el análisis de néctares se utilizaron:  
Guayaba, Durazno y Manzana

En el caso de los jugos, la intensidad del color que presenta el de uva podría interferir con la señal del complejo  $\text{Fe}^{2+}$ -fenantrolina en la cuantificación del ácido ascórbico. Para verificar que esto no ocurría se corrió el espectro de absorción del jugo de 400-600 nm.

La disolución del jugo de uva (dilución 1:10) se preparó de igual forma que los néctares y jugos restantes listos para ser inyectados en la configuración FIA propuesta.



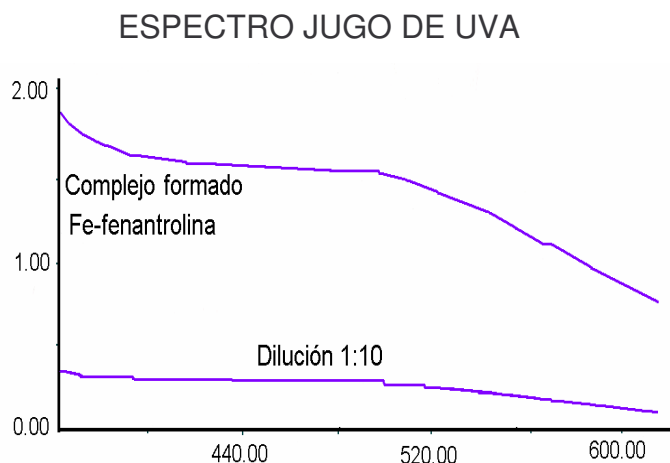


Figura 21. Espectro de la dilución 1:10 del jugo de uva, el complejo formado y jugo de uva solo para descartar posibles interferencias al color.

En el espectro se observa que el color del jugo de uva no interfiere en la señal del complejo  $\text{Fe}^{2+}$ -fenantrolina.

Los néctares Inicialmente fueron filtrados con papel filtro, sin embargo la señal de la muestra filtrada no presentó diferencia significativa con respecto a la señal de la muestra que solo se dejó sedimentar, por lo que se decidió que el néctar solo se dejara sedimentar, abrirlo e inmediatamente después tomar la muestra, solo de la parte superior del jugo sedimentado, ahorrándose así el tiempo que dura la filtración.

Para asegurar la ausencia de cualquier tipo de interferencias en la determinación de ácido ascórbico, en el sistema FIA desarrollado, dos concentraciones de ácido ascórbico fueron adicionadas a los jugos de fruta y néctares seleccionados, determinando su porcentaje en recuperación en ambos casos.

Se tomó una alícuota de 1 ml de jugo ó néctar por separado llevándose a un aforo 10 mL.

Los resultados se obtuvieron a partir de 5 inyecciones para cada uno de los jugos y néctares y sus respectivas adiciones (1 y 10 mg/mL).

En la Figura 22 se observa un ejemplo de la señal obtenida por ácido ascórbico a partir de una muestra de jugo y sus respectivas fortificaciones con diluciones estándar de 1 y 10 mg/L de ácido ascórbico.

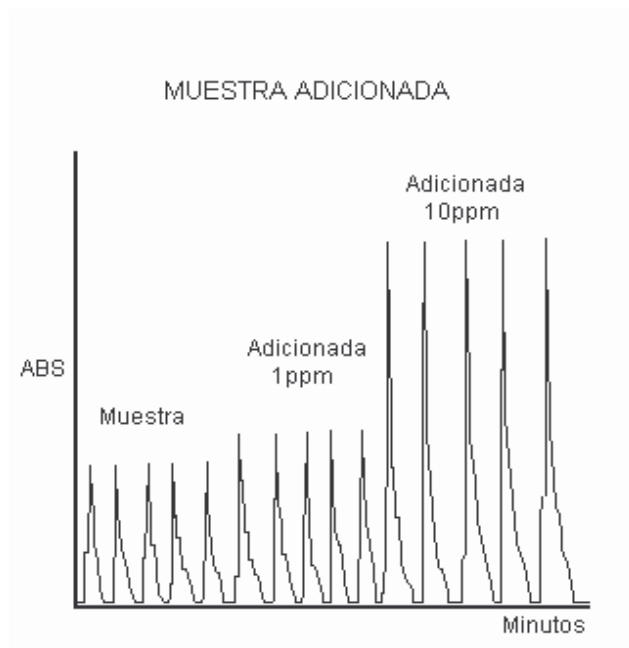


Figura 22. Representación del diagrama con adiciones de las muestras.

En el diagrama de la figura 22, se puede observar que el incremento de la señal es proporcional a la concentración adicionada de ácido ascórbico.

En las Tablas 6 y 7 se muestran los resultados obtenidos de las concentraciones de las muestras y sus respectivas fortificaciones.

Muestras comerciales	[Ácido ascórbico] (g / 100 g jugo)	% Recuperación	
		1 mg/L	100 mg/L
Jugo de naranja (Herdez)	37.27	100.70	96.69
Jugo de naranja (Jumex)	49.255	101.68	96.70
Jugo de manzana (Jumex)	2.23	85.29	71.05
Jugo de uva (Jumex)	4.84	99.67	100.60
Jugo de uva (Herdez)	8.135	97	96.83

Tabla 6. Concentración detectada de ácido ascórbico en jugos, y el porcentaje de recuperación en las adiciones.

Muestras comerciales	[Ácido ascórbico] (g / 100 g jugo)	% Recuperación	
		1 mg/L	100 mg/L
Néctar de manzana (Herdez)	3.525	86.07	73.23
Néctar de guayaba (Sonrisa)	29.625	99.33	96.20
Néctar de durazno (Florida 7)	6.46	96.51	96.36

Tabla 7. Concentración detectada de ácido ascórbico en néctares, y su porcentaje de recuperación en las adiciones.

De las tablas se puede observar que los jugos de uva y naranja, de las dos diferentes marcas comerciales (Tabla 6), así como de los néctares de guayaba y durazno (Tabla7), tienen recuperaciones del 96.20% hasta el 101.68%, resultados que se muestran como satisfactorios en la configuración FIA, mismos que indican la ausencia de posibles interferencias que pueden presentarse en la cuantificación de ácido ascórbico en jugos y néctares.

Sin embargo tanto en el jugo como en el néctar de manzana el porcentaje de recuperación es muy inferior comparado con los obtenidos de las otras frutas, probablemente se deba a las interferencias que este tipo jugos puede presentar ya que según Varman (4) el ácido ascórbico disminuye por la oxidación asociada a los polifenoles vía polifenol oxidasa, no obstante, la cantidad de los polifenoles presentes en los jugos se pueden eliminar por adición de polivinilpirrolidona (24) o bien por adición de gelatina sola o combinada (25), evitando así la oxidación del ácido ascórbico por esta vía.

En el caso de la gelatina solo es utilizable en bebidas ricas en taninos como jugo de manzana (26).

Considerando que la determinación de ácido ascórbico por el sistema de flujo continuo propuesto, se basa en una reducción. La interferencia de polifenoles advierte posiblemente que los reductores presentes en el jugo y néctar de manzana, pueden ser causa de interferencias, ya que pueden competir con el

ácido ascórbico en la reducción del  $\text{Fe}^{3+}$  para formar el complejo estable  $\text{Fe}^{2+}$ -fenantrolina, o actuar de manera similar a los polifenoles, por oxidación asociada. Estos reductores pueden ser: el dióxido de azufre y azúcares reductores.

Anteriormente se hizo mención de los taninos y su posible eliminación del jugo de manzana.

En el caso del dióxido de azufre, su interferencia puede eliminarse con la adición de acetona (27). Y de acuerdo a los resultados reportados en las Tablas 6 y 7 los azúcares reductores no se visualizan como posible interferencia ya que todos los jugos y néctares analizados la contienen siendo solo el jugo y néctar de manzana el afectado, con este respecto se ha reportado que no existen interferencias debidas a los azúcares reductores (23,28,29).

Sin embargo cuantificar tales sustancias reductoras, nos proporcionará los resultados que indiquen como influyen en la cuantificación del ácido ascórbico, por el sistema de flujo continuo propuesto, en el jugo y néctar de manzana.

El estudio a fondo de estas posibles interferencias constituiría un objetivo a resolver en una investigación posterior.

A continuación en la Tabla 8, se muestran las características existentes entre el método analítico propuesto y dos diferentes métodos utilizados para cuantificar ácido ascórbico.

	<b>FIA</b>	<b>2,6- diclorofenolindofenol</b>	<b>HPLC (30)</b>
Reacción	$\text{H}_2\text{A} + 2[\text{Fe}(\text{fenantrolina})_3]^{3+} \rightleftharpoons [\text{Fe}(\text{fenantrolina})_3]^{2+} + \text{A}^{2-} + 2\text{H}^+$	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6 + \text{C}_{12}\text{H}_7\text{O}_2\text{Cl}_2\text{N} \rightleftharpoons \text{C}_6\text{H}_6\text{O}_6 + \text{C}_{12}\text{H}_9\text{O}_2\text{Cl}_2\text{N}$	Afinidad del analito con las moléculas de la fase estacionaria
Reactivos	1,10-fenantrolina monohidratada FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ác. cítrico	2,6-diclorofenolindofenol ác metafosfórico ác. acetico NaHCO <sub>3</sub> Azul de timol	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> EDTA
Detección	510 nm	Visual	245 nm
Equipo	UV-VIS	Material de vidrio	Cromatógrafo de líquidos
Tiempo de análisis 1 muestra	1.6 min.	≥5 min.	15 min
Costo del equipo*	7000	40.60	150,000

Tabla 8. Características del método FIA propuesto, del método visual oficial y la determinación por HPLC, utilizados en la cuantificación de ácido ascórbico en jugos de fruta

\*dolares

En el sistema FIA, el análisis de las muestras es en menor tiempo, comparado con los metodos del 2,6-diclorofenolindofenol y HPLC, el uso del material de vidrio se reduce así como la cantidad de reactivos.

En la titulación, del 2,6-diclorofenolindofenol, el cambio de color puede ser inexacto y limitado, debido al color que presentan algunas muestras y que interfieren en la visualización del punto final. En FIA las muestras coloridas pueden analizarse, como en el caso de jugo de uva.

Aunque se presenta como el método más barato (método oficial), el número de muestras que se pueden analizar es inferior al del sistema FIA, además de que a determinado número de muestras el análisis resulta ser tedioso, lo que probablemente seria un factor de error en los resultados

En FIA no se requiere de un tratamiento de muestras muy elaborado como en el caso de la cromatografía que es mucho más costoso

## 4.2 CONCLUSIONES

- La optimización de las condiciones químicas e hidrodinámicas en la configuración FIA son fundamentales para la automatización del sistema.
- El intervalo lineal propuesto a concentraciones bajas presentan una mayor sensibilidad que a altas concentraciones
- El caudal de 1.1 mL/min se encuentra como óptimo en la determinación de ácido ascórbico en jugos y néctares. Utilizando la misma configuración para un caudal de 3.2 mL/min, es posible determinar concentraciones más elevadas de ácido ascórbico por lo que sería posible utilizarla en otro tipo de muestras (por ejemplo en preparaciones farmacéuticas).
- Con esta metodología la frecuencia de muestreo es de 12 muestras con tres repeticiones cada una en 60 min, es decir 36 determinaciones por hora, por lo que la técnica FIA hace más eficiente la determinación del analito (ácido ascórbico) aumentando el número de determinaciones en un menor intervalo de tiempo.
- El método propuesto para la determinación de ácido ascórbico, es más preciso, rápido y de bajo costo comparado con los otros ya propuestos ya que se disminuye la cantidad de reactivos a utilizar y de material de laboratorio.
- La técnica FIA es eficiente en determinaciones de rutina de un número considerable de muestras, haciendo las determinaciones menos tediosas.

- La determinación de ácido ascórbico en jugos y néctares es posible con la configuración FIA descrita sin ningún tratamiento de las muestras ya que solo requieren de una sola dilución.

#### 4.3 BIBLIOGRAFÍA

1. Luque de Castro M. D., Valcarcel M., Analisis por inyección en flujo. Departamento de Química Analítica, Universidad de Córdoba, Cordoba, España, 1984 Cap I, II y III.
2. The Merck Index Merck & Co., 11<sup>th</sup> ed., USA pág. 130.
3. Feldman E., Principios de nutrición clínica, El manual moderno, D.F. México, 1990 pág. 38.
4. Varman H., Bebidas tecnología química y microbiológica, Acriba, Zaragoza España, 1995 págs. 61,70.
5. Fennema O., Química de los alimentos, Acribia, Zaragoza España, 1993 pág. 676.
6. [www.es.wikipedia.org/wiki/vitamina](http://www.es.wikipedia.org/wiki/vitamina) Marzo 2006.
7. Ingesta diaria recomendada por el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Subirán.
8. Halliwell B., Vitamin C and genomic stability, Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 475, 2001, 29-35.
9. Casanueva E., Kaufer H., Nutrílogía médica, Medica panamericana, México, 1995 pág.362.
10. Devlin T., Bioquímica, Libro de texto con aplicaciones clínicas, Revert, Barcelona, España, 1999, Vol, II pág.1127.



11. AOAC, Official methods of analysis, Vitamins and other nutrients 45, 1995, pág. 16-19.
12. Arya S.P., Mahajan M., Jain P., Non-spectrophotometric methods for the determination of vitamin C, *Analítica Chimica Acta*, 417, 2000, 1-14.
13. Codex Alimentarius, Vol 6, Zumos de fruta y productos afines 2<sup>da</sup> ed 1992.
14. INEGI, Encuesta industrial mensual 1995-2001, Volumen y valor de ventas por producto según clase de actividad (311301).
15. Cabrera Molina Erika, Hernández Garciadiego Lucía, Gómez Ruíz Humberto, Cañizares Macías Ma. del Pilar, Determinación de nitratos y nitritos en agua. Comparación de costos entre un método de flujo continuo y un método estándar, *Rev. Soc. Quím. Méx.*, 47, 2003, 88-92.
16. Fernández-Band B., Linares P., Luque de Castro M.D., Valcárcel M., Flow-through sensor for the direct determination of pesticide mixtures without chromatographic separation, *Anal. Chem.*, 63, 1991, 1672-1675.
17. Ángeles Cañas Adriana Noemí, Cañizares Macías Ma. del Pilar, Desarrollo de un sistema sensor para la cuantificación de glucosa en jugos de frutas, *Rev. Soc. Quím. Méx.*, 48, 2004, 106-110.
18. Andersen C., Morten A., Improved method simultaneous determination of ascorbic acid, isoascorbic acid and dehydroisoascorbic acid in food and biological samples, *Journal of Chromatography B*, 730, 1999, 101-111.
19. Kabasakalis V., Moshatou E., Siopidou D., Ascorbic acid content of commercial fruit juices and its rate of loss upon storage, *Food Chemistry*, 70, 2000, 325-328.

20. Rooney M. L., Vermuë J., Zerdin K., The vitamin C content of orange juice packed in a oxygen scavenger material, *Food Chemistry*, 82, 2003, 387-395.
21. Ackermann G., Koch S., Application of redox reactins in spectrophotometry, *Talanta* 39, 1992, 687-691.
22. Miller J. C., Miller J. N., *Estadística para química analítica*, Ed. Adisson-wesley Iberoamericana 1993, E.U. Wilmington, 1993 cap. IV.
23. Salah M., Sultan, Abdella M., Flow iyection colorimetric method for the assay of vitamin c in drug formulations using tris, 1,10-phenantroline-iron (III) complex as an oxidant in sulfuric acid media, *Talanta*, 41, 1994, 125-130.
24. Multon J., *Aditivos y auxiliares de fabricación en las industrias agroalimentarias*,. Acribia, Zaragoza España, 1992, pág. 496.
25. Belitz H., Grosch W., *Química de los alimentos*, Acribia, Zaragoza España, 1997, pág. 914.
26. Lück E., Jager M., *Conservación química de los alimentos*, Acribia, Zaragoza España, 1995, pág. 486.
27. Pearson D., *Técnicas de laboratorio para el análisis de alimentos*, Acribia, Zaragoza España, 1993, pág. 276.
28. Fatibello O., Vicente A., Spectrophotometric flow injection determination of L-ascorbic acid with a packed reactor containing ferric hidroxide, *Talanta*, 47, 1998, 11-18.

29. Ortega P., Fernández M., Molina A., Indirect determination of ascorbic acid by solid-phase spectrophotometry, *Analytica Chimica Acta*, 360, 1998, 143-152.
30. Samy H., Ashoor, Woodrow C., Liquid chromatographic determination of ascorbic acid in foods, *J. Assoc. Of Anal. Chem. Volm*, 67 No. 1 1984 págs. 78-80