

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

**Desarrollo y Estudio Comparativo de dos
Métodos Analíticos en la Cuantificación de
Ácido Ascórbico como Materia Prima**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**QUÍMICO FARMACÉUTICO
BIÓLOGO**

PRESENTA

Patricia Rios Cortés

Q.F.B Mauro Arrieta Sánchez
Director

M. en F. Idalia L. Flores Gómez
Asesor



México, D.F., Junio de 2011



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.



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.

¡PIU AVANTI!

*No te des por vencido, ni aún vencido,
no te sientas esclavo, ni aún esclavo;
trémulo de pavor, piénsate bravo,
y arremete feroz, ya mal herido.
Ten el tesón del clavo enmohecido
que ya viejo y ruin, vuelve a ser clavo;
no la cobarde estupidez del pavo
que amaina su plumaje al primer ruido.
Procede como Dios que nunca llora;
o como Lucifer, que nunca reza;
o como el robleal, cuya grandeza
necesita del agua, y no la implora...
¡Que muerda y vocifere vengadora,
ya rodando en el polvo tu cabeza!*

Pedro Bonifacio Palacios (Almafuerte)

Agradecimientos

Primeramente agradezco a mi Universidad, la mejor de México y Latinoamérica, la Universidad Nacional Autónoma de México, que desde que fui recibida a formar parte de ella, me he sentido orgullosa. Le agradezco me haya dado la oportunidad de terminar una carrera y adquirir un conocimiento tan valioso.

Estoy profundamente agradecida con mis padres, Fortunato y Celia, que me han apoyado incondicionalmente y sobretodo me han amado. No me alcanzaría la vida para pagarles. Futu y Momo son mi motor, la fuerza que me ayuda a continuar y los amaré toda mi existencia.

Agradezco a mis hermanos, Rogelio, Bertha, Ofelia y Laura Inés, por estar a mi lado siempre que he necesitado de su apoyo y comprensión, espero compensar todo lo que me han dado.

Ollito chan, muchas veces has sido el soporte de la familia, eres mi único hermano y has hecho un gran trabajo como el mayor dándome tu amor y protección.

Bertha, no sabes cómo le agradezco a la vida que seas mi hermana, nos hemos apoyado y también nos han tocado regaños, pero siempre con la intención de mejorar y dar tranquilidad a nuestras almas, gracias por tu confianza y amor.

Fili, tú eres con la que he crecido casi a la par, tal vez por la poca diferencia de edad que hay entre nosotras o porque pensamos similar en algunas ocasiones, gracias por estar a mi lado.

Laurita, mi ángel, espero estés orgullosa de mi allá desde el cielo donde sé que nos cuidas, y aunque fue poco el tiempo que el Universo me dejó compartir contigo, fue el suficiente para amarnos mucho.

A mis cuñados, Rosa Isela Maldonado y Mauricio Solis, gracias por unirse a mi familia y por darme junto con mis hermanos esos maravillosos sobrinos: Karina, Bolita, Ponchito, Camarón y Memicho, son la razón de mi existir. Gracias Rosa por hacer muchas veces que los problemas se me olvidaran con esas enormes jornadas de videojuegos.

A mi director de tesis, QFB Mauro Arrieta Sánchez, ha sido un orgullo ser su alumna durante mi formación académica y más aún por haberme permitido realizar mi proyecto de tesis con su guía y conocimiento, el cual es enorme. Usted ejerce en mi un gran respeto e igualmente un enorme cariño.

M. en F. Idalia Flores Gómez, mi asesora, no tengo palabras para expresarle el profundo agradecimiento que me merece, ya que no sólo encontré a una excelente profesora sino a una gran amiga, que así como me apoyó con lo académico, también me escuchó y brindó su consejo siempre que la vida me hacia un poco de sus maldades.

A todos mis profesores, gracias por brindarme su sabiduría y compartir sus conocimientos conmigo.

A mis hermanos de vida, mis grandes amigos Dolores Hernández, Erika Trujillo y David Hernández, fueron en innumerables ocasiones la fuerza que me ayudó a seguir. El cariño y confianza que me han brindado no lo podré pagar, la FES no hubiera sido lo mismo para mí sin ustedes, los quiero.

Vio, Puchus, Gloria, han sido mis hermanas desde la prepa y les doy mi agradecimiento por no perder el contacto y ese cariño que nos tenemos desde entonces, su gran apoyo, confianza y amor me ha sacado adelante en innumerables ocasiones.

Poguito chan gracias por el reencuentro, espero no me vuelvas a abandonar y que seas ese amigo maravilloso que siempre has sido para mí.

A mis nuevos hermanitos, si bien no hemos compartido mucho tiempo, de verdad los quiero, gracias Ricardo y Dante.

A Oso, Ady, Katia, Tania, Annel, Chabelita, a mi prima Ana Laura, Capi, Gaby y tantos que han sido mis amigos.

Finalmente a ti, no por menos importante, sino por ser mi soporte, Mau, aunque ha sido poco el tiempo que hemos compartido, eres lo mejor que me ha pasado, gracias por confiar en mí y ser mi amuleto de buena suerte. You are my hero, aishiteru.

A todos aquellos que se han topado conmigo en la vida y me la han cambiado para bien o para mal, y que con ello me han enseñado a ser mejor persona.

¡gracias!

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
I. MARCO TEORICO.....	2
A. Método Analítico.....	2
B. Desarrollo de Métodos Analíticos.....	3
1. Importancia del Desarrollo de Métodos.....	3
2. Propuesta de Métodos Analíticos.....	3
3. Verificación de la Aplicación Analítica.....	4
a. Validación de Métodos Analíticos.....	4
b. Clasificación de los Métodos de acuerdo a la Validación.....	5
c. Características del Desempeño Analítico.....	5
d. Comparación de Métodos Analíticos.....	9
C. Volumetría.....	10
1. Tipos de Valoraciones.....	11
a. Valoraciones Ácido Básicas.....	11
b. Valoraciones por Oxido Reducción.....	11
2. Disoluciones Valoradas.....	12
D. Espectrofotometría.....	13
1. Fundamentos de la Espectrofotometría.....	14
a. La Radiación Electromagnética y su Interacción con la Materia.....	14
b. Absorción y Emisión de Radiación por Parte de la Materia.....	14
2. Ley de Beer.....	15
a. Desviaciones a la Ley de Beer.....	16
b. Calibrado o Curva Estándar.....	17
3. Recomendaciones.....	18

E. Ácido ascórbico.....	18
1. Historia.....	18
2. Nombres Químicos.....	18
3. Nombres Genéricos.....	19
4. Fórmula Empírica.....	19
5. Peso Molecular.....	19
6. Fórmula Desarrollada.....	20
7. Composición Elemental.....	20
8. Punto de Fusión.....	20
9. Descripción.....	20
10. Solubilidad.....	20
11. Constante de Disociación.....	20
12. Incompatibilidades.....	20
13. Propiedades Espectrales.....	20
a. Espectro Ultravioleta.....	20
b. Espectro Infrarrojo.....	22
14. Química y Análisis.....	23
15. Función Metabólica.....	25
16. Usos.....	25
17. Ácido Ascórbico como Agente Reductor.....	26
F. Administración y Producción.....	28
1. Contabilidad de Costos.....	28
2. Naturaleza de los Costos.....	28
3. Clasificación de los Costos.....	29
4. Análisis Costo-beneficio.....	30
5. Tiempos y movimientos.....	31

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	32
III. OBJETIVOS.....	34
IV. HIPÓTESIS.....	34
V. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	35
VI. RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	44
VII. CONCLUSIONES.....	73
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	75
IX. ANEXOS.....	78

INTRODUCCIÓN

La calidad de los productos que se comercializan, es vital en todas las industrias existentes, como en el sector farmacéutico, que ha logrado ser de gran importancia y confiabilidad debido a la calidad que se exige dentro de esta organización ya que dichos productos farmacéuticos van dirigidos a la población con el fin de tratar algún padecimiento o evitar alguna enfermedad. Esto regulado por la Secretaria de Salud y la Norma 059, Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria química farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos.

Por ello el control de calidad es una parte esencial que asegura al producto llevado al mercado como seguro y efectivo. Para lograr esto es necesario contar con métodos analíticos que sean confiables, pero también se busca que representen una considerable facilidad de manejo y un bajo costo económico y laboral.

Se hallan diversos métodos que son de avanzada tecnología, pero también simbolizan un alto costo y es una realidad que no todos los analistas poseen la capacidad para usarlos, esto no significa que los métodos de análisis deban quedarse en el pasado por esa razón, pero es de gran ayuda contar con métodos sencillos que no creen demasiado problema a la institución que lo realiza y además generen resultados satisfactorios para llegar al objetivo esperado, la calidad del producto.

Esto se ve reflejado en el uso del ácido ascórbico, que no solo es utilizado en la industria farmacéutica como principio activo o como excipiente, también en suplementos alimenticios además de la industria cosmética, plásticos entre otras. Existen algunos productos que lo contienen por los efectos terapéuticos que posee, como caramelos, gomas masticables o dulces, igualmente en algunas bebidas y alimentos, los cuales necesitan métodos para evaluar al ácido ascórbico como materia prima antes de poder utilizarlo en sus productos. Es verdad que ya se han estudiado diversos procedimientos para cuantificar este analito, pero en el presente trabajo se desarrollaron dos métodos analíticos cuantitativos, los cuales fueron validados y se compararon entre si estadísticamente y por un análisis de costos, determinando así si ambos son confiables, equivalentes, de fácil manejo y costo bajo para poder ser utilizados sin ninguna restricción, dando opción a la Industria y a nuevos sectores que ocupen esta materia prima, de poder utilizar los métodos aquí presentados en lugar de los costosos y de mayor grado de complejidad, por su facilidad de manejo y menor costo laboral y monetario, con la confianza de que son métodos validados y eficaces.

I. MARCO TEÓRICO

A. Método Analítico

El Método analítico es aquel método de investigación que consiste en la desmembración de un todo, descomponiéndolo en sus partes o elementos para observar las causas, la naturaleza y los efectos. Es necesario conocer la naturaleza del fenómeno y objeto que se estudia para comprender su esencia. Este método nos permite conocer más del objeto de estudio, con lo cual se puede: explicar, hacer analogías, comprender mejor su comportamiento y establecer nuevas teorías.

La Química Analítica alcanza sus objetivos mediante una metodología que se fundamenta en la aplicación del método científico. Desde un punto de vista formal, esta metodología es común a todas las ciencias experimentales.

Particular de la Química Analítica es la metodología del Análisis Químico, que puede resumirse en un proceso analítico general consistente en un conjunto de procedimientos realizados para solucionar un determinado problema analítico. La definición del problema es la primera etapa, en ella se plantea el tipo de análisis que se necesita y la escala de trabajo. Tras ello, debe realizarse la elección del método analítico, aspecto clave para una resolución adecuada del problema. Una vez elegido el método, se procede a su ejecución. Posteriormente, se pasa a valorar los resultados obtenidos para establecer si el problema ha sido resuelto de forma satisfactoria. Si no es así, se debería reiniciar el proceso analítico y replantear el problema. (31)

Una determinación cuantitativa completa consiste en general de cuatro pasos mayores: la obtención de una muestra para el análisis, la separación del componente deseado en una forma medible, medición y cálculo de los resultados y obtención de conclusiones. De estos cuatro la medición es el paso central. Los dos primeros tienen por objeto preparar la muestra para el análisis deseado y el cuarto hacer significativos los resultados de esa medición. Así, toda determinación cuantitativa, se basa fundamentalmente en la medida de alguna propiedad relacionada, directa o indirectamente, con la cantidad de componente deseado en la muestra. (12)

B. Desarrollo de Métodos Analíticos

1. Importancia del Desarrollo de Métodos

Cualquier método analítico tiene como propósito determinar el analito en una muestra y es un procedimiento que involucra un proceso de medición que da como resultado una respuesta analítica. El atributo esencial que debe cumplir la respuesta es la confiabilidad y los modelos que permiten demostrar si la cualidad está ausente o presente son los modelos estadísticos.

Se debe considerar el analito que requiere un análisis químico, posteriormente se identifica el método a usar de acuerdo a sus características fisicoquímicas y biológicas, además de los requerimientos de equipo y costos.

Para elegir el método se toman en cuenta las siguientes consideraciones:

- a. Determinar si será cualitativo o cuantitativo.
- b. El analito estará disperso o localizado.
- c. Qué tan exacta y precisa debe ser la respuesta, qué grado de incertidumbre se permite y cómo debe ser expresada.

Una vez escogido y establecido se evalúa la aptitud del método, aquí es donde se considera a la validación.

2. Propuesta de Métodos Analíticos

Para proponer un método analítico se pueden considerar dos casos:

- a. Método revisado que pretenda sustituir a un método publicado por la FEUM, con cambios mayores o menores, ya sea en las características o condiciones de operación, aspectos instrumentales o reactivos, entre otros.
- b. Método nuevo cuando se trate de un método analítico no publicado en la FEUM.

La organización debe presentar la documentación necesaria que describa completamente al método analítico y su validación, lo suficientemente detallada que permita su evaluación.

La descripción del método puede incluir, entre otros, título, fundamento, objetivos, materiales, reactivos, instrumentos, características operacionales

importantes, instrucciones específicas, tales como: pruebas de verificación, preparación de las muestras, uso de sustancias de referencia, soluciones, blancos utilizados; precauciones que deben tomarse en cuenta y las fórmulas explícitas para realizar los cálculos requeridos. (11)

3. Verificación de la Aplicación Analítica

a. Validación de Métodos Analíticos

Proceso en el que se establece de manera estadística con evidencia documentada y demostración experimental que los procedimientos analíticos son adecuados para su propósito debido a su capacidad de satisfacer los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas. Esta cualidad reúne especificaciones que se expresan en términos de parámetros analíticos.

Es el proceso que establece, mediante estudios de laboratorio; que las características de desempeño del método, satisfacen los requisitos para su aplicación analítica.

Los métodos validados pueden utilizarse para analizar una nueva formulación (por ejemplo un nuevo producto, forma de dosificación o producto intermedio de un proceso) únicamente después de verificar que la nueva formulación no interfiere con la exactitud, linealidad ni precisión del método. No puede suponerse que un método validado puede medir correctamente el ingrediente activo de una formulación que es diferente a la utilizada para establecer la validez original del método. (11,13)

b. Clasificación de los Métodos de acuerdo a la Validación

- 1) **Categoría I.** Métodos para cuantificar a un componente específico en un producto terminado o en pruebas de estabilidad, ya sea en fármacos, aditivos o preparados farmacéuticos, u otros analitos de interés.
- 2) **Categoría II.** Métodos para la determinación de impurezas en muestras de fármacos, preparados farmacéuticos y aditivos. Pueden incluir determinaciones cuantitativas o pruebas límite.
- 3) **Categoría III.** Métodos para la determinación de un analito en una muestra con el objeto de evaluar una característica de desempeño del preparado farmacéutico.
- 4) **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.

c. Características de Desempeño Analítico (Parámetros)

- 1) **Sistema.** Son pruebas utilizadas para verificar que el sistema funciona correctamente, con base en criterios establecidos previamente, antes del procesamiento de las muestras durante el uso rutinario del método.
 - a) **Linealidad del Sistema.** 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. Se determina investigando la relación concentración-respuesta en un intervalo que incluya al menos 5 niveles, por triplicado, de la concentración del analito. El intervalo debe incluir las concentraciones esperadas del analito según la aplicación analítica del método. Estimar los parámetros del modelo basado en métodos estadísticos.

b) Precisión del sistema. Es el grado de concordancia relativa de la respuesta analítica de soluciones de referencia de concentración o magnitud conocida. Se determina a partir de una sustancia de referencia preparando por lo menos seis soluciones que representen al 100%, por dilución o por pesadas independientes. Calcular el coeficiente de variación.

2) Método

a) Especificidad. Es la 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 (especificidad) o que se pudieran presentar por efectos ambientales y/o de interacción con los mismos componentes (selectividad) tales como impurezas o productos de degradación o componentes de la misma muestra.

b) Linealidad. Es la capacidad de un método analítico para dar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito. Puede determinarse por la aplicación del método analítico, a una muestra (placebo adicionado o muestra adicionada de analito), obtenida de acuerdo a un procedimiento analítico para su preparación, al menos a tres niveles de concentración del analito por triplicado, para ser analizadas aplicando el método analítico. Inicialmente es recomendable hacer una gráfica con los resultados obtenidos de la concentración adicionada contra la concentración recuperada del analito, llevar a cabo el ajuste por mínimos cuadrados de la relación lineal entre concentración adicionada y concentración recuperada. Es necesario que el análisis contemple la calidad de ajuste al modelo, por medio del coeficiente de determinación (r^2), la desviación estándar de la regresión y el coeficiente de variación de regresión.

c) Exactitud. Concordancia absoluta entre el resultado obtenido con el método y la cantidad verdadera del analito presente en la muestra, a una cantidad fija. Se determina por la aplicación del método analítico a placebos o muestras adicionadas, preparados de manera independiente, al menos por sextuplicado, obtenidas de acuerdo a un procedimiento específico, dichas muestras deben contener todos los componentes del producto y además se le debe adicionar la

concentración del analito que represente el 100%. Evaluar mediante el porcentaje de recobro considerando los resultados del análisis de las muestras. La diferencia entre la media aritmética del porcentaje de recobro y el valor verdadero aceptado (100%) mide el sesgo del método.

d) Precisión. Grado de concordancia relativa entre los resultados obtenidos al aplicar el método analítico, bajo las mismas o diferentes condiciones analíticas (repetibilidad y reproducibilidad) o bajo diferentes condiciones analíticas, utilizando una muestra homogénea. Generalmente se expresa como la desviación estándar o como el coeficiente de variación (desviación estándar relativa).

- **Repetibilidad.** Es la variación de los resultados de las muestras, al aplicar el método en una corrida analítica. Se determina a partir de los resultados obtenidos de la exactitud y linealidad del método (porcentaje de recobro), y de la relación de la concentración adicionada contra la concentración recuperada.
- **Reproducibilidad (Precisión Intermedia).** Variación dentro de un mismo laboratorio, cuando el método analítico se aplica en diferentes días y con diferentes analistas. Se determina con el análisis de por los menos tres alícuotas (muestras analíticas indicadas por el método), tomadas de una muestra homogénea; para ser analizadas en distintos días (mínimo dos) y analistas (mínimo dos). Se evalúa por medio del coeficiente de variación de todos.

e) 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 establecida. Se puede determinar empleando el procedimiento de linealidad, con al menos tres niveles de concentración por triplicado, lo que permitirá investigar linealidad, estimar la pendiente y una medida del error de la respuesta analítica como lo es la desviación estándar de la regresión o la desviación estándar de la ordenada al origen. Se calcula con la siguiente ecuación: $LD = [3.3(\text{medida del error})] / \text{pendiente}$

-
- f) **Límite de Cuantificación.** Cantidad mínima de analito en una muestra que puede ser determinada con exactitud y precisión aceptable, bajo las condiciones de aplicación del método. Es necesario generar una relación concentración adicionada vs respuesta analítica con al menos tres niveles de concentración por triplicado, lo que permitirá investigar la linealidad, estimar la pendiente y una medida del error de la respuesta analítica, como lo es la desviación estándar de la regresión o la desviación estándar de la ordenada al origen.

Se calcula $LC = -[10 (\text{medida del error})] / \text{pendiente}$

- g) **Tolerancia.** 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. Se deben establecer aquellos factores ajenos al método, fijar por lo menos dos condiciones y analizar una misma muestra por lo menos por triplicado a cada condición. Calcular la media aritmética, desviación estándar y coeficiente de variación de todos los resultados de todas las condiciones investigadas.
- h) **Robustez.** Capacidad del método analítico de mantener su desempeño al presentarse variaciones pequeñas pero deliberadas, en las características normales de operación del método. Se deben establecer aquellos factores instrumentales y/o factores no instrumentales que se consideren críticos. Calcular la media aritmética de los tres niveles y la diferencia absoluta porcentual de la media aritmética de los niveles superior e inferior, comparada con el nivel normal. (11)

Tabla 1. Clasificación de los parámetros de validación en diferentes métodos (FDA, NOM 073 y 177)

PARÁMETRO	IDENTIFICACIÓN	CONTROL DE CALIDAD	VALORACIÓN	INDICATIVOS DE ESTABILIDAD		PRUEBAS DE IMPUREZA		DISOLUCIÓN	BIOEQUIVALENCIA
				Baja	Alta	Cuantificación	Límite		
Exactitud	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Precisión: Repetibilidad	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Precisión: Reproducibilidad	X	✓	✓	✓	✓	✓	X	✓	✓
Linealidad	X	✓	✓	✓	✓	✓	X	✓	✓
Tolerancia	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X	✓
Especificidad	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Robustez	X	X	X	✓	✓	X	✓	✓	✓
Estabilidad de la muestra	X	✓	X	✓	✓	✓	X	✓	✓
Límite de detección	X	X	X	✓	X	X	✓	X	✓
Límite de cuantificación	X	X	X	✓	X	✓	X	X	✓

✓ El parámetro es normalmente evaluado X El parámetro no es normalmente evaluado (13)

d. Comparación de Métodos Analíticos

Con frecuencia es necesario comparar dos métodos para determinar si hay una diferencia importante en sus resultados promedios o sus variables. El objetivo de un experimento de comparación de métodos es generar datos que permitan evaluar la equivalencia de los dos métodos en toda una gama de concentraciones.

Se enlistan los parámetros analíticos mínimos a comparar, así como los criterios para establecer la igualdad de dichos parámetros.

- 1) **Precisión.** *Criterio.* En el intervalo de confianza para la razón de varianzas (calculada a partir del porcentaje de exactitud al 100%, del porcentaje recuperado de linealidad del método y de la varianza del método del estudio de precisión) debe localizarse el valor de 1.
- 2) **Exactitud al 100%.** *Criterio.* En el intervalo de confianza para la diferencia de las medias aritméticas del porcentaje recuperado, debe localizarse el valor de cero.
- 3) **Linealidad del Método.** *Criterios.* 1) en el intervalo de confianza para la diferencia de la pendiente de cantidad adicionada- cantidad recuperada debe localizarse el valor de cero; 2) en el intervalo de confianza para la diferencia de las ordenadas al origen de cantidad adicionada-cantidad recuperada debe localizarse el valor de cero. (38)

C. Volumetría

El análisis volumétrico o volumetría es un término para métodos cuantitativos, en los cuales la cantidad de sustancia analizada se calcula a partir de la concentración conocida y de la cantidad medida (generalmente en volumen) de la solución reactiva, que se añade a la solución de la muestra hasta que la sustancia analizada se haya consumido en una reacción definida con dicho reactivo. Al proceso se le llama titulación. Es un proceso químico que se emplea para cuantificar un compuesto, haciendo reaccionar una disolución de concentración conocida con la disolución del compuesto cuya concentración se quiere conocer.

El reactivo se llama titulante y a su solución se le conoce como solución titulante o solución valorada. La disolución valorada se agrega hasta que reaccione estequiométricamente o en cantidad equivalente con el compuesto de concentración desconocida. Para saber lo anterior se necesita conocer el punto final de la titulación el cual se basa en una propiedad física que cambia de una forma característica en el punto de equivalencia o muy cerca de él. En muchas reacciones se emplea un compuesto químico llamado indicador que por un cambio de color asegura el fin de la reacción o punto final de la titulación.

La precisión de la titulación o valoración está limitada por la lectura que se hace del volumen de la bureta, en razón de que esta es la que se emplea para medir el volumen de la disolución que reacciona con la sustancia problema. La exactitud se afecta por las diferentes fuentes de error que son inherentes a la pericia, experiencia y conocimientos del que realiza la titulación, a la falta de calibración del material volumétrico y de coincidencia entre el punto final de la titulación y el punto de equivalencia.

La concentración de esta solución se calcula a partir de la cantidad de titulante que se disuelve y se diluye a un volumen exactamente medido. En este último caso, a la solución se le llama solución valorada, para destacar el método empleado. A la especie (o solución) que se titula se le llama titulado.

Para que una reacción pueda utilizarse como base de una determinación volumétrica se deben cumplir los siguientes requisitos: (1) la reacción tendrá que verificarse rápidamente, de tal forma que la titulación pueda efectuarse en un tiempo razonable; (2) la reacción será esencialmente completa; (3) ser cuantitativa, esto es, reaccionar totalmente los reactivos en cantidades estequiométricas; (4) Realizarse en una sola dirección, por tanto irreversible; (5) Se puede describir la reacción por una ecuación química definida; (6) No tener reacciones colaterales o secundarias; (7) Conocer con certeza el momento en que

terminan la reacción y ser fácilmente observable; (8) Ser estable en condiciones ambientales.

El punto del proceso de titulación, en el cual la especie titulada y el titulante están presentes en cantidades exactas equivalentes, se llama punto de equivalencia.

Algunas titulaciones se verifican de tal manera que la misma titulación permite una indicación visual; existe en este caso una auto indicación. Si un sistema no es auto indicativo se puede añadir un indicador. (31)

Hay cuatro tipos de valoraciones, cada uno basado en determinado tipo de reacción: 1) valoraciones ácido básicas; 2) valoraciones de oxidación reducción; 3) valoraciones de precipitación y 4) valoraciones de formación de complejos. A continuación se explicaran las dos primeras.

1. Tipos de Valoraciones

- a. Valoraciones Ácido Básicas.** Se fundamentan en las reacciones de neutralización; por tanto, los ácidos se determinan mediante valoración con una solución base patrón y las bases con solución ácida valorada. Pueden efectuarse en disolventes que no sean el agua, con frecuencia el éxito o el fracaso del análisis depende de la elección correcta del disolvente.

El análisis de grupos funcionales orgánicos cuenta con procedimientos cuantitativos en los que interviene una medida ácido básica indirecta. El grupo funcional siempre reacciona con un reactivo añadido, en algunos casos el producto de dicha reacción es ácido o básico y puede valorarse.

- b. Valoraciones por Óxido Reducción.** Una valoración oxido-reducción implica un cambio en el estado de oxidación del agente valorante y de la sustancia que se va a determinar. Las reacciones en las que se produce un cambio en el estado de oxidación también pueden representarse mediante una constante de equilibrio.

Una característica común en estas reacciones es que poseen valores elevados de constantes de equilibrio, pero lentas velocidades de reacción. Por fortuna estas pueden aumentarse notablemente con catalizadores.

En una titulación de oxidación reducción, el analito debe encontrarse en un único estado de oxidación. Sin embargo, con frecuencia los pasos que preceden a la titulación (disolución de la muestra y separación de interferencias) convierten al analito en una mezcla de estados de oxidación.

Para que un reactivo sea útil como agente oxidante o reductor previo, debe reaccionar cuantitativamente con el analito. Además, el exceso de reactivo debe poder eliminarse fácilmente pues, en general, causa interferencias, ya que reacciona con la solución patrón. (27)

2. Disoluciones Valoradas. Para preparar una disolución valorada se emplea un compuesto químico llamado patrón primario por no requerir referencia a otra concentración patrón.

El patrón primario debe reunir las siguientes características:

- a. Alto grado de pureza. Este tipo de reactivos forman parte de un grupo llamado reactivo analítico, lo cual asegura una pureza del 99.99% de pureza.
- b. Estabilidad ante el medio ambiente, tanto en estado sólido como en disolución.
- c. Poseer un peso molecular o equivalente grande para disminuir los errores al pesarlo.
- d. Ser soluble en el disolvente de trabajo.
- e. Que la composición del compuesto corresponda exactamente a la fórmula. (16)

D. Espectrofotometría

La luz es una forma de radiación electromagnética y se puede imaginar como una secuencia de ondas que pasan por un medio. Se caracteriza por su velocidad, frecuencia y longitud de onda que puede ser expresada en Angstrom (A), milimicras ($m\mu$) o nanómetros (nm).

La luz blanca es policromática, es decir, está compuesta por diferentes longitudes de onda. La luz de una sola longitud de onda se llama monocromática.

La espectrofotometría ultravioleta visible se basa en la propiedad que tienen algunas sustancias en disolución de absorber radiación electromagnética de la región ultravioleta o visible del espectro electromagnético.

Este hecho se aprovecha en el espectrofotómetro para medir la transmisión de luz monocromática a través de una muestra de concentración desconocida. Esa medida determina la concentración de la sustancia en la muestra. Para tal efecto se necesita una disolución de referencia (de concentración conocida) y la muestra de concentración desconocida. La relación de las dos medidas anteriores es llamada por ciento de transmitancia de la muestra.

La banda espectral empleada en las mediciones se extiende desde las longitudes de onda corta de la zona ultravioleta hasta la visible del espectro. Por cuestiones prácticas, este intervalo espectral puede considerarse como si estuviera constituido por dos zonas, la ultravioleta de 190 nm a 380 nm y la visible de 380 nm a 780 nm. La espectrofotometría en la zona visible (que antes solía llamarse colorimetría), es la medida de la absorción de luz visible que generalmente no es monocromática pero que se selecciona mediante el empleo de filtros pigmentados o de interferencia.

En general, los espectros ultravioleta y visible de una sustancia, no tienen un alto grado de especificidad, sin embargo son muy adecuados para las valoraciones cuantitativas y en el caso de muchas sustancias constituyen un medio útil de identificación adicional.

1. Fundamentos de Espectrofotometría

a. La radiación Electromagnética y su Interacción con la Materia

Los modelos explicativos de la estructura de la materia que tienen como fundamento las características ondulatorias de las partículas que la constituyen proporcionan un marco de referencia para describir las interacciones entre la radiación electromagnética y la materia. Estas interacciones son el fundamento de las aplicaciones espectroscópicas. En algún medio material la interacción entre los campos eléctricos y magnéticos que existen en la materia y los correspondientes de la radiación pueden llegar a reducir esa velocidad de propagación, por ello sólo en el vacío se observa la velocidad máxima. Si asignamos una longitud de onda característica a cada tipo de radiación, la propagación de esa onda se hará con una frecuencia tal que al multiplicarla por su longitud debe darnos la velocidad de propagación.

b. Absorción y Emisión de Radiación por Parte de la Materia

Una descripción simple de la estructura de la materia permite explicar los enlaces entre los átomos para formar moléculas en términos de la localización de ciertas partículas subatómicas. Estas partículas evidencian sus características ondulatorias ya que interactúan con la radiación electromagnética. La molécula en forma estable bajo las condiciones ambientales corrientes se encuentra en un determinado nivel energético. Si se logra hacer incidir sobre la molécula un fotón de radiación electromagnética con energía apropiada, la molécula aumenta su contenido energético absorbiendo el fotón. Entonces la molécula pasa a un estado excitado. La molécula energizada se encuentra en un estado que no es estable en condiciones ambientales corrientes y regresa a la condición estable y para lograrlo emite un fotón con la energía que logró excitarla antes.

La energía de un haz radiante disminuye con relación a la distancia que viaja a través de un medio absorbente.

También disminuye en relación con la concentración de iones y moléculas absorbentes presentes en el medio. Estos dos factores determinan la proporción de la energía incidente total que es transmitida.

La disminución de la energía de radiación monocromática que pasa a través de un medio absorbente homogéneo, se establece cuantitativamente por la ley de Beer:

2. Ley de Beer

Esta ley da información cuantitativa de cómo es que la atenuación de la radiación depende de la concentración de las moléculas que la absorben y de la distancia que recorre el rayo en el medio absorbente.

De acuerdo con esta ley, la Absorbancia está relacionada linealmente con la concentración (c) de las especies absorbentes y con la longitud de la trayectoria de la radiación (b) en el medio absorbente; y se expresa mediante la siguiente ecuación:

$$A = \log (P_0/P) = abc$$

Donde:

A: Absorbancia

P_0 : Energía incidente de radiación monocromática

P: Energía transmitida o cantidad de energía no absorbida por la muestra

a: constante de proporcionalidad llamada *absortividad*.

b: longitud de la trayectoria de la energía luminosa

c: Concentración de la sustancia

La absortividad debe tener unidades que cancelen las unidades de b y c, cuando la concentración se expresa en moles por litro y b en centímetros, la constante de proporcionalidad se denomina *absortividad molar* y se expresa con el símbolo ϵ por tanto:

$$A = \epsilon bc$$

Donde ϵ tiene unidades de litros por mol centímetro ($L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

a. Desviaciones de la Ley de Beer

Cuando se presenta la absorbancia contra la concentración no se obtiene una recta sino que se produce una desviación de la ley de Beer. La desviación hacia el eje de ordenadas se considera positiva; si va hacia la abscisa, negativa. La ley de Beer (la Absorbancia es proporcional a la concentración) no siempre se cumple en todas las concentraciones; sin embargo, muchos sistemas presentan un rango de concentración en el cual se obtiene una relación lineal.

Los factores más importantes que pueden causar desviaciones son:

- 1) Condiciones ambientales por ejemplo, la presión y el disolvente.
- 2) Errores instrumentales, tales como dispersión de la radiación, estabilidad de la fuente de radiación, detector, selector de la longitud de onda, la electrónica y la confiabilidad de la parte óptica.
- 3) Desviaciones químicas que afecten al equilibrio químico, como el pH, reacciones colaterales y dependencia de la concentración.
- 4) Cambios del índice de refracción de la muestra.
- 5) Radiaciones no monocromáticas.

El uso de la espectrofotometría de absorción como procedimiento de valoración, se basa en el hecho de que la absorptividad de una sustancia en términos generales es una constante independiente de la intensidad de radiación incidente, longitud interna de la celda y concentración, por lo cual esta última puede determinarse fotométricamente.

La espectrofotometría cuantitativa se basa en que el sistema cumpla la ley de Beer.

Si las cantidades de radiación reflejada, dispersada y refractada son mínimas, la relación P/P_0 cumplirá la ley de Beer, suponiendo que no habrá otros problemas químicos. Por consiguiente existe una relación entre la transmisión, o la absorción y la concentración; sin embargo, si la cantidades de luz reflejada o dispersada son elevadas, puede restringirse el cumplimiento de la ley de Beer, aunque a veces no

importa que la radiación se refleje o refracte pues de hecho estos efectos de las radiaciones se emplean en otros procedimientos cuantitativos.

Los datos de absorción puede manejarse de diferentes modos en el análisis cuantitativo. La escala de Absorbancia va desde cero hasta infinito, pero la máxima exactitud se obtiene en el intervalo de 0.1 a 1.0; por lo tanto, las condiciones experimentales deben elegirse de manera que la Absorbancia producida ocurra dentro de dicho intervalo; las soluciones que originan absorbancias demasiado elevadas se diluyen y las bajas se concentran.

La ley de Beer no considera el efecto de la temperatura, la longitud de onda o el tipo de disolvente, pero en la mayoría de las determinaciones analíticas el efecto de variación normal de temperatura es insignificante.

b. Calibrado o Curva Estándar

En este procedimiento se prepara una serie de disoluciones patrón que contienen concentraciones conocidas de la especie que va a determinarse. Se miden sus absorbancias y se representan frente a su concentración. A continuación se trata del mismo modo la disolución en cuestión y se determina su concentración comparándola con la línea de calibrado.

Este método es el más empleado en determinaciones cuantitativas. Tiene la ventaja de que es más preciso ya que se opera con una línea que pasa por una serie de valores, en vez de emplear un único valor para calcular la absorptividad molar.

En práctica, el manejo de las muestras no suele ser tan sencillo, pues a menudo contienen otras sustancias que interfieren en la determinación si absorben a la misma longitud de onda que la especie en cuestión. Hay otros problemas que suelen presentarse: la solubilidad de los reactivos, su pureza y disponibilidad, la estabilidad del color y los parámetros instrumentales. (11,27,31)

3. Recomendaciones

- 1) El blanco contiene todos los reactivos, menos la sustancia problema.
- 2) Las celdas sucias con disoluciones o aun con las huellas de los dedos, dan valores falsos al absorber más luz, por lo que es necesario lavarlas, por ejemplo con una disolución de ácido nítrico 1:1 y luego enjuagarla con agua destilada.
- 3) No secar las celdas con papel o tela que deje pelusas porque también interfieren en la Absorbancia, en su lugar usar el papel para secar lentes.(16)

E. Ácido ascórbico

1. Historia

En 1747, un médico de la armada británica, el Capitán Lind, demostró que la peligrosa enfermedad llamada escorbuto, que solía atacar a los marinos que pasaban muchos meses en altamar, se debía únicamente a la falta de ingestión de frutas y verduras frescas. También descubrió, a través de largos ensayos empíricos, que la mejor manera de controlar el escorbuto era el agregar a la dieta diaria de la tripulación un poco de jugo de lima o de limón. Desde 1804, la armada británica tenía estrictas reglamentaciones que prohibían hacerse a la mar sin una adecuada provisión de jugo de lima. Desde entonces los marineros británicos han recibido el apodo de "limies". Más de un siglo después comenzaron los intentos para aislar y caracterizar el factor anti escorbuto en el jugo de limón. Zilva logró obtener soluciones activas de alta concentración de jugo de limón. Descubrió que el factor anti escorbuto era una sustancia hidrosoluble, fuertemente reductora y estrechamente vinculada a los azúcares. Szent-Györgyl logró cristalizar el compuesto al que denominó "ácido hexurónico". Posteriormente la sustancia recibió el nombre de ácido L-ascórbico. (3)

2. Nombres Químicos

Ácido L-ascórbico

Ácido L-xyloascórbico

3- oxo-L-gluofuranolacetona

3. Nombres Genéricos

Vitamina C, ácido ascórbico

4. Formula Empírica

$C_6H_8O_6$

5. Peso Molecular

176.12

6. Formula Desarrollada

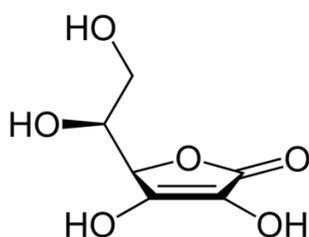


Figura 1. Ácido ascórbico (35)

7. Composición Elemental

C, 40.91%; H, 4.58%; O, 54.51%

8. Punto de Fusión

El ácido ascórbico funde a 190-192°C con descomposición.

9. Descripción

Cristales o polvo blanco ligeramente amarillo, inodoro, por exposición a la luz se descompone gradualmente. En estado seco es estable al aire, pero en solución se oxida rápidamente; se funde alrededor de 190 °C; rotación específica (solución acuosa 1 en 10) entre +20.5 y +21.5. La solución acuosa tiene las propiedades ácidas de un ácido monobásico y forma sales con iones metálicos. Una solución en agua es dextrorrotativa. La solución al 5% en agua tiene un pH de 2.2 a 3, y al 5.04% es iso-osmótica con suero.

10. Solubilidad

Es soluble a 20°C en 3.5 partes de agua y 25 partes de alcohol (95%); 50 partes de alcohol absoluto, 100 mL de glicerol, 20 mL de propilenglicol, soluble en agua caliente 40.0% a 40, 80 y 100 °C. Insoluble en éter, cloroformo, benceno.

11. Constante de Disociación

El ácido ascórbico es un ácido orgánico moderadamente fuerte, tiene dos constantes: pK_1 4.17 y pK_2 11.57, pH=3 (5 mg/mL), pH=2 (50 mg/mL).

12. Incompatibilidades

Estable en estado seco, pero en solución se oxida con rapidez en presencia de aire. La reacción es acelerada por álcalis y ciertos metales, sobretodo cobre; es retrasada por ácidos. Las soluciones acuosas son intensamente ácidas, con un pH de 2 a 3.

13. Propiedades Espectrales

a. Espectro Ultravioleta

El espectro UV del ácido ascórbico (0.002%) en solución acuosa, ácido metanólico, etanólico y alcalina fue escaneado de 200 a 400 nm usando un Espectrofotometro Varian Carry 119.

	λ máx (nm)
Solución acuosa	263
Solución ácida	243
Metanol	244
Etanol	245

Otros datos reportados son los siguientes:

Solución acuosa	260-265
Solución ácida	245
Etanol	245
Metanol	263
Sal de sodio en solución acuosa	265

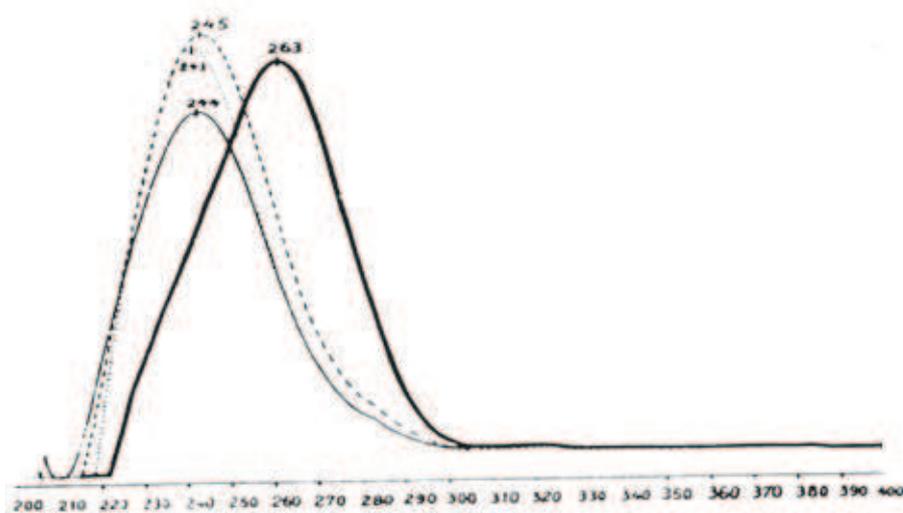


Figura 2. Espectro UV de ácido ascórbico.---- ácido ascórbico en agua; ---- ácido ascórbico en etanol; _____ ácido ascórbico en metanol; ácido ascórbico en solución ácida. (14)

b. Espectro Infrarrojo

El espectro IR del ácido ascórbico como disco de KBr fue registrado en un espectrofotómetro Perkin Elmer 580B FT. El asignamiento estructural se correlaciona con la siguiente banda de frecuencias.

Frecuencia cm^{-1}	Asignación
3510	OH
3405	
3306	
1755	C=O
1670	
1110	C-O-C
1025	

(14)

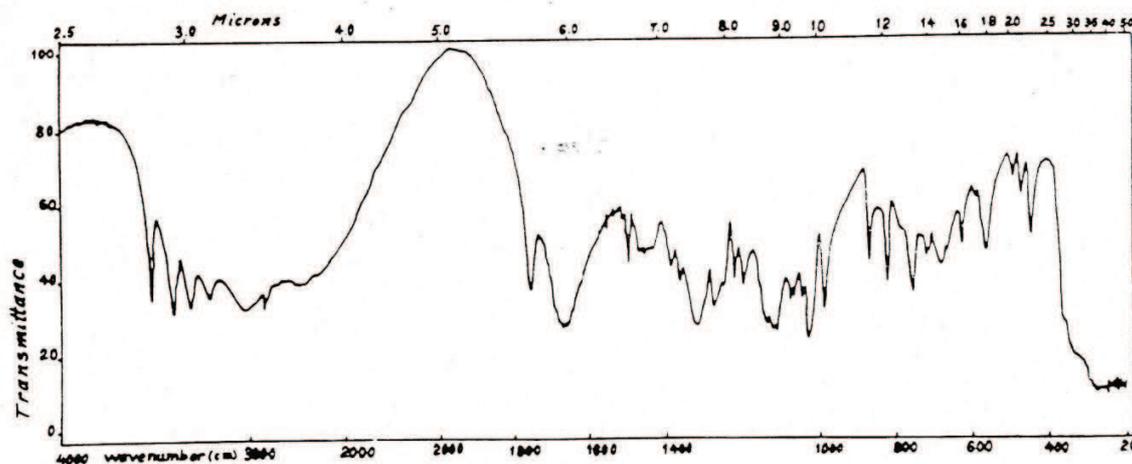


Figura 3. Espectro IR de ácido ascórbico como disco de KBr. (14)

14. Química y Análisis

Es un compuesto blanco cristalino, estructuralmente relacionado con los monosacáridos, en la naturaleza existe en la forma reducida y oxidada, ácido dehidroascórbico. Estas sustancias se encuentran en un estado de equilibrio reversible en los sistemas biológicos, y ambas tienen la misma actividad biológica.

Las soluciones de ácido ascórbico son fuertemente reductoras, y la vitamina se oxida con facilidad.

El ácido es el agente reductor más activo conocido que se encuentra presente naturalmente en los tejidos vivos y se oxida de forma lábil y reversible a ácido dehidroascórbico (DHA), que también es fisiológicamente activo aunque menos estable. La transformación más allá de la fase de ácido dehidroascórbico determina la formación irreversible de ácido dicetogulónico fisiológicamente inactivo (condiciones aeróbicas).

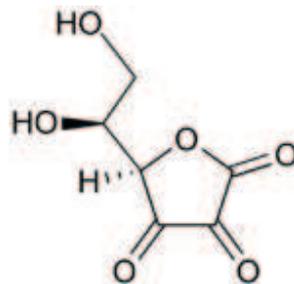


Figura 4. Ácido dehidroascórbico (36)

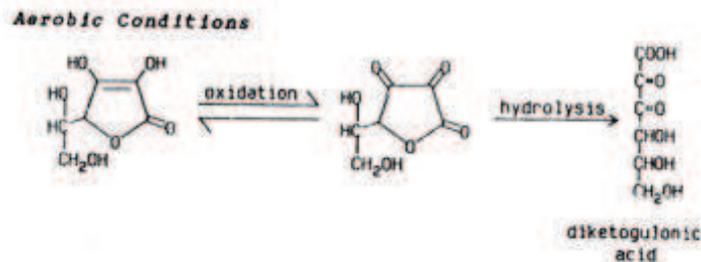


Figura 5. Degradación del ácido ascórbico en condiciones aeróbicas (7)

En condiciones anaeróbicas sufre deshidratación e hidrólisis generando furfural y dióxido de carbono (Figura 6).

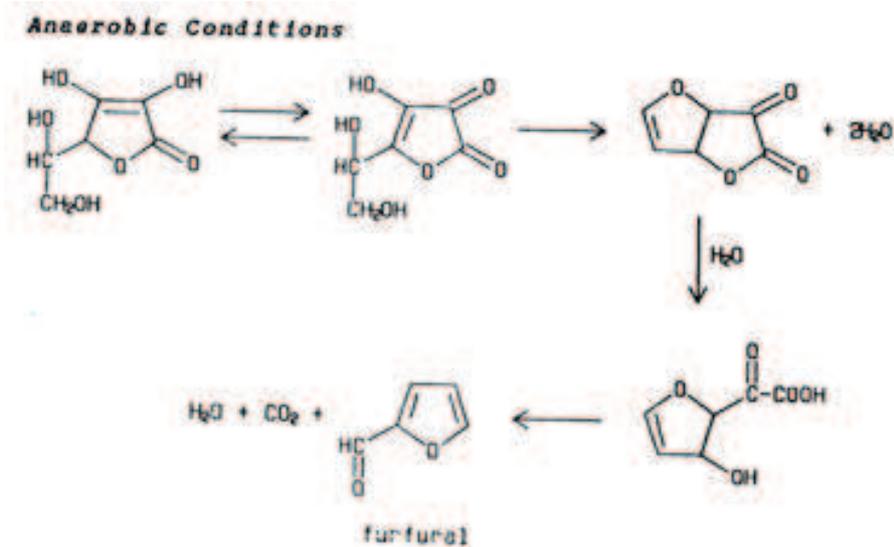


Figura 6. Degradación de ácido ascórbico en condiciones anaeróbicas (7)

El ácido ascórbico contiene varios elementos estructurales que contribuyen a su comportamiento químico: la estructura de la lactona y dos grupos hidroxilos enólicos, así como un grupo alcohol primario y secundario. La estructura endiol motiva sus cualidades antioxidantes, ya que los endioles pueden ser oxidados fácilmente a dicetonas.

El ácido ascórbico forma dos enlaces de puentes de hidrógeno intramoleculares que contribuyen de manera decisiva a la estabilidad, y con eso a las cualidades químicas de la estructura endiol.

La sustancia que se encuentra en el comercio se produce con exclusividad por síntesis. La materia prima para la producción de ácido ascórbico es el sorbitol, una hexosa presente en varias frutas pero que en la industria se obtiene por hidrogenación de la dextrosa.

La USP brinda un estándar de referencia de ácido L-ascórbico para las verificaciones. Los métodos prácticos de análisis se basan en propiedades reductoras que permiten la determinación por titulación oxidimétrica. (8)

15. Función Metabólica

Se sabe que la vitamina C es esencial para la formación de colágeno intercelular. En los tejidos con escorbuto, la sustancia amorfa basal y los fibroblastos del área intercelular parecen normales, pero sin la matriz de fibras colágenas. Los haces de colágeno aparecen en el término de unas pocas horas desde la administración del ácido ascórbico. Esto señala la relación de la vitamina con el mantenimiento de las estructuras dentales, la matriz ósea y la pared de los capilares. Éstos son los tejidos afectados en el escorbuto.

La vitamina C es esencial para la consolidación de las fracturas óseas. Estas lo hacen con lentitud en caso de deficiencia. También hay retraso de la cicatrización de heridas.

El ácido ascórbico se encuentra en todas las células vegetales vivas, se sintetiza durante la germinación de las semillas y se concentra relativamente en las paredes de la planta en crecimiento rápido. También está presente en todos los tejidos animales, pero solo los cobayos, los primates, unos pocos animales exóticos y el hombre son incapaces de satisfacer las necesidades corporales por síntesis y deben obtenerla de una fuente dietética.

También favorece la absorción de hierro, al mantenerlo en la forma reducida. Algunas anemias microcíticas responden al tratamiento con ácido ascórbico, lo que puede deberse, en parte, a la mejor absorción del hierro.

16. Usos

Además de ser utilizado como principio activo y excipiente en diversas formulaciones farmacéuticas tiene algunos otros usos en diversas industrias.

El ácido ascórbico se oxida fácilmente, y debido a esto se usa como reductor en algunas soluciones de revelado fotográfico y como conservante.

Se usa añadiéndolo al agua que ha sido tratada con yodo, para hacerla potable, neutralizando el sabor desagradable del yodo y aumentando las ventajas para la salud del agua potable.

Una práctica bastante frecuente es agregar ácido ascórbico a los alimentos con fines técnicos; por ejemplo como antioxidante para proteger los sabores y los colores naturales.

A veces se administra con sales de hierro para el tratamiento de la anemia ferropénica; mantiene el hierro en estado ferroso lo cual mejora su absorción, unos pocos casos de anemia hipocrómica mejoran al aumentar la ingestión de vitamina C.

Se utiliza también como acidificador de la orina para mejorar la eficacia de la metenamida al disminuir el pH urinario y favorecer así la formación de formaldehído.

En la fabricación de plástico, el ácido ascórbico puede usarse para ensamblar cadenas moleculares más rápidamente y con menos residuos que con los métodos de síntesis tradicionales.

En la industria cosmética es utilizado como regenerador de colágeno ya que interviene en el proceso de transformación de la prolina en hidroxidoprolina que es un constituyente esencial del colágeno y cómo en composiciones para ondulado permanente y para dar color al cabello.

Otros usos son la prevención del cáncer, las infecciones gingivales, los estados hemorrágicos, la depresión mental, las caries dentales, el acné, los trastornos del colágeno, las úlceras de la piel, la fiebre del heno y el resfrío común.

17. Ácido Ascórbico como Agente Reductor

EL ácido ascórbico es un potente agente reductor, capaz de reaccionar con el oxígeno y utilizable por lo tanto como antioxidante.

El elemento funcional de esta vitamina es la agrupación diol en los carbonos 2 y 3 que hace de este un agente reductor que se oxida fácilmente a ácido dehidroascórbico dando origen a una dicetona (figura 7).

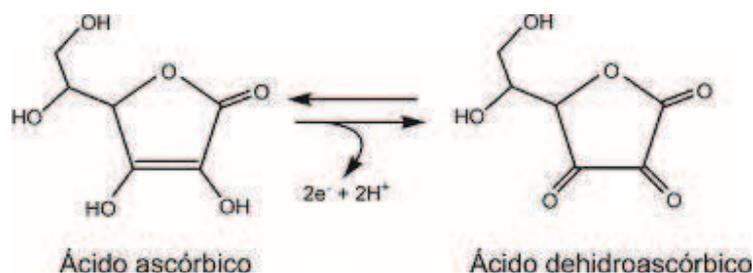


Figura 7. Oxidación de ácido ascórbico (23)

El potencial de hidrógeno al que actúa como agente reductor le permite reducir compuestos como oxígeno molecular, nitrato y citocromos.

Esta capacidad reductora se analiza por medio de la volumetría. La oxidación del ácido ascórbico con un colorante redox como el 2,6-diclorofenol indofenol (DFI); el cual es azul en medio básico y rojo en medio ácido (figura 8).

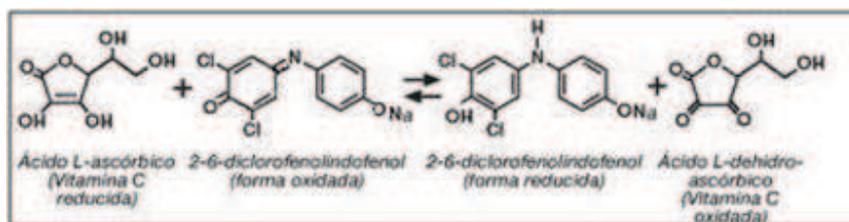


Figura 8. Reacción química del ácido ascórbico con 2,6-diclorofenol indofenol sal sódica (20).

El indofenol inicialmente es de color azul, en un medio ácido oxidado vuelve a color rojo y cuando se ha reducido vuelve incoloro. (3, 25, 32, 33)

F. Administración y Producción

La producción es la transformación de los recursos en productos, en el caso de la industria farmacéutica estos son encaminados a la conservación o recuperación de la salud. Generalmente mediante la fabricación de medicamentos que cumplan características de calidad, seguridad, efectividad y efecto terapéutico preestablecidos. Por otro lado la administración es la ciencia social y técnica encargada de la planificación, organización, dirección y control de los recursos (humanos, financieros, materiales, tecnológicos, el conocimiento, etc.) de la organización, con el fin de obtener el máximo beneficio posible; este beneficio puede ser económico o social, dependiendo de los fines perseguidos por la organización.

1. Contabilidad de Costos

La contabilidad de costos se ocupa de la clasificación, acumulación, control y asignación de costos, los clasifica de acuerdo a patrones de comportamiento, actividades y procesos con los cuales se relacionan dichos productos a los que corresponden y otras categorías, dependiendo del tipo de medición que se desea. Los costos pueden acumularse por cuentas, trabajos, procesos, productos u otros segmentos de negocio. Teniendo esta información el contador calcula, informa y analiza el costo, para realizar diferentes funciones como la operación de un proceso, la fabricación de un producto y la realización de proyectos especiales.

2. Naturaleza de los Costos

El costo representa la suma de erogación, es decir, el costo inicial de un activo o servicio adquirido que se refleja en el desembolso de dinero en efectivo y otros valores, es decir un pasivo incurrido.

Además del precio de adquisición de un activo se puede incurrir en otros costos preliminares para permitir que el activo rinda los servicios esperados, cargos de transporte, recepción de materiales, instalación, capacitación, etc.

Los gastos son costos que se han aplicado contra el ingreso de un periodo determinado. Los salarios de oficina se definen como gastos que se aplican al periodo durante el cual se producen.

Las pérdidas son reducciones en la participación de la empresa por las que no se ha recibido ningún valor compensatorio.

3. Clasificación de los Costos

Los costos pueden clasificarse de acuerdo al enfoque con el que son tratados, por ello existen diversas clasificaciones.

En base a la función en que incurren:

- a. **Costos de Producción.** Generados en el proceso de transformación de la materia prima en producto terminado.
- b. **Costos de Distribución o Venta.** Aquellos que incurren en el área que se encarga de llevar el producto desde la empresa hasta el último consumidor, por ejemplo publicidad, comisiones, etc.
- c. **Costos de Administración.** Los que se originan en el área administrativa como sueldos y servicios.

De acuerdo con su identificación con una actividad, departamento o producto:

- a. **Costos Directos.** Aquellos que se identifican plenamente con una actividad departamento o producto.
- b. **Costos Indirectos.** Son los que no se pueden identificar con una actividad determinada.
Algunos costos son duales, es decir, son directos e indirectos al mismo tiempo.

Según con el tiempo en que fueron calculados.

- a. **Costos Históricos.** Los que incurrieron en un determinado periodo de tiempo.
- b. **Costos Predeterminados.** Son los que se estiman con base a las estadísticas y se utilizan para elaborar presupuestos.

De acuerdo con el tiempo en que se enfrentan los ingresos:

- a. **Costos del Período.** Los que se identifican con los intervalos de tiempo y no con los productos o servicios.
- b. **Costos el Producto.** Aquellos que se llevan contra los ingresos únicamente cuando han contribuido a generarlos en forma directa.

Según su comportamiento:

- a. **Costos Variables.** Cambian o fluctúan en relación directa a una actividad o volumen dado.
- b. **Costos Fijos.** Son los que permanecen constantes dentro de un periodo determinado sin importar si varía el volumen.

4. Análisis Costo-Beneficio

El costo beneficio es una lógica o razonamiento basado en el principio de obtener los mayores y mejores resultados al menor esfuerzo invertido, tanto por eficiencia técnica como por motivación humana. Se supone que todos los hechos y actos pueden evaluarse bajo lógica, aquellos dónde los beneficios superan el coste son exitosos, caso contrario fracasan. También se define como el proceso de colocar cifras en dólares de los diferentes costos y beneficios de una actividad. Al estimarlo se puede saber el impacto financiero acumulado de lo que se quiere lograr.

Este análisis evalúa las consecuencias o resultados de un procedimiento, operación, método o intervenciones en términos monetarios, el objetivo es determinar si los beneficios obtenidos de un método justifican sus costos.

Permite definir la factibilidad de las alternativas planteadas o del proyecto a ser desarrollado. Proporciona una medida de los costos en que se incurren en la realización de un proyecto y a su vez comparar dichos costos previstos con los beneficios esperados de la realización de dicho proyecto.

La utilización de esta herramienta es restrictiva debido a la complicación de expresar todos los costos y beneficios en términos monetarios. Es importante destacar que en el análisis costo-beneficio lo que se considera es un ventaja para la empresa.

Su utilidad radica en que valorar la necesidad y oportunidad de la realización del proyecto, selecciona la alternativa más beneficiosa para la realización del proyecto, estima adecuadamente los recursos económicos necesarios.

5. Tiempos y Movimientos

El estudio de tiempo es la actividad que implica establecer un estándar de lapso permisible para realizar una tarea determinada.

En el siglo XVIII en Francia se inició el estudio de los tiempos, pero hasta finales del siglo XIX con las propuestas de Taylor se difundió y dio a conocer esta técnica donde se proponía que la administración se debía encargar de la planeación del trabajo de cada uno de sus empleados y que cada trabajo debía tener un estándar de tiempo basado en el trabajo de un operario muy bien calificado.

El estudio de movimientos es el análisis cuidadoso de los diversos movimientos que efectúa el cuerpo al ejecutar un trabajo, los objetivos son:

- a.** Minimizar el tiempo requerido para la ejecución de trabajos.
- b.** Conservar los recursos y minimizar los costos.
- c.** Eliminar o reducir los movimientos ineficientes y acelerar los eficientes.
- d.** Distribuir de manera equitativa el trabajo.
- e.** Comparar la eficiencia entre varios métodos.

Antes de realizar el estudio se debe considerar lo siguiente:

- f.** Para obtener un estándar es necesario que el operario domine a la perfección la técnica de la labor que se va a estudiar.
- g.** El empleado debe saber que será evaluado, así como su supervisor y los representantes del sindicato.
- h.** El analista debe estar capacitado y contar con todas las herramientas necesarias para realizar la evaluación.
- i.** La actitud del trabajador y del analista será tranquila y el segundo no ejercerá presiones sobre el primero. (19,29)

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La industria farmacéutica es un sector empresarial dedicado a la fabricación y comercialización de medicamentos para el tratamiento y también la prevención de las enfermedades, al igual que esta existen sectores que buscando nuevas formulaciones utilizan analitos que dicha industria ocupa de manera cotidiana, tal es el caso del ácido ascórbico, que tiene usos como: fármaco debido a sus efectos terapéuticos contra el escorbuto y las enfermedades respiratorias; como excipiente porque es un fuerte antioxidante; se ocupa en presentaciones cosméticas como regenerador de colágeno ya que interviene en el proceso de transformación de la prolina en hidroxidoprolina que es un constituyente esencial del colágeno; también se usa en suplementos alimenticios y en la industria alimentaria y confitera, donde es usado por su identidad como vitamina, entre otros.

Por ello es necesario contar con un adecuado control de calidad que signifique la excelencia de dichos productos, su seguridad y valor, lo cual se traduce en contar con métodos de análisis que sean confiables, además de fáciles y rápidos de realizar, que no exijan demasiado costo laboral y económico.

El método de análisis descrito en la FEUM 8^a. edición para ácido ascórbico es por volumetría utilizando como titulante una solución de Yodo, la cual es difícil de disolver llevándose un mayor tiempo, además de que son utilizados, diversos reactivos.

Existen también métodos de análisis para este analito usando la técnicas más avanzadas como la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC por sus siglas en inglés); debido a que algunos laboratorios al inicio de su labor, cuando comienzan a crecer no cuentan con los sistemas e instrumentación más complejos y de alta tecnología para sus análisis de rutina, se da la pauta para desarrollar técnicas alternativas, sugiriéndose también con objetivos docentes, como apoyo a universidades que no tienen dicha tecnología para realizar estas cuantificaciones.

Por ello se desarrollaron dos métodos alternativos que fueran confiables.

La volumetría es un método muy utilizado a lo largo de la historia debido a que es una técnica de amplia aplicación en análisis cuantitativo, es un método confiable y sencillo de realizar, debido a esto uno de los métodos desarrollados utiliza esta técnica, en el cual se buscó que las disoluciones fueran rápidas y de fácil preparación.

El otro método desarrollado recurre a la espectrofotometría ya que es una técnica rápida, confiable, precisa, versátil, fácil de usar, eficiente en costo y es capaz de cuantificar cantidades pequeñas de analito.

Después de desarrollar los métodos de análisis es necesario comprobar que sirven para el fin que se requieren por medio de la validación, seguido de ello, es necesario compararlos entre sí estadísticamente, buscando su equivalencia, determinando con esto si se pueden utilizar deliberadamente. Asimismo realizar un análisis de costo esperando sean económicamente factibles en su uso y como un punto determinante en la elección de uno u otro.

III. OBJETIVOS

A. Objetivo General

Desarrollar, validar y comparar dos métodos analíticos, uno espectrofotométrico y otro volumétrico, para cuantificar ácido ascórbico como materia prima.

B. Objetivos Particulares

1. Desarrollar un método analítico por volumetría para analizar cuantitativamente ácido ascórbico de acuerdo a su característica fisicoquímica de reductor.
2. Establecer un método de análisis cuantitativo por medio de la espectrofotometría, para ácido ascórbico en base a su capacidad de absorber la luz en el espectro ultravioleta.
3. Validar ambos métodos según los criterios establecidos en el Manual de Validación de Métodos Analíticos del Comité de Elaboración de Guías Oficiales de Validación de la Dirección General de Control de Insumos para la Salud.
4. Comparar estadísticamente los métodos desarrollados.
5. Analizar el costo económico y laboral de cada uno de los métodos por medio de un estudio de tiempos y costos.

IV. HIPÓTESIS

Los métodos desarrollados serán confiables, equivalentes entre sí, de acuerdo con los criterios de validación garantizando y proporcionando evidencia de la confiabilidad y efectividad de los mismos. La preferencia de uso de cada metodología será de acuerdo a su costo económico, laboral y al estudio de tiempo.

V. DESARROLLO EXPERIMENTAL

A. Instrumentos, Material y Reactivos

1. Instrumentos

- Balanza analítica OHAUS Analytical Standar.
- Espectrofotómetro Perkin Elmer UV/VIS Lambda 2.

2. Material

- Bureta de 50 mL (Kimax).
- Bureta de 10 mL (Kimax).
- Matraces volumétricos de 10, 25 y 100 mL (Pyrex).
- Pipetas volumétricas de 1 mL (Pyrex).
- Pipetas graduadas de 1 y 5 mL (Pyrex).
- Celdas de cuarzo.
- Soporte universal.
- Pinzas dobles de presión.
- Pissetas.
- Perilla de seguridad.
- Papel glassine.
- Agitador de vidrio.
- Espátula metálica.

3. Reactivos

- Ácido ascórbico, HELM, LHSB06093869.
- Ácido ascórbico, Farmacia Paris N 220.
- Ácido ascórbico, estándar secundario, MERCK, AAS-01-XC-R.
- 2,6-diclorofenol indofenol, RA MERCK L 862628.
- Carbonato de sodio, RA JT BAKER L K42149
- Ácido metafosfórico, RA JT BAKER, L 028380.
- Ácido clorhídrico, RA MERCK, L CO110041.
- Agua destilada, L: Planta Piloto Farmacéutica FES Zaragoza.

B. Diagrama de Flujo

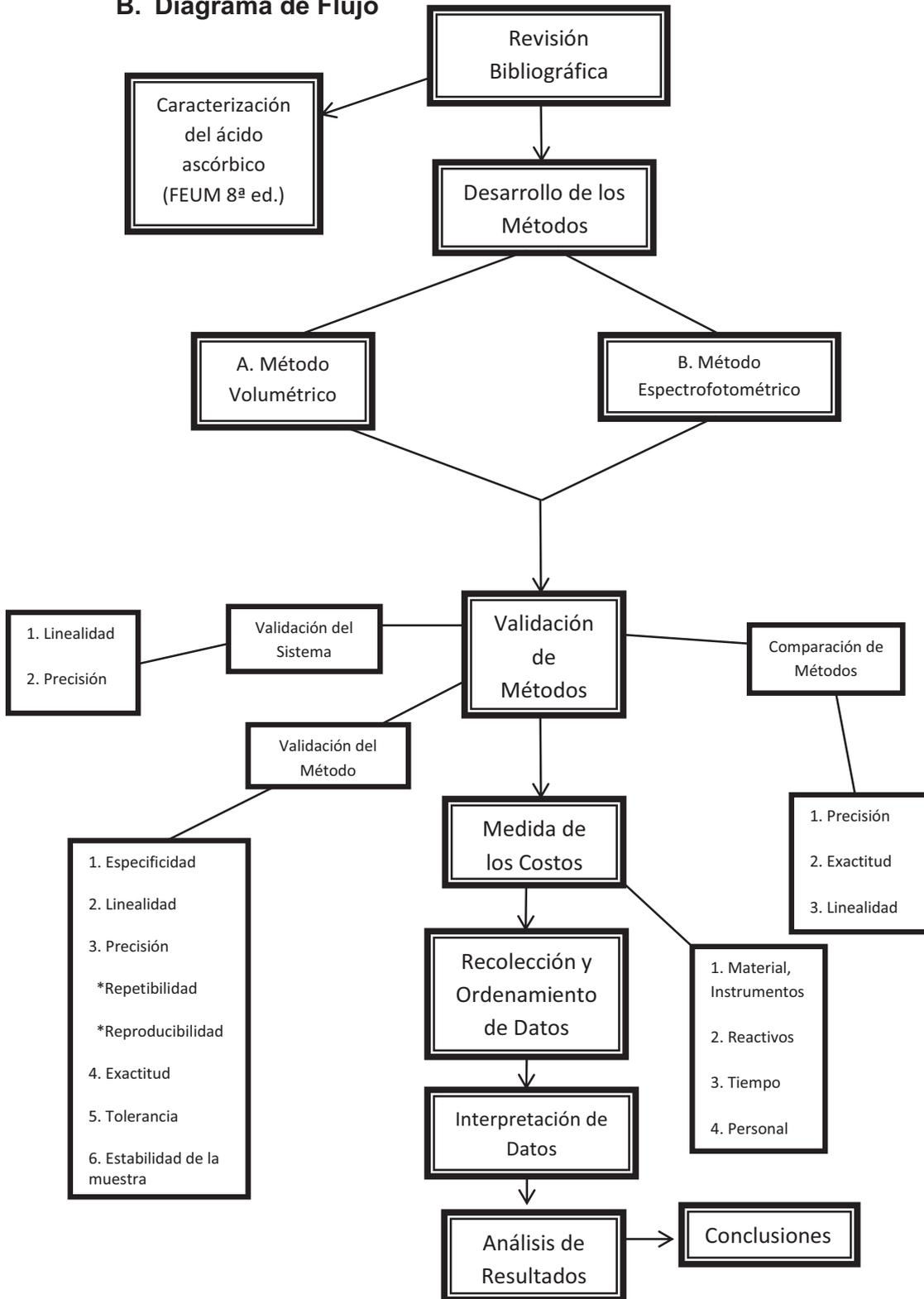


Figura 9. Diagrama de flujo.

C. Metodología

1. Caracterización del Ácido Ascórbico

Fue realizada la caracterización de ácido ascórbico de acuerdo a la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos octava edición, con las siguientes determinaciones:

a. Descripción

Se realizó un análisis visual de la muestra. 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.

b. Solubilidad

Se colocó un poco de muestra de ácido ascórbico en los disolventes a 25 °C con agitación vigorosa durante 30 segundos a intervalos de 5 minutos, durante 30 minutos.

Fácilmente soluble en agua; poco soluble en alcohol; casi insoluble en cloroformo.

c. Ensayos de Identidad

- 1) ESPECTRO UV. MGA036, se disolvieron 100 mg de la muestra en 100 mL de agua. Fue diluido 0.1 mL de esta solución a 100 mL con solución de ácido clorhídrico 0.01 M. El espectro UV de la solución resultante exhibe solamente un máximo a 243 nm.
- 2) Fueron disueltos 100 mg de la muestra en 2 ml de agua; se agregaron 0.2 mL de solución de ácido nítrico 2.0 M y 0.2 ml de solución de nitrato de plata 0.1 M. Se forma un precipitado gris oscuro.
- 3) Una solución (1:50) de la muestra fue preparada y se hizo reaccionar con SR de tartrato cúprico alcalino. A temperatura ambiente la muestra reduce la SR de tartrato cúprico alcalino lentamente.

d. Rotación Específica

MGA 0771. Se utilizó una solución al 10 por ciento de la muestra y se efectuó la determinación inmediatamente. Entre +20.5° y +21.5°.

e. pH

MGA 0701. Fue determinado en una solución de la muestra al 5.0 por ciento. Entre 2.1 y 2.6.

f. Residuo de la Ignición

MGA 0751. No más del 0.1 por ciento.

g. Metales Pesados

MGA 0561. Se disolvió 1g de la muestra en 25 mL de agua. No más de 20 ppm.

h. Valoración

MGA 0991. Fueron disueltos 100 mg de la muestra en una mezcla de 100 ml de agua libre de dióxido de carbono y 25 mL de solución de ácido sulfúrico 2.0 N. se tituló la solución inmediatamente con solución de yodo 0.1 N; se agregaron 2 mL de SI de almidón cuando se acercó al punto final. No menos de 99.0% y no más de 100.5%

2. Desarrollo de los Métodos

a. Método Volumétrico

Se hizo una revisión bibliográfica para determinar las características químicas y físicas del ácido ascórbico, buscando con ello la metodología ideal para su cuantificación.

De acuerdo a la capacidad reductora del ácido ascórbico, se escogió como titulante al 2,6-diclorofenol indofenol (DFI), que interacciona con el mismo en una reacción de oxido-reducción, que además es colorimétrica.

Fue adaptada una técnica para cuantificarlo en alimentos (19). Se preparó el DFI según dicha metodología, pesando 0.025 g del mismo con 0.021 g de carbonato de sodio, se disolvieron y aforaron a 500 mL con agua destilada. (0.05 mg/mL)

Para determinar la concentración de ácido ascórbico que debería interactuar con el DFI en la valoración, se hizo el cálculo del volumen aproximado que gastaría en cada ensayo.

Con base a la reacción química, se calculó tomando en consideración usar 1 mg de ácido ascórbico, con lo cual se consumirían alrededor de 37 mL de la solución de indofenol.

Para preparar las muestras de ácido ascórbico y estandarizar al DFI, se pesaron 0.1 g de ácido ascórbico estándar y se aforaron a 100 mL con agua destilada, se transfirió 1 mL de la solución (1 mg/mL) a matraces Erlenmeyer de 125 mL, fueron adicionados 3 mL de ácido m-fosfórico 3% y se añadieron 5 mL de agua destilada.

No obstante al realizar la titulación se gastaban más de 50 mL de DFI, por lo que se ajustó la cantidad de ácido ascórbico estándar a la mitad, es decir, pesar 0.05 g.

La valoración se hizo de la misma manera usando 0.05 g de ácido ascórbico muestra.

b. Método Espectrofotométrico

Con base a las propiedades del ácido ascórbico descritas en las referencias, se probó inicialmente un medio de acuerdo a su facilidad de uso y economía solución acuosa.

Se realizó el “barrido” para determinar el máximo de longitud de onda (λ max [nm]) a diferentes concentraciones seleccionándose un punto intermedio de 6 $\mu\text{g/mL}$ (la concentración de 20 $\mu\text{g/mL}$ daba absorbancias mayores a 1.0). Para ello se pesaron 0.05 g de ácido ascórbico y se llevaron a un volumen de 10 mL de agua destilada. Se tomó una alícuota de 1 mL de la solución y fue colocada en un matraz volumétrico de 100 mL, se aforó con el medio.

Fueron transferidos 3 mL a un matraz volumétrico de 25 mL y se aforó nuevamente con el medio.

Posteriormente se prepararon 10 muestras con la concentración elegida como el 100% (6 $\mu\text{g/mL}$) y fueron leídas consecutivamente, se calculó la desviación estándar y la media.

Pero los datos no fueron los esperados y se cambió el medio: solución ácida de ácido clorhídrico 0.1 N, con el cual se realizaron las mismas pruebas, dando resultados efectivos, por ello se eligió como el medio idóneo.

Después de lo anterior fue realizada la curva de calibración pesando 0.05 g de ácido ascórbico estándar, diluyéndolos en 10 mL de HCl 0.1 N, de esta solución se tomó 1 mL y fue diluido en 100 mL del mismo medio.

Fueron tomadas 5 alícuotas, 1, 2, 3, 4 y 5 mL, cada una se aforó a 25 mL con solución HCl 0.1 N, el punto 0 se tomó con el medio de solución sin muestra. Con lo anterior se obtuvo una curva estándar de 0, 2, 4, 6, 8 y 10 $\mu\text{g/mL}$.

3. Validación de Métodos Analíticos

Se evaluaron los parámetros para un método de control de calidad (Tabla 1)

a. Validación del Sistema

1) Linealidad del Sistema

Se determinó construyendo una curva de calibración (Concentración vs Respuesta medida) utilizando cinco niveles de concentración (80, 90, 100, 110 y 120%) preparados a partir de la misma solución patrón y haciéndose el análisis por triplicado en cada nivel.

2) Precisión

Se determinó con seis alícuotas de una muestra homogénea (solución estándar de ácido ascórbico correspondiente al 100%). Las pruebas fueron independientes.

b. Validación del Método

1) Especificidad

Fue determinada en el método volumétrico valorando una solución sin ácido ascórbico (solo ácido m-fosfórico y agua), con la solución de DFI por triplicado.

En el método espectrofotométrico se determinó la Absorbancia de la solución blanco de HCl 0.1 N a 242 nm.

2) Linealidad del Método

Se prepararon placebos adicionados con cantidades conocidas de ácido ascórbico que incluían la concentración determinada como el 100% y concentraciones por debajo y por arriba de la misma (5 niveles). Seguido de esto se analizó cada nivel por triplicado con los métodos propuestos.

3) Exactitud

Fue determinada de seis placebos cargados de manera independiente con la cantidad necesaria de la sustancia de interés (ácido ascórbico) para obtener la concentración al 100%, utilizando los métodos propuestos.

4) Precisión

- a) **Repetibilidad.** Se determinó analizando por sextuplicado una muestra homogénea de ácido ascórbico con la concentración al 100%, bajo las mismas condiciones de operación y por el mismo analista.
- b) **Reproducibilidad (Precisión intermedia).** Se analizó por triplicado una muestra homogénea de la muestra al 100% por dos analistas en dos diferentes días.

5) Tolerancia

Se establecieron los factores ajenos a los métodos como diferentes equipos y diferentes lotes, los cuales se pueden presentar al reproducir dichos métodos con otras condiciones de uso. Fue analizada la muestra por triplicado a cada condición. Se reportaron los resultados.

6) Estabilidad de la Muestra

Se determinó comparando los resultados de los análisis iniciales de tres muestras con los obtenidos de las mismas muestras después de permanecer durante un tiempo determinado en diferentes condiciones.

Fueron almacenadas muestras de ácido ascórbico bajo distintas condiciones (temperatura ambiente, obscuridad y refrigeración) durante el tiempo establecido de 0, 1 y 2 horas. Fueron analizadas bajo las mismas condiciones de operación y por el mismo analista.

c. Comparación de Métodos Analíticos

1) Precisión

Se estimó la varianza de cada método, estableciendo una hipótesis nula considerando que sean iguales, calculando un intervalo de confianza para la relación de varianzas, en donde relación se define como la varianza del método 1 dividida por la varianza del método 2 , en dicho intervalo debe localizarse el valor de 1.

2) Exactitud del Método

Se calculó el intervalo de confianza para la diferencia de medias aritméticas del porcentaje recuperado, en el cual debe estar el valor de cero.

3) Linealidad del Método

Fue calculado el intervalo de confianza para la diferencia de la pendiente de cantidad adicionada vs cantidad recuperada en el que debe localizarse el valor de cero.

También se calculó el I.C para la diferencia de las ordenadas al origen de cantidad adicionada-cantidad recuperada, donde debe encontrarse el valor de cero.

4. Comparación de Costos y Evaluación del Tiempo Estimado de Operación

Se investigaron los precios de: instrumentación, material básico y reactivos para la realización de cada método, así como el sueldo promedio de un analista.

Fue medido el tiempo necesario en la realización de cada método analítico, por medio de un cronómetro, dejándolo correr mientras duró la operación.

VI. RESULTADOS Y ANÁLISIS

A. Caracterización de Ácido Ascórbico

Tabla 2. Caracterización del ácido ascórbico.

ANÁLISIS	LÍMITES	RESULTADO
Descripción	Cristales o polvo blanco o ligeramente amarillo, descompone por exposición gradual a la luz. En estado seco es estable al aire, en solución acuosa se oxida.	CONFORME
Solubilidad	Fácilmente soluble en agua	1-10 partes CONFORME
	Soluble en alcohol	31-100 partes CONFORME
	Casi insoluble en éter dietílico y cloroformo	Más de 10000 partes CONFORME
Ensayos de identidad		
1) Espectro UV	Máximo a 243 nm	CONFORME
2)	Se forma un pp gris	CONFORME
3)	La solución de la muestra reduce lentamente SR de tartrato cúprico	CONFORME
Rotación específica	Entre +20.5° y +21.5°	+21° CONFORME
pH	Entre 2.1 y 2.6	pH: 2.1 CONFORME
Residuo de la ignición	No más de 0.1%	0.036% CONFORME
Metales pesados	No más de 20 ppm	CONFORME Menos de 20 ppm
Valoración	Contiene no menos de 99.0% y no más de 100.5%	99.34% CONFORME

Como se observa en la tabla, todas las pruebas presentaron resultados conformes, que en control de calidad deben cumplir.

Esto indica que es una muestra confiable, ya que se trata de ácido ascórbico según la prueba de descripción y los ensayos de identidad, al igual solubilidad, rotación específica y pH.

La prueba de metales pesados determina el contenido de impurezas metálicas la cual muestra que no exceden el límite especificado para ácido ascórbico.

La valoración señala la pureza de la muestra que se analiza, en este caso para ácido ascórbico los resultados fueron conformes, pues se obtuvo un valor dentro del intervalo establecido en la FEUM 8ª edición. Por lo tanto el ácido ascórbico cumple con el control de calidad para ser utilizado como analito.

B. Desarrollo de los Métodos

1. Método Volumétrico

El ácido ascórbico puede ser determinado químicamente en el laboratorio basándose en su fuerte capacidad reductora, por ello se escogió como titulante al DFI, el cual oxida al ácido ascórbico en una reacción fácilmente visible, (vire de azul a un tono rojo ténue).

Para comprobarlo se adaptó un método utilizado para cuantificar ácido ascórbico en alimentos (19).

Se preparó al DFI según la técnica establecida, pesando 0.025 g del mismo con 0.021 g de carbonato de sodio, el cual mantiene el medio básico donde el indofenol mantiene el azul característico.

Fue utilizado una solución de ácido m-fosfórico pues inactiva la oxidasa ascórbica manteniendo al ácido ascórbico. Igualmente sirve para eliminar posibles impurezas

Para determinar el volumen gastado de DFI se hizo el cálculo con base a la reacción química tomando en consideración 1 mg de ácido ascórbico:

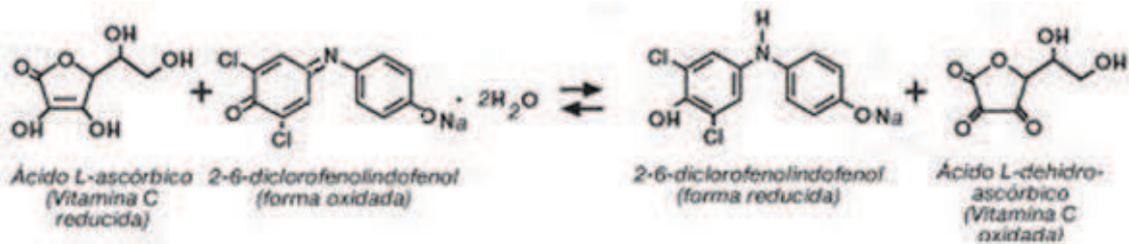


Figura 10. Reacción química entre ácido ascórbico y 2,6-diclorofenol indofenol sal sódica dihidratado (20).

$$PM_{C_6H_8O_6} = 176.12$$

$$Peq_{C_6H_8O_6} = 88.06$$

$$PM_{C_{12}H_6Cl_2NNaO_2 \cdot 2H_2O} = 326.09$$

$$Peq_{C_{12}H_6Cl_2NNaO_2 \cdot 2H_2O} = 163.045$$

$$163.045 \text{ mg } 2,6\text{-diclorofenol indofenol} \text{ ----- } 88.06 \text{ mg } \text{ácido ascórbico}$$

$$X \text{ ----- } 1 \text{ mg } \text{ácido ascórbico}$$

$$X = 1.8515 \text{ mg } 2,6\text{-diclorofenol indofenol}$$

Por cada miligramo de ácido ascórbico reaccionan 1.8515 mg de DFI.

$$1.8515 \text{ mg } 2,6\text{-diclorofenol indofenol} \text{ ----- } 1 \text{ mg } \text{ácido ascórbico}$$

$$0.05 \text{ mg } 2,6\text{-diclorofenol indofenol} \text{ ----- } X$$

$$X = 0.027 \text{ mg } \text{ácido ascórbico}$$

0.027 mg de ácido ascórbico reaccionan por cada mililitro de 2,6-diclorofenol indofenol.

$$1 \text{ mL } 2,6\text{-diclorofenol indofenol} \text{ ----- } 0.027 \text{ mg } \text{ácido ascórbico}$$

$$X \text{ ----- } 1 \text{ mg } \text{ácido ascórbico}$$

$$X = 37.03 \text{ mL } 2,6\text{-diclorofenol indofenol}$$

Sin embargo cuando se hizo este análisis, el volumen gastado pasaba de los 50 mL de titulante, por ello se buscó que gastará una menor cantidad porque no se puede estar llenando nuevamente la bureta a mitad de un análisis, a causa de ello existe un error mayor, conjuntamente se gastaría mucho reactivo.

Se decidió colocar la mitad de la concentración de ácido ascórbico (0.5mg/mL). Con ello se esperaba gastara aproximadamente 18 mL, pero el volumen fue mayor (alrededor de 24 mL).

Al calcular la concentración de DFI se obtuvo lo siguiente:

$$N_{2,6\text{-diclorofenol indofenol}} = 2.3717E-4 \text{ N}$$

$$m_{2,6\text{-diclorofenol indofenol}} = 19.33\text{mg}/500 \text{ mL} = 0.03866 \text{ mg/mL} \approx 20\text{mg en } 500 \text{ mL}$$

Esto indica que la concentración del indofenol no es la esperada, lo que no significó gran problema puesto que se estandarizó y con ello los cálculos posteriores fueron confiables.

Tal relación entre la concentración de DFI y el volumen gastado se comprueba con los siguientes cálculos:

$$\begin{array}{l} 1.8515 \text{ mg } 2,6\text{-diclorofenol indofenol} \text{ ----- } 1 \text{ mg } \text{ácido ascórbico} \\ 0.03866\text{mg } 2,6\text{-diclorofenol indofenol} \text{ ----- } X \end{array}$$

$$X = 0.0209 \text{ mg } \text{ácido ascórbico}$$

0.0209 mg de ácido ascórbico reaccionan por cada mililitro de 2,6-diclorofenol indofenol.

$$\begin{array}{l} 1 \text{ mL } 2,6\text{-diclorofenol indofenol} \text{ ----- } 0.0209 \text{ mg } \text{ácido ascórbico} \\ X \text{ ----- } 0.5 \text{ mg } \text{ácido ascórbico} \end{array}$$

$$X = 23.9 \text{ mL } 2,6\text{-diclorofenol indofenol}$$

Por esta razón el volumen consumido en la reacción era más de lo esperado, lo que no fue mayor inconveniente, pues se conoce la concentración del reactivo titulante.

2. Método Espectrofotométrico

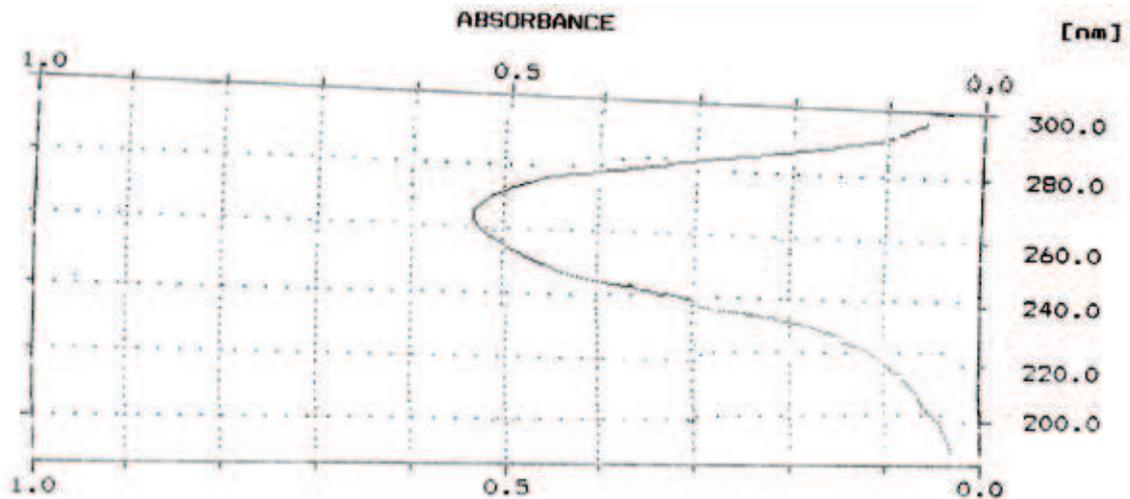


Figura 11. Espectro UV “Barrido” Scan Perkin Elmer λ 2 de la muestra de ácido ascórbico en solución acuosa. (λ máx: 263nm).

Según la bibliografía el espectro UV reportado es con ácido ascórbico al 0.002%, por ello la concentración que se buscaba en un principio para el 100% era de 20 μ g/mL, no obstante aunque reportaba la longitud de onda equivalente a lo descrito en las referencias, la Absorbancia fue mayor a 1.0, no cumpliendo con la linealidad de la ley de Beer. Es por esto que se estudiaron diferentes concentraciones al máximo de longitud de onda (263 nm), obteniéndose que las de un valor menor a 1.0 estaban en el rango de 2 a 10 μ g/mL. Se decidió dejar un punto intermedio para el 100% en 6 μ g/mL, con esta concentración se realizó de nuevo el “barrido” el cual es el reportado en los resultados (figura 11), en el mismo se observa el máximo a 263 nm.

Tabla 3. Absorbancia de las Muestras de Ácido ascórbico en Solución Acuosa

Muestra (6µg/mL)	Absorbancia	
1	0.571	
2	0.564	
3	0.483	
4	0.342	x = 0.4599
5	0.425	s = 0.0951
6	0.378	C.V = 20.6784%
7	0.527	
8	0.429	
9	0.318	
10	0.562	

Después de notar que los datos de diferentes muestras variaban considerablemente, se tomaron diez lecturas de muestras independientes para evaluar la variabilidad entre ellas.

Como puede observarse en la tabla, los datos varían entre sí en un alto grado, lo cual se confirma con el valor de la desviación estándar y el coeficiente de variación, expresando un grado considerable de dispersión, esto es debido probablemente a la poca estabilidad que presenta el ácido ascórbico en agua, por la fotosensibilidad del mismo.

Por tal motivo se decidió usar otro de los medios que reportaban las referencias: medio ácido.

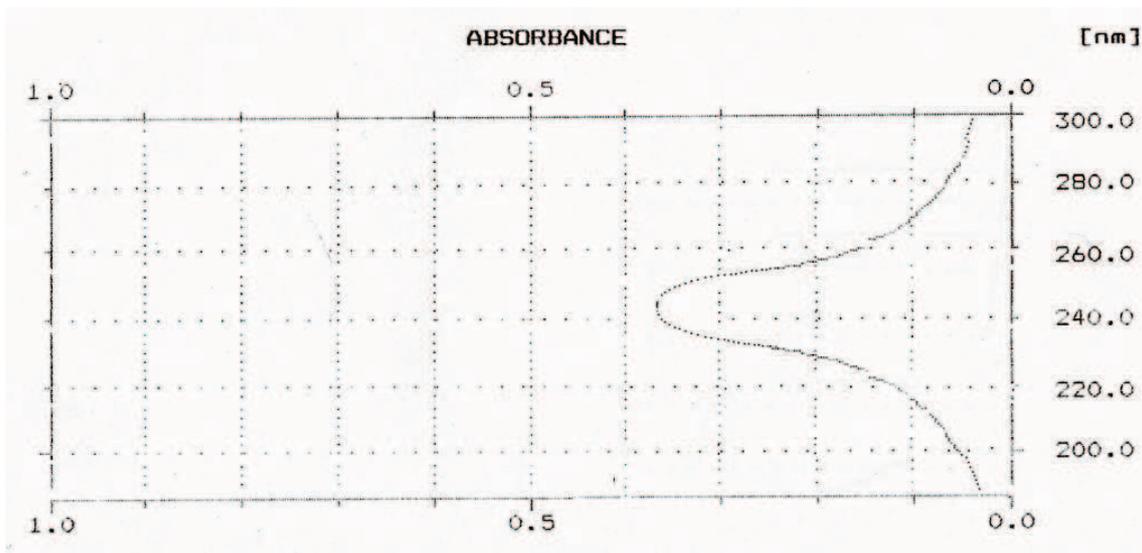


Figura 12. Espectro UV “Barrido” Scan Perkin Elmer λ 2 de la muestra de ácido ascórbico en solución ácida HCl 0.1 N (λ máx: 242nm)

Se usó HCl 0.1 N como medio ácido y fue realizado el “barrido” obteniéndose el máximo de longitud de onda a 242 nm, pero igual que en el medio acuoso la concentración de 20 μ g/mL daba como resultado absorbancias mayores a 1.0. Debido a esto se utilizó la concentración de 6 μ g/mL como el 100% (figura 12) e igualmente se analizaron diez muestras.

Tabla 4. Absorbancia de las Muestras de Ácido ascórbico en Solución Ácida

Muestra (6 μ g/mL)	Absorbancia	
1	0.380	
2	0.381	
3	0.384	
4	0.379	$x = 0.3809$
5	0.380	$s = 1.7288E-3$
6	0.382	$C.V = 0.4538\%$
7	0.378	
8	0.381	
9	0.382	
10	0.382	

Los resultados indican conforme a la desviación estándar y el C.V que el grado de dispersión con respecto al valor promedio es pequeño, por lo cual el método dará el mismo valor o cercano a este cada vez que se analice la muestra.

Puesto que los datos fueron los deseados, se procedió a realizar la curva estándar.

Tabla 5. Curva Estándar para Ácido Ascórbico

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbancia	
0	0	r = 0.9992
2	0.133	r² = 0.9984
4	0.270	m = 0.0621
6	0.388	b = 0.0084
8	0.493	
10	0.629	

Como se observa en la tabla, la curva estándar es confiable ya que el valor del coeficiente de determinación es mayor a 0.98 indicando la dependencia de la Absorbancia con la concentración, por esto puede utilizarse para determinar las concentraciones de las muestras estudiadas comparándolas con la línea de calibrado.

C. Validación de Métodos Analíticos

1. Sistema

Tabla 6. Linealidad del Sistema.

Sistema Linealidad	Método 1	Método 2	Criterio
	Volumétrico	Espectrofotométrico	
r^2	0.9979	0.9990	$r^2 \leq 0.98$
m	0.0477	0.0621	$m = 1$
b	-0.1166	0.0071	$b = 0$
Modelo	$y = 0.0477x - 0.1167$	$y = 0.0621x + 0.00675$	
t_{tab} para b	2.1604	2.1604	$t_{\text{calc}} \leq t_{\text{tab}}$
t_{calc} para b	-0.3823	1.5394	
I.C. para b	-0.7757 a 0.5424	-0.0028 a 0.0169	Incluir a 0
F_{tab}	5.32	5.32	$F_{\text{calc}} \leq F_{\text{tab}}$
F_{calc}	6043.0260	6815.6708	
C.V.	0.0335	0.0401	$C.V. \leq 1.5\%$

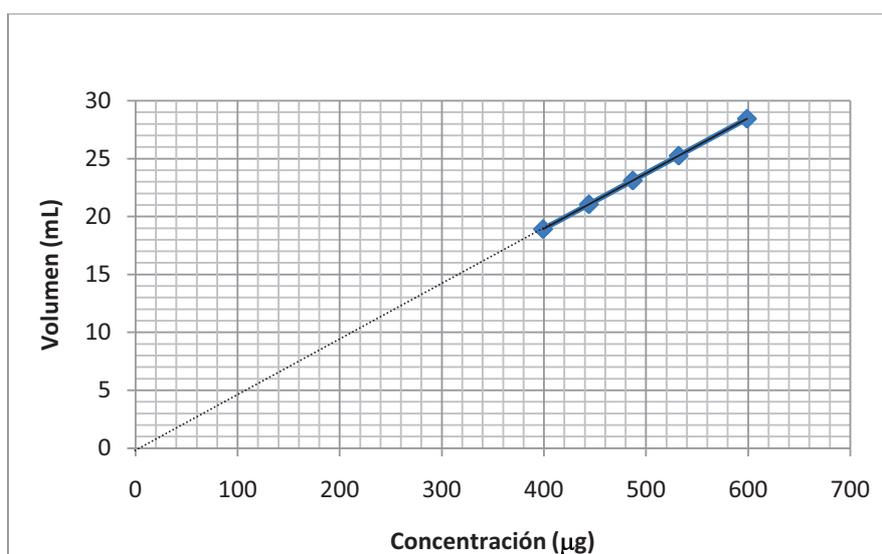


Figura 13. Valoración de ácido ascórbico por método volumétrico (Linealidad de sistema)

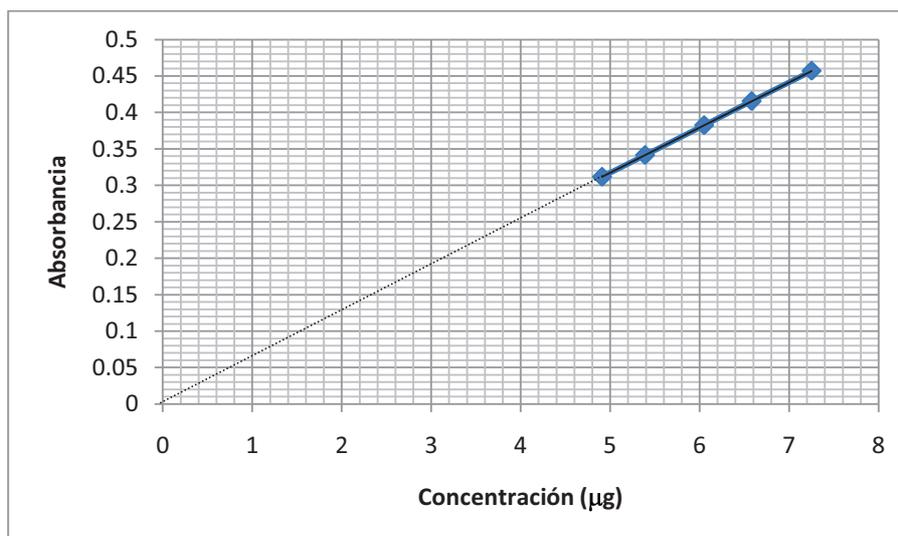


Figura 14. Valoración de ácido ascórbico por método espectrofotométrico (Linealidad del sistema)

Este criterio de la validación permite establecer la confiabilidad del sistema antes del procesamiento de las muestras durante el uso rutinario del método, estableciendo si las mediciones son susceptibles a los cambios de las condiciones analíticas, las que deben ser controladas adecuadamente o incluir una precaución.

Se busca que el equipo e instrumentos de medición, las operaciones analíticas y las muestras que serán utilizadas constituyan un sistema integral.

En el caso del método volumétrico se evalúa a la bureta y en el método espectrofotométrico al detector UV.

En cuanto a linealidad los métodos cumplen con el criterio de r^2 mayor a 0.98, lo que significa que existe un 99.79% de variación de la concentración que está asociada a la variación del volumen gastado, en el caso del método volumétrico; y un 99.90% en el método espectrofotométrico, estableciendo la correlación entre las variables y su dependencia.

También al ser valores cercanos a 1 indica un valor pequeño del error (ξ) presentándose así datos confiables.

En el caso de la ordenada al origen el valor obtenido en cada uno de los métodos no es cero, sin embargo se realizó el estadígrafo de contraste con la t de Student en donde los métodos presentaron una t_{calc} menor a la t_{tablas} por lo que la hipótesis nula de que b es igual a cero se acepta; además el intervalo de confianza de uno y otro incluye el valor de cero, por lo tanto $b \approx 0$.

El análisis de varianza indica que **y**, en este caso la respuesta, depende de la concentración de ácido ascórbico que se encuentra en la muestra; esto se concluye porque la F calculada es mucho mayor que la F de tablas por lo que la hipótesis alterna de **y** dependiente de **x** se acepta.

El parámetro de coeficiente de variación en los dos métodos analizados es consistente con el valor requerido de **C.V** ≤ 1.5%, indicando que existe una variación aceptable entre los resultados.

Con todo lo anterior queda demostrado que el método volumétrico y espectrofotométrico, presentan resultados lineales, esto quiere decir que la cantidad de Indofenol gastado y la Absorbancia dependen de la cantidad de ácido ascórbico existente en las muestras analizadas. Esto puede observarse en las gráficas, las cuales ya tienen consideradas el error, ya que presentan la relación lineal, mientras se aumenta la concentración de ácido ascórbico en las muestras que se analicen, se incrementará la respuesta (volumen gastado, absorbancia), lo cual es lo ideal.

Tabla 7. Precisión del Sistema

	Método 1	Método 2	
	Volumétrico	Espectrofotométrico	
Sistema			Criterio
Precisión			
C.V.	0.3256	0.6067	C.V. ≤ 1.5%

Para determinar la efectividad del sistema también es necesario contar con datos precisos verificando si el método es capaz de dar resultados semejantes o alrededor de un valor medio cuando se hacen análisis repetidos en una muestra homogénea. Para ello se calculó el coeficiente de variación en seis de las muestras, determinando la variación entre estas. Los resultados son aceptados debido a que C.V es menor a 1.5%.

Según los resultados obtenidos los métodos son lineales y precisos en cuanto a su sistema se refiere, es decir, es confiable y funciona correctamente antes del proceso de las muestras durante el uso rutinario de los métodos. Los instrumentos y equipo fueron adecuados, ya que solo se determinó la respuesta en relación a la concentración, y no lo que es capaz de cuantificar.

2. Método

Tabla 8. Especificidad

	Método 1	Método 2	
	Volumétrico	Espectrofotométrico	
Método	Criterio		
Especificidad	0.2 mL	0.000 ABS	Solo cuantifica a la sustancia de interés

El método 1 demostró ser específico al mostrarse el vire de color a los 0.2 mL, esto significa que el método no cuantifica los componentes de la matriz que no sean ácido ascórbico, como el ácido meta fosfórico. Esto ocurre también en el método 2 ya que al poner como blanco la solución de HCl 0.1 N, la absorbancia del medio sin ácido ascórbico fue igual a cero.

Con este parámetro se determinó que los métodos son selectivos, capaces de detectar únicamente el analito en la matriz determinada.

Tabla 9. Linealidad del método.

	Método 1	Método 2	
	Volumétrico	Espectrofotométrico	
Método			Criterio
Linealidad			
r^2	0.9973	0.9995	$r^2 \leq 0.98$
m	0.9982	0.9945	$m = 1$
b	-5.1497	0.0202	$b = 0$
Modelo	$y = 0.9982x - 5.1498$	$y = 0.9944x + 0.0201$	
t_{tab} para b	2.1604	2.1604	$t_{\text{calc}} \leq t_{\text{tab}}$
t_{calc} para b	-0.7040	0.5535	
I.C. para b	-20.9503 a 10.6508	-0.0586 a 0.0990	Incluir a 0
t_{tab} para m	2.1604	2.1604	$F_{\text{calc}} \leq F_{\text{tab}}$
t_{calc} para m	69.0901	166.0829	$t_{\text{calc}} \leq t_{\text{tab}}$
I.C. para m	0.9670 a 1.0294	0.9815 a 1.0074	Incluir a 1
F_{tab}	5.32	5.32	$F_{\text{calc}} \leq F_{\text{tab}}$
F_{calc}	4773.4409	27583.5287	
C.V.	0.7737	0.3249	$C.V. \leq 1.5\%$

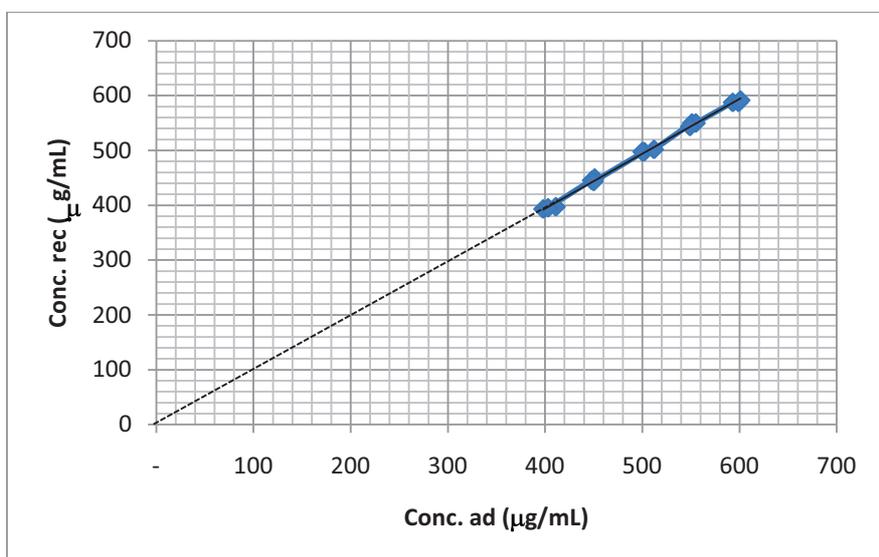


Figura 15. Valoración de ácido ascórbico por método volumétrico (Linealidad del Método).

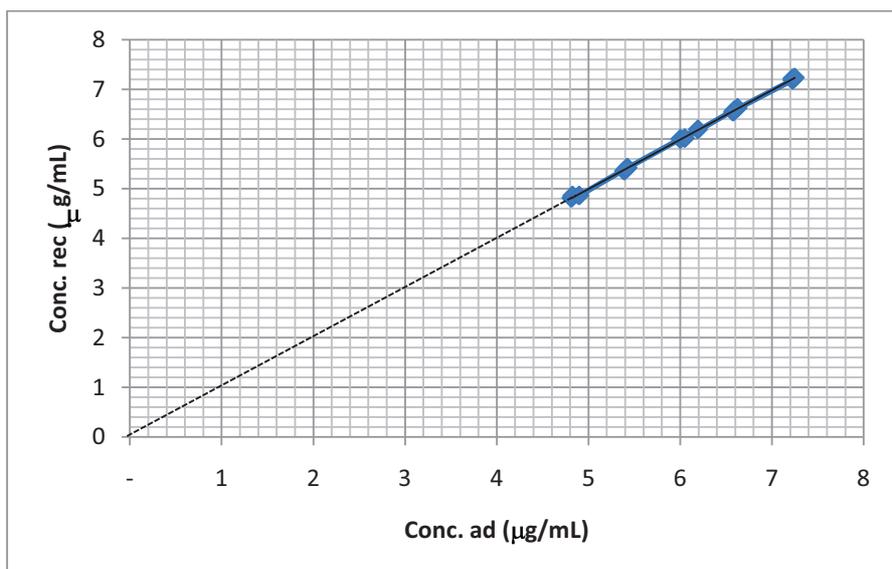


Figura 16. Valoración de ácido ascórbico por método espectrofotométrico (Linealidad del método).

Ambos métodos tienen un coeficiente de determinación de 0.99, cumpliendo así con el supuesto de $r^2 \geq 0.98$. Se sabe que mientras este valor sea más cercano a 1, el error (ξ) es más pequeño por lo que los datos son más confiables.

Los resultados también nos indican la dependencia entre x y y , que son las variables, esto es porque existe una relación del 99%, siendo así un criterio trascendente en la determinación de la linealidad.

En el caso de la ordenada al origen, se realizó el estadígrafo de contraste, ya que en ninguno de los casos es estrictamente cero. Sin embargo la inferencia estadística indicó que $b \approx 0$

En el caso de m también se realizó el estadígrafo de contraste tomándose como hipótesis nula $m=0$, y como hipótesis alterna $m>1$, esto porque se busca que la pendiente tenga un valor mayor a cero para que exista una relación dependiente entre la concentración recuperada (eje de las y) y la concentración adicionada (eje de las x), que cumple cada uno de los métodos puesto que el valor de t calculada es mayor a la t de tablas, indicando el rechazo de la hipótesis nula, y que m es mayor a cero, teniéndose una línea diagonal en la gráfica de dispersión mostrando una respuesta dependiente.

Sin embargo el valor ideal de m es 1 por lo tanto al realizar el intervalo de confianza, se confirmó en ambas metodologías que este incluía el valor de 1, $m \approx 1$.

El análisis de varianza se requiere para determinar la dependencia entre las variables. Al ser mayor la **F** calculada que la **F** de tablas, se rechaza la hipótesis nula de que **y** es independiente de **x**, consecuentemente es consistente con lo evaluado en los estadígrafos de contraste, y se considera una relación lineal entre la concentración adicionada y la concentración recuperada, lo cual indica que no existe una variación considerable en la cantidad de ácido ascórbico recobrado por la valoración, en relación a la cantidad real en las muestras, demostrando así mismo que el método es capaz de trabajarlas apropiadamente cuantificando al analito en las cantidades usadas.

La **F** calculada también proporciona datos sobre la sensibilidad de los métodos considerando que entre mayor sea dicho valor, mayor será, confirmando que la espectrofotometría es más sensible que la volumetría.

La variación mínima entre los valores queda demostrada con el coeficiente de variación, donde en el método 1 es de 0.7737% y en el método 2 de 0.3249%, cumpliendo la consideración de menor a 2% en métodos químicos y espectrofotométricos y menor a 3% en métodos titrimétricos.

Las gráficas demuestran visualmente una relación lineal comprobando mediante el análisis estadístico el grado de dispersión minúscula considerándose rectas. Al intrapolarse toca el origen (**b**≈0).

Todo esto indica que el método es capaz de cuantificar al analito con variaciones pequeñas, entre lo que se recupera y lo que adiciona.

Con ello se evalúa el sesgo o intervalo (error sistemático), teniéndose que los métodos trabajan adecuadamente una concentración de ácido ascórbico de 80% a 120%.

Tabla 10. Exactitud del Método

Método Exactitud	Método 1	Método 2	Criterio
	Volumétrico	Espectrofotométrico	
C.V.	0.6597	0.3151	$C.V. \leq 2\%^1$ y $C.V. \leq 3\%^2$
t_{tab} para μ	2.571	2.571	$t_{calc} \leq t_{tab}$
t_{calc} para μ	-2.5017	-1.4360	
I.C. para μ	98.6431 a 100.0185	99.4855 a 100.1458	Incluir a 100

1. Para métodos químicos y espectrofotométricos; 2. Para métodos titrimétricos

Este parámetro se usó para medir el grado de concordancia entre los valores obtenidos y el valor verdadero o ideal, el cual es el 100% de ácido ascórbico.

Para ello se busca un **C.V** menor al 3% en el método 1, y menor al 2% en el método 2, indicando así una desviación en relatividad pequeña, entre las determinaciones en los porcentajes de recobro.

El método 1 obtuvo un **C.V** de 0.6597% y número 2 de 0.3151% cumpliendo con los criterios correspondientes.

Al ser 100% el valor esperado, los resultados deben ser cercanos a éste número por lo que el promedio recuperado, debe estar considerado dentro del rango establecido de 98 a 102% en las metodologías por espectro; y 97 a 103% en las titrimétricas.

El promedio de los porcentajes recuperados en cada método cumple con esto, además de que la inferencia estadística respalda dichos resultados. En ambos intervalos de confianza se incluye al 100, por ello se tiene que el promedio de recobro es casi igual a 100 (promedio de recobro \approx 100), por lo que las metodologías exhiben proximidad al resultado ideal, presentando un valor de sesgo cercano a 100, por tanto los métodos son exactos.

Tabla 11. Precisión del Método. Repetibilidad

	Método 1	Método 2	
	Volumétrico	Espectrofotométrico	
Método			Criterio
Precisión			
Repetibilidad			
σ_x	0.5982	0.2871	
σ_x^2	0.3578	0.0825	
C.V.	0.6597	0.3151	C.V. \leq 2% ¹ y C.V. \leq 3% ²
χ^2_{tab}	12.8325	12.8325	$\chi^2_{calc} \leq \chi^2_{tab}$
χ^2_{calc}	0.5367	0.1237	
I.C. para σ_o	0.1673 a 2.5827	0.0386 a 0.5952	Incluir a σ^2

1. Para métodos químicos y espectrofotométricos; 2. Para métodos titrimétricos

El criterio de aceptación para este punto es el mismo que para exactitud, refiriéndose al coeficiente de variación. Como puede observarse el método volumétrico tiene un C.V igual a 0.6597%, siendo este menor al 3 % que se requiere por lo que es repetible. Lo mismo ocurre en el método espectrofotométrico que presenta un C.V de 0.3151% que es menor a 2%.

Se utilizan también las varianzas poblacionales, esperando que sean menores al 2%, mostrando una variabilidad pequeña, que es el caso de los métodos.

Así mismo la inferencia estadística para el cuadrado de las varianzas arroja un intervalo de confianza que debe contener dicho valor, tanto el método volumétrico como el método espectrofotométrico cumplen con esto.

Lo anterior que las metodologías presentan concordancia relativa entre las determinaciones realizadas en las mismas condiciones de análisis, y no existe variación considerable entre los resultados de las muestras, al aplicar los métodos en una corrida analítica.

Tabla 12. Precisión del Método. Reproducibilidad.

	Método 1	Método 2	
	Volumétrico	Espectrofotométrico	
Método			Criterio
Precisión			
Reproducibilidad			
F_{tab}	5.32	5.32	$F_{calc} \leq F_{tab}$
F_{calc} Analista	1.1567	0.3816	
F_{calc} Día	1.1609	1.0704	
F_{calc} Analista-Día	1.5417	1.2880	

Al buscar que los métodos de análisis sean reproducibles, se busca que factores como el día en que se realiza, o el analista que lo lleve a cabo, no influyan en los resultados, esperándose que sean confiables bajo cualquier cambio que sea necesario, ya que constantemente los analistas realizan diversos estudios, en un estudio intra laboratorio.

Cuando se evaluó el efecto del analista sobre el método en los diferentes días, se observó el comportamiento de los métodos con dos factores fundamentales.

Ya que es necesario establecer la fuente de variación de los métodos se utilizó el cálculo del análisis de varianza, porque es una técnica mediante la cual la variación total presente en un conjunto de datos se divide en varios componentes.

Cada uno de los cuales tiene asociada una fuente de variación específica, de manera que en el análisis es posible conocer la magnitud de las contribuciones de cada fuente de variación a la variación total, lo que es el error que forma parte de éste análisis y que se toma en consideración.

El modelo hipotético para ambos métodos se realizó según el caso particular de dos analistas, dos diferentes días y tres repeticiones; el cual es:

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

donde se tomó en consideración al análisis del ácido ascórbico de la késima muestra analizada por el iésimo analista en el jésimo día (y_{ijk}); la media poblacional (μ) el efecto del día anidado en el analista ($\delta_j(i)$) y el error de los métodos analíticos ($\xi_{k(ij)}$).

Para ello se buscó que la **F** de Fisher de tablas con una probabilidad acumulada de 0.975 sea mayor que las **F** calculadas.

Según los resultados obtenidos en el caso de los dos métodos, la **F** calculada referente al analista, al día y a su interacción, son menores a 5.32, indicando que ninguno de los factores estudiados influye en los resultados del método. Esto se explica de la siguiente manera: los métodos analíticos son reproducibles por los analistas y en distintos días por un mismo analista.

No importa el día en que se realicen o la persona que lo analice, se obtendrán los mismos resultados.

Tabla 13. Tolerancia de los Métodos.

	Método 1	Método 2	
	Volumétrico	Espectrofotométrico	
Método			Criterio
Tolerancia			
Dif Material o Instrumento			
C.V.	0.7414	0.1099	C.V. ≤ 2% ¹ y C.V. ≤ 3% ²
Dif Lote			
C.V.	0.4372	0.0883	C.V. ≤ 2% ¹ y C.V. ≤ 3% ²

1. Para métodos químicos y espectrofotométricos; 2. Para métodos titrimétricos

Este aspecto de la validación es determinante para verificar si condiciones externas tales como, instrumentos y lotes de reactivos, cambian los resultados del análisis de la muestra, afectando la reproducibilidad del método.

En este caso se determinó la tolerancia de los métodos evaluando dos buretas y dos espectrofotómetros; también dos diferentes lotes de ácido ascórbico, para ello se analizó la muestra por triplicado en cada condición.

Los coeficientes de variación para cada condición cumplen con el criterio de ser menores a 2 y 3%, esto es porque ninguno de los factores influye en los resultados del análisis, teniendo la confianza de que siempre se tendrán datos confiables independientemente del equipo o instrumentación, y de los lotes de ácido ascórbico que se usen.

Como ambos métodos cumplieron con todos los parámetros, son confiables para cuantificar ácido ascórbico como materia prima, son métodos validados que pueden usarse obteniéndose resultados certeros.

Tabla 14. Estabilidad de la muestra.

Método Estabilidad	Método 1	Método 2	Criterio
	Volumétrico	Espectrofotométrico	
T amb			
1 hr			
I.C.	-1.0725 a 0.2469	-2.0704 a 1.5737	Incluir a 0
I	99.5850	99.7590	97-103% ¹ ; 98-102% ²
2 hr			
I.C.	-0.9466 a 1.3584	-9.5266 a -6.0837	Incluir a 0
I	100.2067	92.2485	97-103% ¹ ; 98-102% ²
Obscuridad			
1 hr			
I.C.	-1.2052 a 0.3934	-0.5355 a 0.0027	Incluir a 0
I	99.5931	99.7334	97-103% ¹ ; 98-102% ²
2 hr			
I.C.	-0.9738 a 1.2094	-0.3320 a 0.1982	Incluir a 0
I	100.1196	99.9333	97-103% ¹ ; 98-102% ²
Refrigeración			
1 hr			
I.C.	-5.9432 a -2.9779	-5.2833 a -4.1278	Incluir a 0
I	95.5433	95.2906	97-103% ¹ ; 98-102% ²
2 hr			
I.C.	-8.6570 a -7.5234	-9.0759 a -8.5155	Incluir a 0
I	91.9128	91.1967	97-103% ¹ ; 98-102% ²

1. Para métodos titrimétricos; 2. Para métodos químicos y espectrofotométricos

Este parámetro indica el lapso de tiempo en el que el analito se encontrará estable antes de realizar el análisis.

En ocasiones existen factores que evitan que el ensayo sea realizado inmediatamente, por eso es importante establecer las condiciones en las que el

ácido ascórbico, conserve su integridad fisicoquímica y la concentración necesaria para realizar la valoración, después de ser preparada para su cuantificación.

En este caso se establecieron tres distintas condiciones y dos lapsos de tiempo, de acuerdo a las características fisicoquímicas del ácido ascórbico. Ya que este por exposición a la luz se descompone gradualmente, se estableció el estudio en condiciones ambientales y oscuridad. También la temperatura es un factor crítico por eso se estudió en refrigeración (8°C). Como se degrada relativamente rápido, se establecieron dos lapsos de tiempo de una hora cada uno.

En condiciones ambientales en el método volumétrico se mantuvo estable en los 120 minutos del estudio, puesto que el cero se encuentra en los intervalos de confianza y la media del factor (I) está entre los rangos establecidos de acuerdo al tipo de método, contrario a lo ocurrido en el método espectrofotométrico que solo fue estable a los 60 minutos; esto es porque en la muestra usada en volumetría se usó ácido meta fosfórico que ayuda a la conservación del ácido ascórbico.

El ácido ascórbico en solución acuosa con ácido meta fosfórico al 3% es estable de 0 a 120 min, y en solución ácida (HCl 0.1 N) es estable por un rango aproximado de 0 a 60 minutos. Al llegar a las 2 horas su integridad se vio disminuida debido a su descomposición.

En ausencia de luz blanca, ambas muestras de ácido ascórbico tratadas según cada método, fueron estables en el rango de 0 a 2 horas, esto porque no se encontraron expuestas a la luz, dando un nivel de confianza de mantenimiento de integridad del analito en el intervalo estudiado.

A temperaturas bajas (8°C) las muestras fueron inestables después de ser analizadas a los 60 minutos, es fácilmente degradable en estas condiciones por lo que no debe conservarse en estas circunstancias.

A pesar de que presentó estabilidad a temperatura y luz ambientales (por una hora en el método 2 y dos horas en el método 1) y en oscuridad después de dos horas, se recomienda analizar las muestras de forma rápida luego de su preparación para análisis.

3. Comparación de Métodos

Tabla 15. Comparación de Métodos Analíticos

Comparación de métodos		
Precisión		Criterio
Repetibilidad		
F_{tab}	5.05	$F_{calc} \leq F_{tab}$
F_{calc}	4.3407	
I.C.	0.8595 a 21.9218	Debe incluir a 1
Exactitud		
I.C.	-1.1851 a 0.2155	Debe incluir a 0
Linealidad		
I.C. para b	-20.1108 a 9.77101	Debe incluir a 0
I.C. para m	-1.7197 a 1.7272	Debe incluir a 0

La comparación de métodos se usa para determinar si hay una diferencia importante en los resultados promedios o en las variables.

El objeto principal de este análisis es generar datos que permitan evaluar la equivalencia de los dos métodos.

Los parámetros que se evaluaron para determinar dicha equivalencia son Repetibilidad, Exactitud y Linealidad.

En el caso de repetibilidad se hizo una comparación de varianzas en relación a la desviación de cada método. Para determinar si ambos son equivalentes entre si el valor del cociente del cuadrado de las varianzas debe ser igual a 1; esto fue la hipótesis nula la que fue aceptada, puesto que la **F** calculada fue menor a la de tablas.

Se realizó también el intervalo de confianza, el cual debe contener el valor de 1, por lo explicado con anterioridad.

Dicho intervalo contiene este valor, por lo tanto los métodos estudiados tienen la misma repetibilidad.

Entonces tienen una buena precisión, así que no aumentarán el número de resultados que no cumplen con las especificaciones requeridas.

Es importante determinar si tienen exactitud comparable como parte de la equivalencia. Para ello se realiza el intervalo de confianza con una prueba t para evaluar la significancia estadística de la diferencia de promedios, basándose en que la diferencia entre las medias debe ser igual a cero.

Según los resultados obtenidos al incluirse el valor de cero se considera que no hay una diferencia estadísticamente significativa en promedios. Por ello presentan una exactitud equivalente.

Para que presenten una linealidad semejante se analizan las pendientes y las ordenadas al origen de los métodos.

Al analizar la discrepancia entre estos se busca el valor de cero, que se cumple en el intervalo de confianza para las pendientes y las ordenadas al origen.

Por lo anterior, para la diferencia de las pendientes y de las ordenadas al origen, se dice que los parámetros analíticos de los métodos son equivalentes, es decir, presentan una linealidad comparable.

Al comprobarse los tres parámetros y determinar que son equivalentes, puede decirse que con cada uno de los métodos se obtendrán resultados equiparables y confiables. Puesto que están validados, y presentan una equivalencia entre sí, brindando la certeza de que puede optarse por cualquiera de los dos lográndose resultados lineales, exactos y precisos.

El único factor que determina la elección por uno u por otro es el costo económico y laboral, o simplemente por preferencia personal.

D. Comparación de Costos

Tabla 16. Precios de los Reactivos Utilizados en el Método Volumétrico.

Reactivos	Presentación	Precio
Ácido Ascórbico Referencia	1 g USP ¹	\$ 2537.25
2,6-Diclorofenol indofenol	99% Envase de vidrio 100 g ²	\$ 770.1
Carbonato de Sodio	Grado reactivo ≥98% 5 Kg ²	\$ 1042.95
Ácido meta fosfórico	33.5% 100 g ²	\$ 1425.45
Agua destilada	Envase 1L	\$ 8.00
	TOTAL	\$ 5783.75

Tabla 17. Precios de los Reactivos Utilizados en el Método Espectrofotométrico

Reactivos	Presentación	Precio
Ácido Ascórbico Referencia	1 g USP ¹	\$ 2537.25
Ácido clorhídrico	Envase de vidrio 500 mL ²	\$ 617.10
Agua destilada	Envase 1L	\$ 8.00
	TOTAL	\$ 3162.35

1. USP/ Proquifa catálogo Julio-Agosto 2010; 2. Sigma Aldrich 2006

Estos son los precios de las presentaciones de mayor cantidad existentes en el mercado, ya que es bien sabido que en superiores cantidades el precio es menor.

Como primera impresión en los costos de los reactivos, el método por espectrofotometría es más económico, al usarse solamente ácido clorhídrico y el estándar de ácido ascórbico, y por ello el costo es menor en comparación con el método volumétrico que usa cuatro reactivos, dando una suma mayor.

Si se hace un análisis más profundo, calculando la cantidad necesaria de estos reactivos en cada uno de los ensayos, por ejemplo, tomando el supuesto de una valoración que se realice por triplicado con su respectiva estandarización, en el caso del método 1, y la curva estándar para el método 2, se obtiene lo siguiente:

Tabla 18. Cantidad de Reactivos Necesaria en Método Volumétrico

Reactivos	Cantidad Usada
Ácido Ascórbico Referencia	0.15 g
2,6-Diclorofenol indofenol	0.0075 g
Carbonato de Sodio	0.0063 g
Ácido meta fosfórico	2.2387 g
Agua destilada	800 mL

Tabla 19. Cantidad de Reactivos Necesaria en Método Espectrofotométrico

Reactivos	Cantidad Usada
Ácido Ascórbico Referencia	0.05 g
Ácido clorhídrico	2.8 mL
Agua destilada	650 mL

Los datos indican que las cantidades requeridas para realizar el análisis volumétrico son muy pequeñas. Tomando en consideración al ácido m-fosfórico, que es el reactivo que se usa en mayor cantidad, se pueden hacer 44 ensayos con los 100 g del envase, esto de manera aproximada.

En el caso del método 2, el ácido clorhídrico en su presentación comercial basta para 178 ensayos.

Calculando los precios por ensayo, se obtiene que un análisis con el método 1 cuesta aproximadamente \$418.96; y un análisis por espectrofotometría \$135.51. Significa que el método 2 tiene un costo monetario bajo en cuanto a reactivos, lo cual es porque utiliza una menor cantidad y usa menos ácido ascórbico estándar que es el reactivo más caro de la lista.

Además debe tomarse en consideración que cada vez que se prepare la solución de 2,6-diclorofenol indofenol se tendrá que estandarizar, caso contrario al método 2, porque una curva estándar puede cambiarse cada año gastando una menor cantidad de la muestra de referencia.

Tabla 20. Precios del Material Utilizado en el Método Volumétrico

Material	Precio
Bureta 50 mL	\$ 618.00 ¹
Soporte Universal	\$ 115.00 ¹
Pinzas dobles de presión	\$ 111.00 ¹
Matraz Erlenmeyer 125 mL	\$ 83.00 ¹
Matraz volumétrico 100 mL	\$ 321.50 ¹
Total	\$ 1248.50

1. Precios proporcionados por la Farmacia Paris

Tabla 21. Precios del Material e Instrumentación Utilizados en el Método Espectrofotométrico

Material e Instrumentación	Precio
Espectrofotómetro UV-VIS	\$ 3825.00 ²
Celdas de cuarzo	\$ 765.00 ²
Matraz volumétrico 10 mL	\$ 246.00 ¹
Matraz volumétrico 25 mL	\$ 257.50 ¹
Matraz volumétrico 100 mL	\$ 321.50 ¹
Total	\$ 5415.00

1. Precios proporcionados por la Farmacia Paris; 2. Precios revisados en Perkin Elmer

*NOTA. No se tomaron en cuenta vasos de pp, pipetas o material adicional

Tabla 22. Cantidad de Material Necesario en Método Volumétrico

Material	Cantidad Usada
Bureta 50 mL	1
Soporte Universal	1
Pinzas dobles de presión	1
Matraz Erlenmeyer 125 mL	6
Matraz Volumétrico 100 mL	6

Tabla 23. Cantidad de Material e Instrumentación Necesaria en Método Espectrofotométrico

Material e Instrumentación	Cantidad usada
Espectrofotómetro UV-VIS	1
Celdas de cuarzo	1
Matraz volumétrico 10 mL	4
Matraz volumétrico 25 mL	8
Matraz volumétrico 100 mL	4

Calculado en base a una valoración con tres repeticiones y su respectiva curva estándar

En cuanto a material destaca el precio del método espectrofotométrico, \$8920.00, contra \$3271.00 del método volumétrico, porque se eleva debido al valor monetario del espectrofotómetro, el cual varía según el modelo. Además en el método por espectrofotometría se utiliza una mayor cantidad de matraces volumétricos pues es necesario realizar diluciones por las concentraciones mínimas que el espectrofotómetro es capaz de leer.

Tabla 24. Tiempo Transcurrido en la Realización de los Métodos

Método	Tiempo
Volumétrico	3 h 9 min 38 seg
Espectrofotométrico	2 h 21 min 25 seg

En el aspecto de tiempo ocupado en la valoración del analito en cada uno de los métodos se estimó considerando un solo analista, midiendo con cronómetro dejándolo correr mientras duraba el análisis.

Se consideró el tiempo de pesado, aforado, preparación de soluciones para ambos métodos. Se tomó en cuenta la preparación de 2,6-diclorofenol indofenol, del ácido m-fosfórico, el pesado del ácido ascórbico, las preparaciones de las muestras, es decir, llevar la alícuota con los reactivos a los matraces Erlenmeyer; y la titulación de cada una, en el caso del método volumétrico.

Para el método espectrofotométrico se tomó en consideración el pesado del ácido ascórbico, la preparación del ácido clorhídrico 0.1 N y diluciones, la realización de la curva estándar y registro de las lecturas en el espectrofotómetro.

Puede notarse que se realiza con más tiempo el método volumétrico; esto es porque a pesar de usarse menos diluciones que en el caso del método 2, la titulación lleva un mayor lapso de tiempo pues debe realizarse de manera moderadamente lenta, por estar atento al vire en la reacción.

Esto no sucede con el espectrofotómetro, a pesar de realizar un mayor número de diluciones y aforos. Al momento de tomar las lecturas de Absorbancia se hace de manera inmediata, recuperando así mucho tiempo.

Tabla 25. Comparación de Costos en un Laboratorio con Infraestructura.

Método	Tiempo	Horas Hombre	Consumibles	Total
Volumétrico	3 h 10 min	\$569.68	\$418.96	\$988.64
Espectrofotométrico	2 h 20 min	\$419.76	\$135.51	\$555.27

Pago por hora \$179.9¹

Energía eléctrica al mes \$47.83/Kwh consumido (6)

1. Índice de sueldos medios por hora empleado en términos reales. Sustancias químicas, derivados del petróleo, productos de caucho y plástico. INEGI 2010. (15)

En la tabla 25 se ejemplifican los costos al usar ambos métodos, contando con que el laboratorio cuente con la infraestructura necesaria como la instrumentación, el material y las instalaciones de agua y luz.

Puede observarse que el valor monetario gastado en el método volumétrico es mayor, debido a la cantidad de tiempo empleado en dicho análisis y al costo de los reactivos.

Pero suponiendo que el estudio se haga a la luz del día, el método espectrofotométrico es el único que consume energía eléctrica por el uso del espectrofotómetro generando un gasto más mensualmente.

Si se suma el gasto de los instrumentos y material utilizados en cada metodología, se tiene que el costo en el método volumétrico es de \$4259.64; y \$9475.27 para el método espectrofotométrico, resultando en un gasto mayor para este último, pues el instrumento necesario es de mayor tecnología a comparación de una bureta. No obstante dicho consumo solo sería inicial porque el gasto en instrumentación y material solo se hace una vez y los beneficios serían superiores posteriormente.

VII. CONCLUSIONES

- Se desarrolló un método volumétrico para cuantificar ácido ascórbico como materia prima de acuerdo a su propiedad fisicoquímica de reducir al 2,6-diclorofenol indofenol oxidándose a ácido dehidroascórbico en una reacción fácilmente visible, puesto que el DFI es auto indicador
- Fue desarrollado un método de análisis espectrofotométrico para analizar cuantitativamente ácido ascórbico, usando como medio una solución de HCl 0.1 N a 242 nm, en base a su capacidad de absorber radiación electromagnética en la región ultravioleta.
- Ambos métodos fueron validados de acuerdo a los criterios del Manual de Validación de Métodos Analíticos del Comité de Elaboración de Guías Oficiales de Validación de la Dirección General de Control de Insumos para la Salud, por lo tanto son específicos, precisos, lineales, exactos, tolerantes y presentan un rango de estabilidad, sin presentar variaciones que puedan resultar en datos aberrantes brindando así un alto grado de confianza en su uso.
- Fueron comparados estadísticamente, tomando en cuenta su linealidad, exactitud y precisión resultando que son equivalentes entre sí, consecuentemente no hay una diferencia importante en sus resultados promedio.
- El análisis de costos indica que los métodos presentan diferencias en el gasto monetario debido a las cantidades diferentes de reactivos y equipo que son utilizados en cada uno. Basándose en el material, equipo e instrumentación puede concluirse que el método por espectrofotometría, es de un mayor costo, sin embargo lleva una ventaja sobre el método volumétrico, ya que, si a consumibles se refiere, este método es más económico por usar menos reactivos y porque no es necesario repetir la

curva estándar constantemente, por ello, no se necesitaría demasiada sustancia de referencia de ácido ascórbico como en el caso de la metodología uno donde cada vez que sea preparado DFI se tendrá que estandarizar usando mayormente dicha sustancia.

- El método volumétrico es más sencillo, y todos los analistas tienen conocimiento de su uso. Esto podría ser desventaja para el método por espectrofotometría, ya que existen diferentes equipos en el mercado, de los cuales no todos tienen la noción de uso; no obstante, esto solo significaría un tiempo utilizado en la capacitación del personal, que se ganaría en el uso del método, pues el análisis de tiempo indicó que para este análisis se requiere menos, además es un proceso automatizado a diferencia del volumétrico en el que se tiene que estar atento al vire en la titulación. Por el tiempo ganado en el método por espectrofotometría el pago a los analistas será menor, otorgando otra ventaja a esta técnica.
- Ambos métodos pueden ser usados de manera deliberada, de acuerdo a las necesidades del laboratorio, es decir, si se cuenta con el capital para comprar el material e instrumentación, el método espectrofotométrico, es más barato a la larga, aunque una bureta sea más económica y fácil de conseguir que un espectrofotómetro, sumado a esto, es más rápido y automatizado, pero si el análisis es urgente y no se puede usar el espectro por descompostura o falta de energía eléctrica, se puede realizar con volumetría con la certeza que el método dará resultados confiables.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aldrich. Sigma Aldrich Co. Sigma Aldrich Biotechnology, 2006, 2304pp.
2. Badu S. Química de los alimentos. Dergal Alhambra Mexicana. 3ª. Ed. México D.F, 1993 pág. 356-360.
3. Braverman J. B. S. Introducción a la bioquímica de los alimentos. Ed. El Manual moderno S.A. de C.V. México D.F. 1980 pág. 103-109.
4. Budavari, S. The Merck Index: an encyclopedia of chemicals, drugs and biological. Ed. Merck and Co. USA 2000 pág. 867, 3118.
5. Clarke G.S. The validation of analytical methods for drug substances and drug products in UK pharmaceutical laboratories Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Volumen 12, Issue 5, Mayo 1994, pág 643-652.
6. Comisión Federal de Electricidad 2010, <http://app.cfe.gob.mx/> Consulta 02 de enero de 2011.
7. Connors, K.A, et all. Chemical Stability of Pharmaceuticals. A handbook for pharmacists. Ed. John Wiley and Sons, Nueva York, 1979, pág. 138-151.
8. Davies M. B., Austin J., Partridge D.A. Vitamin C: It's Chemistry and Biochemistry. Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1991, pág. 26-65.
9. Everett E.A., Ebert R. J. Administración de la producción y las operaciones. Conceptos, modelos y funcionamiento. Ed. Prentice Hall Hispanoamericana, S.A., 4ª. Ed. México 1991, pág. 613-620.
10. Farmacia Paris S.A de C. V. Copyright 2006 <http://farmaciaparis.com/> Consulta 15 de agosto 2010.
11. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Comisión permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, Secretaria de Salud Publica 9ª edición, México, 2008.pág. 334-339, 481-485, 2427-2435.
12. Fischer R.B, Peters D. G. Compendio de análisis químico cuantitativo. Ed. Interamericana, México 1971 pág. 2 y 3.
13. Flores Gómez I. Manual de validación de métodos analíticos. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, México julio 2004, 70 pp.
14. Florey K. Analytical Profiles of Drug Substances. Ed. Academic Press, inc. Tomo 11 San Diego 1990 pág. 46-78.
15. INEGI 2010, <http://dgcnesyp.inegi.org.mx/> Consulta 02 de enero 2011.

-
16. Introducción al trabajo de laboratorio. UNAM Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, México, 2001, 143 pp.
 17. Karpińska J., Smyk J, Wołyniec E. A spectroscopic study on applicability of spectral analysis for simultaneous quantification of l-dopa, benserazide and ascorbic acid in batch and flow systems. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, Volumen 62, Issues 1-3, Noviembre 2005, pág 213-220.
 18. Kleszczewski T., Kleszczewska E. Flow injection spectrophotometric determination of ascorbic acid in biological matters. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Volumen 29, Issue 4, 20 Julio 2002, pág 755-759.
 19. López Sánchez B. Análisis costo-beneficio de dos métodos analíticos para la cuantificación de electrolitos en polvo de rehidratación oral. Tesis Licenciatura FES Zaragoza UNAM, México 2008, 46 pp.
 20. Lookfordiagnosis. Abril 2009, <http://lookfordiagnosis.com/>. Consulta 01 de Octubre de 2010.
 21. Manual de Bromatología, UNAM Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, México, 2001, pág. 7-10,37 y 38.
 22. Marqués de Cantú M.J.. Probabilidad y estadística para ciencias químico-biológicas. Ed. McGraw Hill, México 1991, 657pp.
 23. Meléndez H.E. Medicamentos para combatir el cancer, Instituto del Metabolismo Celular. 15 de abril de 2011, <http://www.metabolismo.biz/web/category/investigacion/page/2/>. Consulta 01 de mayo de 2011.
 24. Naresh K.P. Spectrophotometric and Titrimetric Determinations of ascorbic acid. *Anal chem.*, 1982, 54 (4). Department of Postgraduate Studies and Research in Chemistry, University of Jabalpur.
 25. Nováková L., Solich P., Solichová D. HPLC methods for simultaneous determination of ascorbic and dehydroascorbic acids *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, Volumen 27, Issue 10, Noviembre 2008, pág. 942-958.
 26. Perkin Elmer Copyright 1998-2010 <http://www.perkinelmer.com/> Consulta 15 de agosto de 2010.
 27. Pietrzyk D.J, Frark C.W. Química Analítica 2ª ed. Ed. Interamericana S.A de C.V, México D.F 2000, pág. 14,15,83,84, 384-388.
 28. R. Gennaro A. Remington Farmacia. Ed. Médica Panamericana 20ª ed. Tomo 2 México 2003, pág. 2163, 2164, 2174 y 2175.
-

-
29. Robbins S.P. Administración, teoría y práctica, Ed. Prentice Hall Hispanoamericana S. A. México, 1994, pág. 5
 30. Salazar Alejo N.S. Desarrollo y validación de un método analítico a microescala para cuantificar ácido ascórbico en jarabe. Tesis Licenciatura FES Zaragoza UNAM, México 2006, 58 pp.
 31. Skoog. A. Química Analítica. Editorial Mc Graw Hill 7^a ed. Buenos Aires, 2000, 135-141.
 32. Svehla G., Koltai L., Erdey L. The use of 2,6-dichlorophenol-indophenol as indicator in iodometric titrations with ascorbic acid. Analytica Chimica Acta, Volumen 29, 1963, pág 442-447.
 33. Sndulescu R., Mirel S., Oprean R. The development of spectrophotometric and electroanalytical methods for ascorbic acid and acetaminophen and their applications in the analysis of effervescent dosage forms Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Volumen 23, Issue 1, 1 Agosto 2000, pág.77-87
 34. Thangamuthu R., S.M. Senthil Kumar, K. Chandrasekara Pillai. Direct amperometric determination of l-ascorbic acid (Vitamin C) at octacyanomolybdate-doped-poly(4-vinylpyridine) modified electrode in fruit juice and pharmaceuticals sensors and actuators. B: Chemical, Volumen 120, Issue 2, 10 enero 2007, pág. 745-753.
 35. Uso de ácido ascórbico (en línea) Copyright 2002-2008 PatentesOnline.com.mx. Contacto. Política de Privacidad y Condiciones de Uso. <http://www.patentesonline.com.mx/> Consulta 28 de septiembre de 2009.
 36. Usos del ácido ascórbico (en línea) AcidoAscorbico .com. Publicado bajo licencia GFDL. Creditos: Diseñado por [Free CSS Templates /](#) Powered by 19 páginas / Política de privacidad http://www.acidoascorbico.com/ usos_del_cido_ascrbico Consulta 28 de septiembre de 2009.
 37. USP 30 NF 25, Farmacopea de los Estados Unidos de América. Formulario Nacional The United States Pharmacopeial Convention Tomo 1 2006 pág. 151-240.
 38. Validación de Métodos Analíticos. Comité de Elaboración de Guías Oficiales de Validación de la Dirección General de Control de Insumos para la Salud, SSA, México 1991, 71pp.
 39. Velásquez V.M.G, Pérez V.F.A. Fundamentos del análisis farmacéutico: Métodos ópticos, FES Zaragoza UNAM, México 2003, pág. 1-42.

IX. ANEXOS

A. Método Volumétrico

1. Sistema

a. Linealidad

Tabla 26. Resultados de Concentración de Ácido ascórbico vs Volumen de 2,6-diclorofenol indofenol

%	Concentración (µg)	Volumen (mL)	\hat{y}	$\hat{y} - y_i$	$x_i - x$	$(x_i - x)^2$
80	399	18.9	18.9065	0.0065	-93.48	8738.5104
	399	18.8	18.9065	0.1065	-93.48	8738.5104
	399	18.9	18.9065	0.0065	-93.48	8738.5104
90	444	21.1	21.0822	-0.0178	-47.88	2292.4944
	444	21.0	21.0822	0.0822	-47.88	2292.4944
	444	20.9	21.0822	0.1822	-47.88	2292.4944
100	487	23.2	23.1318	-0.0662	-4.88	23.8144
	487	23.2	23.1318	-0.0662	-4.88	23.8144
	487	23.1	23.1318	0.0338	-4.88	23.8144
110	532	25.5	25.2475	-0.2525	39.42	1553.9364
	532	25.5	25.2475	-0.2525	39.42	1553.9364
	532	25.5	25.2475	-0.2525	39.42	1553.9364
120	599	28.3	28.4633	0.1633	106.82	11410.5124
	599	28.4	28.4633	0.0633	106.82	11410.5124
	599	28.2	28.4633	0.2633	106.82	11410.5124

$r =$	0.9989	$x =$	492.18	$y =$	23.3667
$r^2 =$	0.9979	$\Sigma x =$	7382.7	$\Sigma y =$	350.5
$m =$	0.0477	$\Sigma x^2 =$	3705675.09	$\Sigma y^2 =$	8354.41
$b =$	-0.1166	$Sx =$	71.7425	$Sy =$	3.4267
$n =$	15	$S^2x =$	5146.986	$S^2y =$	11.7424
		$x^2 =$	242241.1524	$\Sigma xy =$	175947.17

1) Modelo

Cálculo del Error Experimental

$$\sum_{i=1}^n \xi_i = \Sigma (y_i - \hat{y}) = -1E-4$$

Modelo con Error Experimental

$$y = mx + b + \xi_i$$

$$y = 0.0477x + (-0.1667)$$

2) Evaluación Estadística

Evaluación Estadística de la Ordenada al Origen

a) Planteamiento de la Hipótesis

$$H_0: B_0 = 0$$

$$H_a: B_0 \neq 0$$

b) Estadígrafo de Contraste

$$S_{x/y} = \sqrt{[(n-1/n-2)(S^2y - m^2S^2x)]} = 0.1648$$

$$t_{\text{tab}} = 2.1604 \quad \text{g.l} = 13$$

$$t_{\text{calc}} = b - B_0 / S_{x/y} \sqrt{[1 / (n + x^2) / (n - 1) S^2x]} = -0.3823$$

c) Intervalo de Confianza

$$b \pm t_{\text{tab } 1-\alpha/2} \{ S_{x/y} \sqrt{[1 / n + x^2 / (n - 1) S^2x]} \} = -0.7757 \leq b \leq 0.5424$$

d) Cálculo de la ANDEVA para Regresión Lineal

Planteamiento de la Hipótesis

H_0 : y no depende de x

H_a : y depende de x

Tabla 27. Análisis de Varianza para Regresión Lineal.

Fuente de variación	g.l	SC	MC	F _{calc}
Regresión	1	164.0404	164.0404	6043.0260
Error	13	0.3529	0.0271	
Total	14	164.3933		

e) Coeficiente de Variación

$$C.V. = S_{x/y} / \bar{x} = 0.0335\%$$

b. Precisión

Tabla 28. Concentración de Ácido ascórbico vs Volumen de 2,6-diclorofenol indofenol

Concentración (µg/mL)	Volumen (mL)
487	23.2
487	23.2
487	23.1
487	23.0
487	23.1
487	23.1

$$S_y = 0.0753$$

$$\bar{y} = 23.1167$$

$$C.V = (S_y/\bar{y})100 = 0.3256\%$$

2. Método

a. Linealidad

Tabla 29. Resultados de Concentración Adicionada vs Concentración Recuperada de Ácido ascórbico.

%	Concentración Adicionada (µg)	Concentración Recuperada (µg)	\bar{Y}	$\hat{y} - y_i$	$\bar{x}_i - \bar{x}$	$(x_i - \bar{x})^2$
80	411	397.3373	405.1152	7.7779	-90.5333	8196.2844
	398	393.1548	392.1384	-1.0164	-103.53333	10719.1511
	403	395.2460	397.1295	1.8834	-98.5333	9708.8178
90	451	449.6185	445.0436	-4.5749	-50.5333	2553.6178
	448	445.4360	442.0490	-3.3870	-53.5333	2865.8178
	450	443.3448	444.0454	0.7006	-51.5333	2655.6844
100	502	497.7172	495.9524	-1.7648	0.4667	0.2178
	500	497.7172	493.9560	-3.7613	-1.5333	2.3511
	512	501.8997	505.9345	4.0348	10.4667	109.5511
110	551	549.9985	544.8648	-5.1337	49.4667	2446.9511
	555	549.9985	548.8576	-1.1409	53.4667	2858.6844
	549	543.7247	542.8683	-0.8564	47.4667	2253.0844
120	593	587.6409	586.7896	-0.8513	91.4667	8366.1511
	599	587.6409	592.7789	5.1380	97.4667	9499.7511
	601	591.8234	594.7753	2.9519	99.4667	9893.6178

r = 0.9986	x = 501.5333	y = 495.4866
r² = 0.9973	Σx = 7523	Σy = 7432.2985
m = 0.9982	Σx² = 3845165	Σy² = 3754671.7652
b = -5.1497	Sx = 71.7783	Sy = 71.7474
n = 15	S²x = 5152.1238	S²y = 5147.6914
	x² = 251535.6844	Σxy = 3799546.1738

1) Modelo

Cálculo del Error Experimental

Modelo con Error Experimental

$$\sum_{i=1}^n \xi_i = \sum (y_i - \hat{y}) = -1E-4$$

$$y = mx + b + \xi_i$$

$$y = 0.9982x + (-5.1498)$$

2) Evaluación Estadística

a) Evaluación Estadística de la Pendiente

Planteamiento de la Hipótesis

$$H_0: B_0 = 0$$

$$H_1: B_0 > 0$$

$$H_2: B_0 < 0$$

Estadígrafo de Contraste

$$S_{x/y} = \sqrt{[(n-1/n-2)(S^2y - m^2S^2x)]} = 3.8803$$

$$S_b = \sqrt{\{S^2_{x/y} / [(n-1)S^2x]\}} = 0.0144$$

$$t_{tab} = 2.16 \quad g.l = 13$$

$$t_{calc} = (m - B_0) / S_b = 69.0901$$

Intervalo de Confianza

$$I.C = m \pm [(t_{tab})(S_b)] = 0.9670 \leq m \leq 1.0294$$

b) Evaluación Estadística de la Ordenada al Origen

Planteamiento de la Hipótesis

Ho: $B_0 = 0$

Ha: $B_0 \neq 0$

Estadígrafo de Contraste

$$t_{\text{tab}} = 2.1604 \quad g.l = 13$$

$$t_{\text{calc}} = b - B_0 / S_{x/y} \sqrt{[1 / (n + x^2) / (n - 1) S^2x]} = -0.7040$$

Intervalo de Confianza

$$b \pm t_{\text{tab } 1-\alpha/2} \{ S_{x/y} \sqrt{[1 / n + x^2 / (n - 1) S^2x]} \} = -20.9503 \leq b \leq 10.6508$$

c) Cálculo de la ANDEVA para Regresión Lineal

Planteamiento de la Hipótesis

Ho: y no depende de x

Ha: y depende de x

Tabla 30. Análisis de Varianza para Regresión Lineal.

Fuente de variación	g.l	SC	MC	F _{calc}
Regresión	1	71871.9435	71871.9435	4773.4409
Error	13	195.7362	15.0566	
Total	14	72067.6797		

d) Coeficiente de Variación

$$C.V. = S_{x/y} / x = 0.7737\%$$

b. Exactitud

Tabla 31. Porcentajes de Recobro

<u>% de Recobro</u>	
99.5434	n = 6
99.5434	x = 99.3308
98.0273	Sx = 0.6552
99.7429	
99.3655	
99.7622	

1) Coeficiente de Variación

$$C.V = (Sx/x)100 = 0.6597\%$$

2) Inferencia Estadística

a) Planteamiento de la Hipótesis

$$H_0: \mu = 100$$

$$H_a: \mu \neq 100$$

b) Estadígrafo de Contraste

$$t_{\text{tab } 1-\alpha/2} = 2.571 \quad g.l = 5$$

$$t_{\text{calc}} = x - \mu / (Sx / \sqrt{n}) = -2.5017$$

c) Intervalo de Confianza

$$I.C = x \pm [t_{\text{tab } 1-\alpha/2} (Sx / \sqrt{n})] = 98.6431 \leq \mu \leq 100.0185$$

c. Precisión

1) Repetibilidad

Tabla 32. Porcentajes Recuperados.

<u>% de Recobro</u>	
99.5434	
99.5434	$\bar{x} = 99.3308$
98.0273	$Sx = 0.6552$
99.7429	$n = 6$
99.3655	$\sigma x = 0.5982$
99.7622	$\sigma x^2 = 0.3578$

a) Coeficiente de Variación

$$C.V = (Sx / \bar{x}) 100 = 0.6597\%$$

b) Inferencia Estadística

Planteamiento de la Hipótesis

$$H_0: \sigma_0 = 2\%$$

$$H_a: \sigma_0 \neq 2\%$$

c) Estadígrafo de Contraste

$$\chi^2_{1-\alpha/2} = 12.8325 \quad \chi^2_{\alpha/2} = 0.8312 \quad g.l = 5$$

$$\chi^2_{calc} = (n - 1)S^2x / \sigma_0^2 = 0.5367$$

d) Intervalo de Confianza

$$[(n - 1)S^2x / \chi^2_{1-\alpha/2} < \sigma_0^2 < [(n - 1)S^2x] / \chi^2_{\alpha/2} = 0.1673 < \sigma_0^2 < 2.5827$$

2) Reproducibilidad

Tabla 33. Relación entre Analistas y Días.

		DÍA	
		1	2
A N A L I S T A	1	99.5434	99.7429
		99.5434	99.9982
		98.0273	99.0376
	2	99.7812	100.1796
		99.2526	99.7235
		99.7429	99.3238

a) Suma de las Combinaciones Analista-Día (y_{ij}).

$$y_{11} = 297.1141$$

$$y_{12} = 298.7768$$

$$y_{21} = 298.7788$$

$$y_{22} = 299.2270$$

b) Suma para cada Analista ($y_{i..}$).

$$y_{1..} = 595.891008$$

$$y_{2..} = 598.0057$$

c) Suma total ($y_{...}$).

$$y_{...} = 1193.8967$$

d) Suma del Cuadrado de cada Analista en cada Día ($\sum \sum y_{ij}^2$).

$$\sum \sum y_{ij}^2 = 356349.9337$$

e) Suma del Cuadrado de cada Analista en los dos Días ($\sum y_{i..}^2$).

$$\sum y_{i..}^2 = 712696.9397$$

f) Suma de cada Dato Elevado al Cuadrado ($\sum \sum \sum y^2_{ijk}$).

$$\sum \sum \sum y^2_{ijk} = 118785.8869$$

g) Suma de Cuadrados del Analista (SCa).

$$SCa = [(Sy_i^2../jk) - (Sy^2/ijk)] = 0.3713$$

h) Suma de Cuadrados del Día (SCd).

$$\Sigma y.j. = 712696.948$$

$$SCd = \Sigma y^2.j./jk - \Sigma y^2.../ijk = 0.3727$$

i) Suma de Cuadrados de la Interacción Analista-Día (SCad).

$$\Sigma \Sigma y.j. = 356349.957$$

$$SCad = [(Sy^2ij./k) - (Sy_i^2../jk) - (Sy^2.j./ik) + (Sy^2.../ijk)] = 0.4949$$

j) Suma de Cuadrados del Error (SCe).

$$SCe = \Sigma \Sigma \Sigma y^2ijk - \Sigma y^2ij/k = 2.5681$$

k) Tabla de ANDEVA

Tabla 34. Análisis de Varianza para la Relación Analista-Día.

Fuente de variación	g.l	SC	MC	F _{calc}
Analista	1	0.3713	0.3713	1.1567
Día	1	0.3727	0.3727	1.1609
Analista-Día	1	0.4949	0.4949	1.5417
Error	8	2.5681	0.3210	

d. Tolerancia

1) Condición: Diferente Material (Bureta)

Tabla 35. Relación entre Diferente Material.

Muestra	Bureta 1	Bureta 2	
1	99.5434	97.6459	$\Sigma y = 592.9050$
2	99.5434	98.5816	$\Sigma y^2 = 58593.0618$
3	98.0273	99.5634	$n = 6$

a) Media Aritmética

$$y = \Sigma y/n = 98.8175$$

b) Desviación Estándar

$$S = \sqrt{\frac{n\sum y^2 - (\sum y)^2}{n(n-1)}} = 0.7327$$

c) Coeficiente de Variación

$$C.V = \left(\frac{S}{y}\right)100 = 0.7414\%$$

2) Condición: Diferente Lote

Tabla 36. Relación entre Diferente Lote.

Muestra	Lote 1	Lote 2	
1	99.5434	99.5030	$\sum y = 596.1223$
2	99.5434	99.7429	$\sum y^2 = 59229.1302$
3	98.0273	99.7622	$n = 6$

a) Media Aritmética

$$y = \frac{\sum y}{n} = 99.3537$$

b) Desviación Estándar

$$S = \sqrt{\frac{n\sum y^2 - (\sum y)^2}{n(n-1)}} = 0.4344$$

c) Coeficiente de Variación

$$C.V = \left(\frac{S}{y}\right) 100 = 0.4372\%$$

e. Estabilidad de la Muestra

1) Condición: Temperatura Ambiente

Tabla 37. Porcentajes de Recobro en Diferentes Tiempos

Inicial	1 hr	2 hr	C = 2	
99.7429	99.3238	100.5811	$y_0 = 99.4755$	$S_0^2 = 0.1219$
99.6030	99.1897	99.1897	$y_1 = 99.0627$	$S_1^2 = 0.1175$
99.0805	98.6745	99.2733	$y_2 = 99.6814$	$S_2^2 = 0.6089$

a) Varianzas Ponderadas

$$Sp_1^2 = (2S_0^2 + 2S_1^2) / 2 (C + 1) = 0.0798$$

$$Sp_2^2 = (2S_0^2 + 2S_2^2) / 2 (C + 1) = 0.2436$$

b) Intervalo de Confianza

$$t_{dunnet} = 2.86$$

$$(y_1 - y_0) \pm t_{dunnet} \sqrt{[Sp_1^2 (2/3)]} = -1.0725 \leq 0 \leq 0.2469$$

$$(y_2 - y_0) \pm t_{dunnet} \sqrt{[Sp_2^2 (2/3)]} = -0.9466 \leq 0 \leq 1.3584$$

c) Coeficiente de Variación

$$I_1 = (y_4 / y_1)100 = 99.5798\%$$

$$I_2 = (y_5 / y_2)100 = 99.5851\%$$

$$I_3 = (y_6 / y_3)100 = 99.5902\%$$

$$I_{tiempo 1} = (I_1 + I_2 + I_3) / 3 = 99.5850\%$$

$$I_4 = (y_7 / y_1)100 = 100.8404\%$$

$$I_5 = (y_8 / y_2)100 = 99.5851\%$$

$$I_6 = (y_9 / y_3)100 = 100.1946\%$$

$$I_{tiempo 2} = (I_4 + I_5 + I_6) / 3 = 100.2067\%$$

2) Condición: Obscuridad

Tabla 38. Porcentajes de Recobro en Diferentes Tiempos

Inicial	1 hr	2 hr	C = 2	
100.0341	99.6225	100.4458	$y_0 = 99.7433$	$S_0^2 = 0.1827$
99.9432	99.5233	99.1034	$y_1 = 99.3374$	$S_1^2 = 0.1688$
99.2526	98.8664	100.0341	$y_2 = 99.8611$	$S_2^2 = 0.4730$

a) Varianzas Ponderadas

$$Sp_1^2 = (2S_0^2 + 2S_1^2) / 2 (C + 1) = 0.1172$$

$$Sp_2^2 = (2S_0^2 + 2S_2^2) / 2 (C + 1) = 0.2185$$

b) Intervalo de Confianza

$$t_{\text{dunnet}} = 2.86$$

$$(y_1 - y_0) \pm t_{\text{dunnet}} \sqrt{[Sp_1^2 (2/3)]} = -1.2052 \leq 0 \leq 0.3934$$

$$(y_2 - y_0) \pm t_{\text{dunnet}} \sqrt{[Sp_2^2 (2/3)]} = -0.9738 \leq 0 \leq 1.2094$$

c) Coeficiente de Variación

$$l_1 = (y_4 / y_1)100 = 99.5885\%$$

$$l_2 = (y_5 / y_2)100 = 99.5799\%$$

$$l_3 = (y_6 / y_3)100 = 99.6109\%$$

$$l_{\text{tiempo 1}} = (l_1 + l_2 + l_3) / 3 = 99.5931\%$$

$$l_4 = (y_7 / y_1)100 = 100.4116\%$$

$$l_5 = (y_8 / y_2)100 = 99.1597\%$$

$$l_6 = (y_9 / y_3)100 = 100.7874\%$$

$$l_{\text{tiempo 2}} = (l_4 + l_5 + l_6) / 3 = 100.1196\%$$

3) Condición: Refrigeración

Tabla 39. Porcentajes de Recobro en Diferentes Tiempos

Inicial	1 hr	2 hr	C = 2	
99.7235	96.7781	92.1496	$y_0 = 100.0278$	$S_0^2 = 0.1094$
99.9800	94.9810	91.6484	$y_1 = 95.5673$	$S_1^2 = 1.1000$
100.3799	94.9427	92.0150	$y_2 = 91.9377$	$S_2^2 = 0.0673$

a) Varianzas Ponderadas

$$Sp_1^2 = (2S_0^2 + 2S_1^2) / 2 (C + 1) = 0.4031$$

$$Sp_2^2 = (2S_0^2 + 2S_2^2) / 2 (C + 1) = 0.0589$$

b) Intervalo de Confianza

$$t_{dunnet} = 2.86$$

$$(y_1 - y_0) \pm t_{dunnet} \sqrt{[Sp_1^2 (2/3)]} = -5.9432 \leq 0 \leq -2.9779$$

$$(y_2 - y_0) \pm t_{dunnet} \sqrt{[Sp_2^2 (2/3)]} = -8.6569 \leq 0 \leq -7.5234$$

c) Coeficiente de Variación

$$l_1 = (y_4 / y_1)100 = 97.0464\%$$

$$l_2 = (y_5 / y_2)100 = 95\%$$

$$l_3 = (y_6 / y_3)100 = 94.5834\%$$

$$l_{tiempo 1} = (l_1 + l_2 + l_3) / 3 = 95.5433\%$$

$$l_4 = (y_7 / y_1)100 = 92.4051\%$$

$$l_5 = (y_8 / y_2)100 = 91.6667\%$$

$$l_6 = (y_9 / y_3)100 = 91.6668\%$$

$$l_{tiempo 2} = (l_4 + l_5 + l_6) / 3 = 91.9129\%$$

B. Método Espectrofotométrico

1. Sistema

a. Linealidad

Tabla 40. Resultados de Concentración de Ácido ascórbico vs Absorbancia.

%	Concentración (μg)	Absorbancia	\hat{y}	$\hat{y} - y_i$	$x_i - x$	$(x_i - x)^2$
80	4.908	0.310	0.3118	0.0018	-1.1256	1.2670
	4.908	0.314	0.3118	-0.0022	-1.1256	1.2670
	4.908	0.312	0.3118	-0.0002	-1.1256	1.2670
90	5.388	0.341	0.3416	0.0006	-0.6456	0.4168
	5.388	0.340	0.3416	0.0016	-0.6456	0.4168
	5.388	0.342	0.3416	-0.0004	-0.6456	0.4168
100	6.048	0.381	0.3826	0.0016	0.0144	0.0002
	6.048	0.380	0.3826	0.0026	0.0144	0.0002
	6.048	0.384	0.3826	-0.0014	0.0144	0.0002
110	6.576	0.419	0.4154	-0.0036	0.5424	0.2942
	6.576	0.420	0.4154	-0.0046	0.5424	0.2942
	6.576	0.416	0.4154	-0.0006	0.5424	0.2942
120	7.248	0.456	0.4571	0.0011	1.2144	1.4748
	7.248	0.453	0.4571	0.0041	1.2144	1.4748
	7.248	0.458	0.4571	-0.0009	1.2144	1.4748

$r =$	0.9990	$x =$	6.0336	$y =$	0.3817
$r^2 =$	0.9981	$\Sigma x =$	90.5040	$\Sigma y =$	5.7260
$m =$	0.0621	$\Sigma x^2 =$	556.4238	$\Sigma y^2 =$	2.2258
$b =$	0.0071	$S_x =$	0.8602	$S_y =$	0.0535
$n =$	15	$S^2 x =$	0.7399	$S^2 y =$	0.0029
		$x^2 =$	36.4043	$\Sigma xy =$	35.1917

1) Modelo

Cálculo del Error Experimental

$$\sum_{i=1}^n \xi_i = \Sigma (y_i - \hat{y}) = -3\text{E-}4$$

Modelo con Error Experimental

$$y = mx + b + \xi_i$$

$$y = 0.0621x + (0.00675)$$

2) Evaluación Estadística

Evaluación Estadística de la Ordenada al Origen

a) Planteamiento de la Hipótesis

$$H_0: B_0 = 0$$

$$H_a: B_0 \neq 0$$

b) Estadígrafo de Contraste

$$S_{x/y} = \sqrt{[(n-1/n-2)(S^2y - m^2S^2x)]} = 0.1648$$

$$t_{\text{tab}} = 2.1604 \quad \text{g.l} = 13$$

$$t_{\text{calc}} = b - B_0 / S_{x/y} \sqrt{[1 / (n + x^2) / (n - 1) S^2x]} = 1.5394$$

c) Intervalo de Confianza

$$b \pm t_{\text{tab } 1-\alpha/2} \{ S_{x/y} \sqrt{[1 / n + x^2 / (n - 1) S^2x]} \} = -0.0028 \leq b \leq 0.0169$$

d) Cálculo de la ANDEVA para Regresión Lineal

Planteamiento de la Hipótesis

H_0 : y no depende de x

H_a : y depende de x

Tabla 41. Análisis de Varianza para Regresión Lineal.

Fuente de variación	g.l	SC	MC	F _{calc}
Regresión	1	0.0399	0.0399	6815.6708
Error	13	0.000076193	0.000005861	
Total	14	0.0400		

e) Coeficiente de Variación

$$C.V. = S_{x/y} / \bar{x} = 0.0401\%$$

b. Precisión

Tabla 42. Concentración de Ácido ascórbico vs Volumen de 2,6-diclorofenol indofenol

Concentración (µg/mL)	Absorbancia	
6.048	0.381	
6.048	0.380	Sy = 0.0023
6.048	0.384	y = 0.3818
6.048	0.382	C.V = (Sy/y)100 = 0.6067%
6.048	0.385	
6.048	0.379	

2. Método

a. Linealidad

Tabla 43. Resultados de Concentración Adicionada vs Concentración Recuperada de Ácido ascórbico.

%	Concentración Adicionada (µg)	Concentración Recuperada (µg)	y	$\hat{y} - y_i$	$x_i - \bar{x}$	$(x_i - \bar{x})^2$
80	4.812	4.8091	4.8056	-0.0036	-1.22	1.4884
	4.824	4.8573	4.8175	-0.0398	-1.208	1.4593
	4.896	4.8573	4.8891	0.0318	-1.136	1.2905
90	5.424	5.4193	5.4142	-0.0051	-0.608	0.3697
	5.388	5.3551	5.3784	0.0233	-0.644	0.4147
	5.412	5.4032	5.4022	-0.0010	-0.62	0.3844
100	6.192	6.1901	6.1779	-0.0122	0.16	0.0256
	6.000	5.9974	5.9870	-0.0104	-0.032	0.0010
	6.048	6.0134	6.0347	0.0213	0.016	0.0003
110	6.624	6.6236	6.6075	-0.0161	0.592	0.3505
	6.576	6.5434	6.5598	0.0164	0.544	0.2959
	6.588	6.5755	6.5717	-0.0037	0.556	0.3091
120	7.224	7.1857	7.2042	0.0185	1.192	1.4209
	7.224	7.2178	7.2042	-0.0136	1.192	1.4209
	7.248	7.2338	7.2281	-0.0058	1.216	1.4787

$r =$	0.9998	$x =$	6.0320	$y =$	6.0188
$r^2 =$	0.9995	$\Sigma x =$	90.48	$\Sigma y =$	90.2820
$m =$	0.9945	$\Sigma x^2 =$	556.4851	$\Sigma y^2 =$	553.9854
$b =$	0.0202	$S_x =$	0.8746	$S_y =$	0.8700
$n =$	15	$S^2 x =$	0.7650	$S^2 y =$	0.7569
		$x^2 =$	36.3850	$\Sigma xy =$	555.2313

1) Modelo

Cálculo del Error Experimental

$$\sum_{i=1}^n \xi_i = \Sigma (y_i - \hat{y}) = -1E-4$$

Modelo con Error Experimental

$$y = mx + b + \xi_i$$

$$y = 0.9945x + (0.0201)$$

2) Evaluación Estadística

a) Evaluación Estadística de la Pendiente

Planteamiento de la Hipótesis

$$H_0: B_0 = 0$$

$$H_1: B_0 > 0$$

$$H_2: B_0 < 0$$

Estadígrafo de Contraste

$$S_{x/y} = \sqrt{[(n-1/n-2)(S^2 y - m^2 S^2 x)]} = 0.0196$$

$$S_b = \sqrt{\{S^2_{x/y} / [(n-1)S^2 x]\}} = 0.0060$$

$$t_{tab} = 2.16 \quad g.l = 13$$

$$t_{calc} = (m - B_0) / S_b = 166.0829$$

Intervalo de Confianza

$$I.C = m \pm [(t_{tab})(S_b)] = 0.9815 \leq m \leq 1.0074$$

b) Evaluación Estadística de la Ordenada al Origen

Planteamiento de la Hipótesis

Ho: $B_0 = 0$

Ha: $B_0 \neq 0$

Estadígrafo de Contraste

$$t_{\text{tab}} = 2.1604 \quad \text{g.l} = 13$$

$$t_{\text{calc}} = b - B_0 / S_{x/y} \sqrt{[1 / (n + x^2) / (n - 1) S^2_x]} = 0.5535$$

Intervalo de Confianza

$$b \pm t_{\text{tab } 1-\alpha/2} \{ S_{x/y} \sqrt{[1 / n + x^2 / (n - 1) S^2_x]} \} = -0.0586 \leq b \leq 0.0990$$

c) Cálculo de la ANDEVA para Regresión Lineal

Planteamiento de la Hipótesis

Ho: y no depende de x

Ha: y depende de x

Tabla 44. Análisis de Varianza para Regresión Lineal.

Fuente de variación	g.l	SC	MC	F _{calc}
Regresión	1	10.5915	10.5915	27583.5287
Error	13	0.0050	0.0004	
Total	14	10.5965		

d) Coeficiente de Variación

$$\text{C.V.} = S_{x/y} / x = 0.3249\%$$

b. Exactitud

Tabla 45. Porcentajes de Recobro

<u>% de Recobro</u>	
99.9690	n = 6
99.9565	x = 99.8156
99.4287	Sx = 0.3145
99.6263	
100.2928	
99.6204	

1) Coeficiente de Variación

$$C.V = (Sx/x)100 = 0.3151\%$$

2) Inferencia Estadística

a) Planteamiento de la Hipótesis

$$H_0: \mu = 100$$

$$H_a: \mu \neq 100$$

b) Estadígrafo de Contraste

$$t_{\text{tab } 1-\alpha/2} = 2.571 \quad \text{g.l} = 5$$

$$t_{\text{calc}} = x - \mu / (Sx / \sqrt{n}) = -1.4360$$

c) Intervalo de Confianza

$$I.C = x \pm [t_{\text{tab } 1-\alpha/2} (Sx / \sqrt{n})] = 99.4855 \leq \mu \leq 100.1458$$

c. Precisión

1) Repetibilidad

Tabla 46. Porcentajes Recuperados.

<u>% de Recobro</u>	
99.9690	
99.9565	x = 99.8156
99.4287	Sx = 0.3145
99.6263	n = 6
100.2928	σx = 0.2871
99.6204	σx^2 = 0.0825

a) Coeficiente de Variación

$$\text{C.V} = (\text{Sx} / \text{x}) 100 = 0.3151\%$$

b) Inferencia Estadística

Planteamiento de la Hipótesis

$$H_0: \sigma_o = 2\%$$

$$H_a: \sigma_o \neq 2\%$$

c) Estadígrafo de Contraste

$$\chi^2_{1-\alpha/2} = 12.8325 \quad \chi^2_{\alpha/2} = 0.8312 \quad \text{g.l} = 5$$

$$\chi^2_{\text{calc}} = (n - 1)S^2x / \sigma_o^2 = 0.1237$$

d) Intervalo de Confianza

$$[(n - 1)S^2x / \chi^2_{1-\alpha/2} < \sigma_o^2 < [(n - 1)S^2x] / \chi^2_{\alpha/2} = 0.0386 < \sigma_o^2 < 0.5952$$

2) Reproducibilidad

Tabla 47. Relación entre Analistas y Días.

		DÍA	
		1	2
A N A L I S T A	1	99.9690	99.5518
		99.9565	99.8248
		99.4287	99.8290
A N A L I S T A	2	99.9659	99.5646
		99.5646	99.0251
		99.8924	99.9033

a) Suma de las Combinaciones Analista-Día (y_{ij}).

$$y_{11} = 299.3541$$

$$y_{12} = 299.4229$$

$$y_{21} = 299.2056$$

$$y_{22} = 298.4929$$

b) Suma para cada Analista ($y_{i..}$).

$$y_{1..} = 598.7770$$

$$y_{2..} = 597.6985$$

c) Suma Total ($y_{...}$).

$$y_{...} = 1196.4755$$

d) Suma del Cuadrado de cada Analista en cada Día ($\sum \sum y_{ij}^2$).

$$\sum \sum y_{ij}^2 = 357888.9527$$

e) Suma del Cuadrado de cada Analista en los dos Días ($\sum y_{i..}^2$).

$$\sum y_{i..}^2 = 715777.3926$$

f) Suma de cada Dato Elevado al Cuadrado ($\sum \sum \sum y^2_{ijk}$).

$$\sum \sum \sum y^2_{ijk} = 119297.0373$$

g) **Suma de Cuadrados del Analista (SCa).**

$$SCa = [(Sy_i^2../jk) - (Sy^2/ijk)] = 0.0345$$

h) **Suma de Cuadrados del Día (SCd).**

$$\Sigma y.j. = 715777.365$$

$$SCd = \Sigma y^2.j./jk - \Sigma y^2.../ijk = 0.0969$$

i) **Suma de Cuadrados de la Interacción Analista-Día (SCad).**

$$\Sigma \Sigma y.j. = 357888.939$$

$$SCad = [(Sy^2ij./k) - (Sy_i^2../jk) - (Sy^2.j./ik) + (Sy^2.../ijk)] = 0.1166$$

j) **Suma de Cuadrados del Error (SCe).**

$$SCe = \Sigma \Sigma \Sigma y^2ijk - \Sigma y^2ij/k = 0.7244$$

k) Tabla de ANDEVA

Tabla 48. Análisis de Varianza para la Relación Analista-Día.

Fuente de variación	g.l	SC	MC	F _{calc}
Analista	1	0.0345	0.0345	0.3816
Día	1	0.0969	0.0969	1.0704
Analista-Día	1	0.1166	0.1166	1.2880
Error	8	0.7244	0.0905	

d. Tolerancia

1) Condición: Diferente Instrumentación (Espectrofotómetro)

Tabla 49. Relación entre Diferente Instrumentación.

Muestra	Espectrofotómetro		
	1	2	
1	99.9690	99.5102	$\Sigma y = 598.5733$
2	99.9565	100.2262	$\Sigma y^2 = 59715.5486$
3	99.4287	99.4828	$n = 6$

a) Media Aritmética

$$y = \Sigma y/n = 99.7622$$

b) Desviación Estándar

$$S = \sqrt{n\Sigma y^2 - (\Sigma y)^2 / [n(n-1)]} = 0.1097$$

c) Coeficiente de Variación

$$C.V = (S/y)100 = 0.1099\%$$

2) Condición: Diferente Lote

Tabla 50. Relación entre Diferente Lote..

Muestra	Lote 1	Lote 2	
1	99.9690	99.2916	$\Sigma y = 597.7180$
2	99.9564	99.3836	$\Sigma y^2 = 59544.9080$
3	99.4286	99.6888	$n = 6$

a) Media Aritmética

$$y = \Sigma y/n = 99.6197$$

b) Desviación Estándar

$$S = \sqrt{n\Sigma y^2 - (\Sigma y)^2 / [n(n-1)]} = 0.0880$$

c) Coeficiente de Variación

$$C.V = (S/y) 100 = 0.0883\%$$

e. Estabilidad de la Muestra

1) Condición: Temperatura Ambiente

Tabla 51. Porcentajes de Recobro en Diferentes Tiempos

Inicial	1 hr	2 hr		C = 2
101.2946	100.4917	92.4628	$y_0 = 100.5405$	$S_0^2 = 1.5482$
101.2225	100.6905	92.7095	$y_1 = 100.2921$	$S_1^2 = 0.2780$
99.1043	99.6942	93.0338	$y_2 = 92.7354$	$S_2^2 = 0.0820$

a) Varianzas Ponderadas

$$Sp_1^2 = (2S_0^2 + 2S_1^2) / 2 (C + 1) = 0.6088$$

$$Sp_2^2 = (2S_0^2 + 2S_2^2) / 2 (C + 1) = 0.5434$$

b) Intervalo de Confianza

$$t_{dunnet} = 2.86$$

$$(y_1 - y_0) \pm t_{dunnet} \sqrt{[Sp_1^2 (2/3)]} = -2.0704 \leq 0 \leq 1.5737$$

$$(y_2 - y_0) \pm t_{dunnet} \sqrt{[Sp_2^2 (2/3)]} = -9.5266 \leq 0 \leq -6.0837$$

c) Coeficiente de Variación

$$I_1 = (y_4 / y_1)100 = 99.2074\%$$

$$I_2 = (y_5 / y_2)100 = 99.4744\%$$

$$I_3 = (y_6 / y_3)100 = 100.5952\%$$

$$I_{tiempo 1} = (I_1 + I_2 + I_3) / 3 = 99.7590\%$$

$$I_4 = (y_7 / y_1)100 = 91.2811\%$$

$$I_5 = (y_8 / y_2)100 = 91.5898\%$$

$$I_6 = (y_9 / y_3)100 = 93.8746\%$$

$$I_{\text{tiempo 2}} = (I_4 + I_5 + I_6) / 3 = 92.2485\%$$

2) Condición: Obscuridad

Tabla 52. Porcentajes de Recobro en Diferentes Tiempos

Inicial	1 hr	2 hr	C = 2	
99.8886	99.6204	99.8205	$y_0 = 99.9356$	$S_0^2 = 0.0197$
100.0935	99.8290	99.7617	$y_1 = 99.6692$	$S_1^2 = 0.0201$
99.8248	99.5582	100.0240	$y_2 = 99.8687$	$S_2^2 = 0.0189$

a) Varianzas Ponderadas

$$Sp_1^2 = (2S_0^2 + 2S_1^2) / 2 (C + 1) = 0.0133$$

$$Sp_2^2 = (2S_0^2 + 2S_2^2) / 2 (C + 1) = 0.0129$$

b) Intervalo de Confianza

$$t_{\text{dunnet}} = 2.86$$

$$(y_1 - y_0) \pm t_{\text{dunnet}} \sqrt{[Sp_1^2 (2/3)]} = -0.5355 \leq 0 \leq 0.0027$$

$$(y_2 - y_0) \pm t_{\text{dunnet}} \sqrt{[Sp_2^2 (2/3)]} = -0.3320 \leq 0 \leq 0.1982$$

c) Coeficiente de Variación

$$I_1 = (y_4 / y_1)100 = 99.7315\%$$

$$I_2 = (y_5 / y_2)100 = 99.7357\%$$

$$I_3 = (y_6 / y_3)100 = 99.7329\%$$

$$I_{\text{tiempo 1}} = (I_1 + I_2 + I_3) / 3 = 99.7334\%$$

$$I_4 = (y_7 / y_1)100 = 99.9318\%$$

$$I_5 = (y_8 / y_2)100 = 99.6685\%$$

$$I_6 = (y_9 / y_3)100 = 100.1995\%$$

$$I_{\text{tiempo 2}} = (I_4 + I_5 + I_6) / 3 = 99.9333\%$$

3) Condición: Refrigeración

Tabla 53. Porcentajes de Recobro en Diferentes Tiempos

Inicial	1 hr	2 hr	C = 2	
100.0293	94.7714	91.0908	$y_0 = 99.9128$	$S_0^2 = 0.0113$
99.8205	95.2525	90.9532	$y_1 = 95.2073$	$S_1^2 = 0.1723$
99.8886	95.5979	91.3073	$y_2 = 91.1171$	$S_2^2 = 0.0319$

a) Varianzas Ponderadas

$$Sp_1^2 = (2S_0^2 + 2S_1^2) / 2 (C + 1) = 0.0612$$

$$Sp_2^2 = (2S_0^2 + 2S_2^2) / 2 (C + 1) = 0.0144$$

b) Intervalo de Confianza

$$t_{\text{dunnet}} = 2.86$$

$$(y_1 - y_0) \pm t_{\text{dunnet}} \sqrt{[Sp_1^2 (2/3)]} = -5.2833 \leq 0 \leq -4.1278$$

$$(y_2 - y_0) \pm t_{\text{dunnet}} \sqrt{[Sp_2^2 (2/3)]} = -9.0759 \leq 0 \leq -8.5155$$

c) Coeficiente de Variación

$$I_1 = (y_4 / y_1)100 = 94.7436\%$$

$$I_2 = (y_5 / y_2)100 = 95.4238\%$$

$$I_3 = (y_6 / y_3)100 = 95.7045\%$$

$$I_{\text{tiempo 1}} = (I_1 + I_2 + I_3) / 3 = 95.2906\%$$

$$I_4 = (y_7 / y_1)100 = 91.0641\%$$

$$I_5 = (y_8 / y_2)100 = 91.1168\%$$

$$I_6 = (y_9 / y_3)100 = 91.4091\%$$

$$I_{\text{tiempo 2}} = (I_4 + I_5 + I_6) / 3 = 91.1967\%$$

C. Comparación de Métodos Analíticos

1. Precisión (Repetibilidad)

$$Sx_1 = 0.6552$$

$$Sx_2 = 0.3145$$

a. Planteamiento de la Hipótesis

$$H_0: (\sigma_1^2 / \sigma_2^2) \leq 1$$

$$H_a: (\sigma_1^2 / \sigma_2^2) > 1$$

b. Estadígrafo de Prueba

$$R_0 = (\sigma_1^2 / \sigma_2^2) \text{ en } H_0 = 1 \quad F_{1-\alpha/2} = 5.05 \quad F_{\alpha/2} = 0.19801$$

$$F = Sx_1^2 / [(Sx_2^2)(R_0)] = 4.3407$$

c. Intervalo de Confianza

$$\{Sx_1^2 / [(Sx_2^2)(F_{1-\alpha/2})]\} \leq (\sigma_1^2 / \sigma_2^2) \leq \{Sx_1^2 / [(Sx_2^2)(F_{\alpha/2})]\}$$

$$0.8595 \leq \sigma_1^2 / \sigma_2^2 \leq 21.9218$$

2. Exactitud

$$DEp = \sqrt{\{[(n_1 - 1) Sx_1^2] + [(n_2 - 1) Sx_2^2]\} / (n_1 + n_2 - 2)} = 0.5139$$

$$I.C = (x_1 - x_2) \pm DEp \sqrt{[(1 / n_1) + (1 / n_2)]} = -1.1851 \leq 0 \leq 0.2155$$

3. Linealidad

a. Cálculos Preliminares

$$S_E^2 = (\Sigma y_1^2 - m_1 \Sigma xy_1 - b_1 \Sigma y_1) + (\Sigma y_2^2 - m_2 \Sigma xy_2 - b_2 \Sigma y_2) / t_1 n_1 + t_2 n_2 - 4$$

$$S_E^2 = 7.5285$$

b. Pendientes de la Cantidad Adicionada-Cantidad Recuperada

$$S^2 dm = S_E^2 \{ [1/\Sigma x_1^2 - (\Sigma x_1)^2/n_1 t_1] + [1/\Sigma x_2^2 - (\Sigma x_2)^2/n_2 t_2] \} = 0.7031$$

$$g.l = [(t_1 n_1) + (t_2 n_2)] - 4 = 26 \quad t_{\text{student}} = 2.0555$$

$$IC = (m_1 - m_2) \pm t_{\text{student}} \sqrt{S^2 dm} = -1.7197 \leq 0 \leq 1.7272$$

c. Ordenadas de la Cantidad Adicionada-Cantidad Recuperada

$$S^2 do = S_E^2 \{ (1/n_1 t_1) + (1/n_2 t_2) + [(\Sigma x_1)^2/n_1^2 t_1^2 (\Sigma x_1^2 - (\Sigma x_1)^2/n_1 t_1) +$$
$$[(\Sigma x_2)^2/n_2^2 t_2^2 (\Sigma x_2^2 - (\Sigma x_2)^2/n_2 t_2)] \} = 52.8348$$

$$IC = (b_1 - b_2) \pm t_{\text{student}} \sqrt{S^2 do} = -20.1108 \leq 0 \leq 9.77101$$