



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Validación de un electrodo selectivo a iones fluoruro y su
aplicación en la cuantificación de esta especie en muestras
reales.

Tesis

Que para obtener el título de:

Química

Presenta:

Martha Teresa Mendoza Gil

Asesor: Dr. Rodolfo Gómez Balderas

Coasesora: Dra. María del Rosario Moya Hernández

Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

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

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Validación de un electrodo selectivo a iones fluoruro y su aplicación en la cuantificación de esta especie en muestras reales

Que presenta la pasante: Martha Teresa Mendoza Gil
Con número de cuenta: 407092657 para obtener el Título de: Química

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 04 de noviembre de 2013.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. María Gabriela Vargas Martínez	
VOCAL	Dr. Rodolfo Gómez Balderas	
SECRETARIO	Dr. Julio Cesar Botello Pozos	
1er. SUPLENTE	M.C. Enrique Ramos López	
2do. SUPLENTE	Q. Lidia Elena Ballesteros Hernández	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

AGRADECIMIENTOS

En este instante tan especial, en que he terminado una etapa de mi formación, deseo agradecer especialmente a la vida y al todo poderoso por permitirme cumplir un objetivo que tenía planeado realizar. No todos los días se realiza una tesis y puedo decir que es una experiencia única y compleja de describir. En la vida de cada persona existen objetivos y metas que cumplir. Personalmente creo que he cumplido uno de ellos, pero aún faltan unos tantos más.

Mis sentimientos se transforman en palabras y es que se me vienen a la memoria muchas personas que ayudaron y que algo tuvieron que ver para que yo pudiera realizar esta tesis.

En especial agradezco a mi madre, la que me ha entregado unos principios únicos y por enseñarme a enfrentar la vida. Gracias por entregarme ese consejo oportuno en mi adolescencia, a motivarme a estudiar y a realizar lo que a mí me gusta; este triunfo es por ti y para ti ¡Te amo mamichis! A mis hermanas Esmeralda y Maricarmen, por darme ánimos y las energías a veces necesarias; no pudieron ser mejores las quiero.

A ti Rubén, gracias por tu infinita paciencia, por tu tierna compañía y tu inagotable apoyo. Por compartir mi vida y mis logros, esta tesis también es tuya. ¡Te amo cosa!

A Marco, Karla, Fany, Ana, Martín, Dulce y Ady; algunos amigos inseparables de carrera, otros tuve la oportunidad de conocerlos durante el desarrollo de la presente tesis, les doy las gracias por compartir conmigo momentos de alegría, enojo, tristezas y muchas experiencias. ¡Gracias amigos!

A mis asesores de tesis; Dra. Rosario Moya y Dr. Rodolfo Gómez por aceptarme en su equipo de trabajo y el apoyo brindado para la realización de esta tesis.

A mis sinodales por el tiempo dedicado para la revisión de este trabajo y los consejos para mejorarlo; pero en especial a la Dra. Gaby Vargas y la Dra. Lupita por la amistad brindada y conocimiento impartido durante esta etapa de mi vida. ¡Gracias!

Al Proyecto PAPIME PE203911 por el apoyo económico brindado para la realización de esta tesis.

A la UNAM, por permitirme el placer y orgullo de ser universitaria, darme formación académica, por los amigos que allí conocí y por darme la oportunidad de concluir mi licenciatura.

Por mi raza hablará el espíritu.

ÍNDICE GENERAL

1. RESUMEN	7
2. OBJETIVOS	9
3. ANTECEDENTES	10
3.1. El Flúor	10
3.1.1. Fuentes de Flúor	13
3.1.2. Metabolismo del Flúor	16
3.1.2.1. Ingestión y Absorción	16
3.1.2.2. Distribución y excreción en el organismo	17
3.1.3. Vías de Administración del Flúor	20
3.1.4. Toxicidad del Flúor	21
3.1.5. Fluorosis	22
3.1.5.1. Fluorosis Mundial	25
3.1.5.2. Fluorosis en México	26
3.1.6. Métodos para la cuantificación de Flúor	27
3.2. Sensores Químicos	30
3.3. Electrodos Selectivos a Iones (ISE's)	31
3.3.1. Historia de los Electrodos Selectivos a Iones	32
3.3.2. Clasificación de los ISE's	35
3.3.3. Principio de Medición	39
3.3.4. Electrodo Selectivo a Iones Fluoruro	41
3.3.5. Variables a considerar en una medida con ISE	44
3.3.6. Ventajas y Desventajas de los ISE's	46
3.4. Validación	47
3.4.1. Definición, importancia y necesidad de validación	47
3.4.1.1. Definición general e importancia del proceso de validación	47
3.4.1.2. Necesidad de una validación	48

3.4.1.3. Cuándo realizar una validación	49
3.4.2. Clasificación de métodos analíticos.....	50
3.4.2.1. Según la normalización y estado de desarrollo del método	50
3.4.2.2. Según categoría del método	51
3.4.3. Parámetros de desempeño.....	52
3.4.3.1. Linealidad	52
3.4.3.2. Límite de Detección (LD).....	52
3.4.3.3. Límite de Cuantificación (LC)	53
3.4.3.4. Exactitud	53
3.4.3.5. Precisión	53
3.4.3.6. Sensibilidad.....	55
3.4.3.7. Robustez.....	55
4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	56
4.1. Materiales, Equipos y Reactivos.....	56
4.2. Procedimiento Experimental.....	58
4.2.1. Calibración y verificación de la operación del ESI de fluoruros	58
4.2.2. Validación del método.....	61
4.2.3. Aplicación del método validado (Curva de Calibración).....	71
5. RESULTADOS Y ANÁLISIS EXPERIMENTALES.....	77
5.1. Calibración y verificación de la operación del ESI de fluoruros	77
5.2. Validación del Método	78
5.3. Aplicación del método validado (Curva de Calibración).....	97
6. CONCLUSIONES.....	104
7. BIBLIOGRAFÍA.....	105
8. ANEXOS.....	114

1. RESUMEN.

El fluoruro se considera importante para la salud debido a su efecto beneficioso en la prevención de la caries dental y en el desarrollo óseo. Sin embargo, una ingesta excesiva produce determinadas patologías, como fluorosis dental y esquelética, algunos trastornos gastrointestinales, disfunción renal e incluso reducciones de las capacidades cognitivas en la población infantil (Chinoy, 1991; Takahashi, 1998). El objetivo de esta tesis es la validación de un método potenciométrico utilizando un electrodo selectivo a iones fluoruro y la cuantificación de esta especie en enjuagues bucales.

En química analítica es de gran importancia reportar resultados confiables, para lo cual es necesario establecer el proceso de validación para los métodos aplicados en el laboratorio. Dicho proceso de validación consiste en demostrar estadísticamente que el método es adecuado para un propósito determinado, esto es, que posee alto grado de confiabilidad, que puede ser aplicado a un amplio número de muestras y matrices y que es práctico con relación al costo y tiempo requerido en el análisis. La validación es definida como el proceso establecido para la obtención de pruebas documentadas y demostrativas de que un método de análisis es lo suficientemente fiable y reproducible para producir el resultado previsto dentro de intervalos definidos. Para la validación de este método se utilizaron los parámetros: linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, sensibilidad, precisión, exactitud y robustez, de los cuales cada parámetro mostró valores adecuados a excepción del parámetro de robustez de acuerdo a los criterios de aceptación establecidos en el documento normativo NMX-AA-077-SCFI-2001 y la Guía de Validación *de Métodos Analíticos* del Colegio Nacional de químicos Farmacéuticos Biólogos.

En la República Mexicana se comercializan varios productos para la higiene y cuidado personal, entre ellos dentífricos y enjuagues bucales, los cuales se venden en diferentes centros comerciales, mercados marginales, tiendas, abarroterías, y otros lugares similares; la venta de productos para la higiene bucal, entre los que se puede observar claramente la presencia de mayor comercialización, y por lo tanto consumo, de enjuagues bucales (Arellano R, 2009); dichos productos se han estudiado y analizado en cuanto a su concentración de flúor que reportan los

fabricantes en los productos finales. El presente estudio se basó en el **PROYECTO de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-219-SSA1-2002, Límites máximos de concentración de fluoruros en productos higiénico-odontológicos e insumos de uso odontológicos fluorados**; la cual fue cancelada el 21 de septiembre del 2011. Las marcas seleccionadas para el estudio fueron elegidas al azar, independientemente de la marca, concentración y presentación, para un total de 13 marcas analizadas. Se analizaron por duplicado. Como resultado se encontró que de las trece marcas; siete marcas no cumplieron con la cantidad de flúor declarada en la etiqueta del producto ni la recomendada por la ADA (Asociación Dental Americana); y solo tres cumplen con la cantidad indicada en la etiqueta y la recomendada por la ADA; mientras que dos solo cumplen con la concentración indicada en la etiqueta, pero no la recomendada por la ADA, y una marca cumple con lo recomendado por la ADA pero no así con lo declarado en la etiqueta.

Con respecto al cumplimiento de los niveles de flúor en los enjuagues bucales comercializados en nuestro país, no sé cuenta con una normativa en la cual se especifiquen los parámetros mínimos a cumplir; cantidades de agentes anticaries, en este caso agentes fluorizantes. Para el cumplimiento de este parámetro depende no sólo de la marca o industria que lo fabrique con respecto a la calidad y apegó a las normativas, sino también a las especificaciones que se indican tanto en su etiquetado como en su parte publicitaria, en las cuales aseguran las propiedades profilácticas para la prevención de caries. Otro factor muy importante es que para el cumplimiento de estos parámetros, principalmente el flúor, se debe de tomar en cuenta que existen varios agentes fluorizantes y por lo tanto diferentes concentraciones encontradas en las distintas formulaciones de estos productos; fluoruro estañoso, fluoruro de potasio y monofluorofosfato de sodio (Katz, McDonal y Sookey, 1975).

2. OBJETIVOS.

2.1 OBJETIVOS GENERALES.

- Validar el método potenciométrico utilizando un electrodo selectivo a iones fluoruro mediante la determinación de los parámetros mínimos necesarios establecidos en diferentes guías de validación, para obtener resultados confiables en la medición del ion fluoruro.
- Aplicar el método validado para su uso en la determinación y cuantificación de fluoruro en muestras reales (enjuagues bucales).

2.2 OBJETIVOS PARTICULARES.

- Identificar los parámetros mínimos necesarios para validar el método potenciométrico para un ISE de fluoruros, mediante la revisión de diferentes guías de validación.
- Establecer una metodología analítica para determinar cada uno de los parámetros establecidos.
- Cuantificar el contenido de flúor en forma de ión fluoruro en enjuagues bucales comercializados en la República Mexicana para:
 - (a) Identificar aquellos que rebasan los límites permisibles de acuerdo al *PROY-NOM-219-SSA1-2002, Límites máximos de concentración de fluoruros en productos higiénico-odontológicos e insumos de uso odontológicos fluorados.*
 - (b) Verificar que cumplan con la cantidad de flúor declarada en la etiqueta.
 - (c) Comprobar que contengan la concentración de flúor recomendada por la Asociación Dental Americana (ADA).

3. ANTECEDENTES.

3.1. EL FLÚOR.

La historia del flúor se remonta al siglo XVI. El mineralogista alemán Georgius Agrícola describió en 1529 el espatoflúor en su obra *De re metálica* y lo llamó *flúor lapis o piedra fluida* porque se licuaba y fluía con mucha facilidad. Marggraf (1768) estudió la reacción entre el fluoruro de calcio y el ácido sulfúrico. El químico sueco Karl W. Scheele fue el primero en estudiar el vapor de la fluorita en 1771. Demostró que el vapor era un ácido y lo llamó ácido fluórico, por ello se le considera el descubridor de esta sustancia (Katz, McDonald, Stookey, 1986), (Higashida, 2000). La presencia de flúor en materiales biológicos fue observada por primera vez en 1803 por Morichini en los dientes de elefantes fósiles. Berzelius en 1823 detectó los niveles de fluoruro en el agua (González, Casado, Fernández, 1998). Ya muy avanzado el siglo XIX, Moissan (1886) logró aislar el flúor, un gas amarillo-verdoso pálido. Por tal descubrimiento Moissan fue galardonado con el Premio Nóbel de Química en el año 1906 (Herazo B., 1988), (Katz, McDonald, Stookey, 1986). Años más tarde, en 1916, los epidemiólogos Black y McKay establecen la relación entre la presencia de esmalte moteado, o fluorosis dental, y la ingesta de aguas muy ricas en flúor (González, Casado, Fernández, 1998).

La palabra flúor proviene del griego "*fluere*" que significa fluir (Revista Odontológica Mexicana, 2005). El flúor es uno de los elementos más abundantes en la corteza terrestre (13^a posición). Su concentración media es de 625 mg/kg representando del 0.06% al 0.09% de la misma (OMS, 1994; Ozsvath, 2009; US EPA, 2010). Los contenidos de fluoruro oscilan entre 100 mg/kg en rocas calizas ultramáficas, 1000 mg/kg en rocas alcalinas ígneas y 1300 mg/kg en rocas marinas (Hem, 1985). Se conocen alrededor de 170 minerales que contienen flúor. Los minerales más importantes y abundantes en los que está presente en su composición química y los más representativos son la fluorita (CaF_2), fluorapatita ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$), criolita (Na_3AlF_6), villiaumita (NaF), topacio [$\text{Al}_2(\text{SiO}_4)\text{F}_2$] y sellaíta (MgF_2) (Nagendra Rao, 2003).

El flúor pertenece al grupo de los halógenos y a temperatura ambiente es un gas amarillo pálido, que se presenta en forma diatómica (F_2). Es el más electronegativo de todos los elementos de la tabla periódica (potencia estándar estimado +2.85 V), por ese motivo raramente se encuentra

en la naturaleza en estado elemental. Es capaz de reaccionar a temperatura ambiente con todos los elementos excepto con el oxígeno y el nitrógeno, y reacciona vigorosamente con la mayoría de compuestos orgánicos. En disolución acuosa se encuentra en forma de ion fluoruro (F^-), el cual tiende a formar complejos con iones metálicos (FeF_6^{-3} , AlF_6^{-3} , MnF_5^{-2} , MnF_3^- , ZrF_6^{-2} , ThF_6^{-2}). La química del ión fluoruro (F^-) es muy similar a la del ión hidroxilo (OH^-), por lo tanto el intercambio entre estos iones es muy común en la naturaleza (Dharmagunawardhane y Dissanayake, 1993). Algunos fluoruros son insolubles o presentan una baja solubilidad, como es el caso de los fluoruros de litio, aluminio, estroncio, bario, plomo, magnesio, calcio y manganeso.

Los fenómenos geológicos naturales son los que más contribuyen a incrementar los contenidos de fluoruro en el medioambiente, no siendo menos relevante el impacto de la actividad humana que se reduce a procesos industriales de ladrilleras, cerámica, fundición de aluminio, hierro y acero, así como al uso de fertilizantes a base de fosfato (Cronin y col., 2000) (Fig. 1).

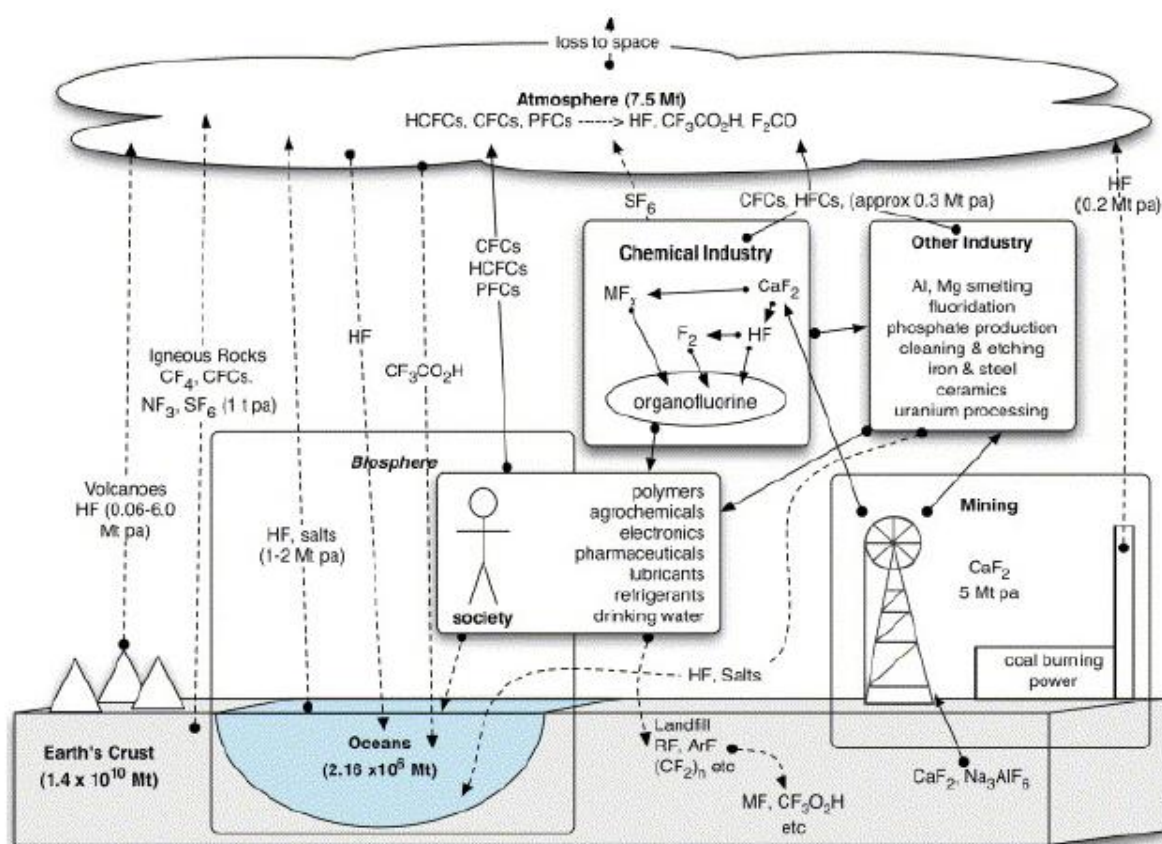


Figura 1. Ciclo del flúor y derivados en el medio ambiente. (Crutzen, 2006).

La actividad volcánica es la principal fuente natural de fluoruro e incrementa notablemente el contenido en aire, suelos y aguas superficiales o subterráneas de zonas adyacentes (D'Alessandro, 2006). Entre los elementos eliminados en una erupción volcánica, el fluoruro está considerado el más crítico en cuanto a los efectos perjudiciales para la salud (EFSA, 2010). Este elemento aparece formando parte de cenizas y rocas volcánicas (D'Alessandro, 2006), así como en forma de gas, principalmente HF, que posteriormente se deposita en suelos como sales de NaF y KF cuya solubilidad en agua es elevada (EFSA, 2005). El episodio más reciente de alerta ante los posibles riesgos de exposición a fluoruro como consecuencia de una erupción volcánica se produjo en abril del 2010 al entrar en erupción el volcán islandés Eyjafjallajökul (EFSA, 2010).

Las aplicaciones del flúor son numerosas. El fluoruro de hidrógeno se emplea en la producción de varios fluoruros inorgánicos. El más importante es el hexafluoruro de uranio (UF_6) que se utiliza para el enriquecimiento de uranio en la industria nuclear (IPCS, 1984). Otro producto del flúor gas es el hexafluoruro de azufre (SF_6), usado como gas dieléctrico para equipos eléctricos o electrónicos o como gas para trazar movimientos de gases o aire en edificios (IPCS, 1984). El fluoruro de hidrógeno (HF) se utiliza para manufacturar aluminio y para producir polímeros como el teflón y compuestos fluorocarburos (CFCs), los cuales se emplean como aerosoles, refrigerantes y solventes. Se emplea también para separar isótopos de uranio (ATSDR, 2003). Debido a su amplio uso, el HF posiblemente sea el principal contaminante fluorado presente en la atmósfera por causas antropogénicas, sin embargo es poco persistente ya que su elevada reactividad no le permite permanecer tiempo prolongado en su forma original.

Dentro de las sales que se generan a partir del fluoruro de hidrógeno, el fluoruro sódico (NaF) es la más importante. Esta sal fue el primer derivado empleado en la fluoración del agua de bebida. Además de NaF, en los sistemas de fluoración de aguas se usan otros derivados como el ácido fluorosilícico, subproducto en la fabricación de fertilizantes fosforados, y el hexafluorosilicato de sodio obtenido por neutralización alcalina de ácido fluorosilícico (Masten, 2001).

La aplicación de derivados de fluoruros a la medicina también está ampliamente extendida. Numerosos fármacos con fluoruros en su composición se emplean como anestésicos, antibióticos, agentes anticancerígenos y antiinflamatorios (Strunecká y col., 2004). Asimismo, derivados sintéticos de fluoruros como el monofluorofosfato sódico (Na_2FPO_3) se emplean en la elaboración

de pastas dentífricas, debido a su compatibilidad con los abrasivos empleados en este tipo de productos (EFSA, 2008).

El fluoruro resulta de interés por sus propiedades tóxicas y sus efectos sobre el esmalte dental y los huesos. Está ampliamente distribuido en la naturaleza y su contenido varía en forma pronunciada en los suelos de diferentes regiones del mundo. El hombre obtiene fluoruro mediante la ingestión de vegetales y agua (Goodman & Gilman, 2001).

3.1.1. FUENTES DE FLÚOR.

▣ *Agua* (OPS, 1987), (OMS, 1986).

La presencia general de los fluoruros en la corteza terrestre y toda el agua del planeta contienen fluoruros en concentraciones variables; la mayor parte del agua que normalmente puede utilizar el hombre, participa en el ciclo biológico, lo cual significa que tiene su origen en los océanos. El agua del mar contiene cantidades considerables de fluoruros que oscilan entre 0.8 y 1.4 mg/Kg. El contenido de fluoruros del agua de lagos, ríos o pozos artesianos es casi siempre inferior a 0.5 mg/Kg con excepción de aquéllos que se relacionan con yacimientos minerales o volcánicos; éstos suelen tener niveles desde 3– 6 mg/Kg. Las aguas con un elevado contenido de fluoruros se hallan por lo general al pie de las altas montañas, cabe mencionar que la más elevada concentración natural de fluoruros jamás encontrada en el agua se registro en el lago Nakuru en el valle de Rift en Kenya con 2800mg/L.

▣ *Aire* (OPS, 1987), (OMS, 1986).

Los fluoruros se encuentran ampliamente diseminados en la atmósfera proveniente del polvo de los suelos ricos en fluoruro y de los gases emitidos en zonas de actividad volcánicas, zonas industriales. La concentración en el aire varía dependiendo del tipo de actividad industrial, pero se calcula que la exposición general es equivalente a menos de $1\mu\text{g}/\text{m}^3$ de aire, que es insignificante si se compara con el flúor que se ingiere.

☒ *Alimentos*

El fluoruro es un componente natural de los alimentos y agua de beber; sin embargo, la concentración varía dependiendo del tipo de alimento, la región geográfica y las condiciones de producción, así como de los procesos de preparación y hábitos de consumo (Gómez, 2002).

Así, la familia de los té, que incluye té y camelias, almacena fluoruros. Las hojas de té secas contienen de 100 a 400 ppm, dependiendo de la marca comercial. Una medida de infusión de té contiene entre 1.4 y 3.6 ppm de fluoruro y la adición de leche no disminuye la cantidad del ión; por tanto, en países donde el consumo de té es alto, como Inglaterra, la cantidad de flúor en el esqueleto de los adultos es mucho mayor que en aquellos donde el consumo es menor (Huerta, 1997).

El pescado es una gran fuente de flúor, especialmente si se consume con hueso (como las sardinas en lata) y la mayor concentración aparece en la piel y cartílago (Huerta, 1997). La **Tabla 1** muestra un resumen de los contenidos de fluoruro en distintos grupos de alimentos. Por otra parte, los recipientes fabricados con teflón (un polímero a base de flúor) pueden ceder parte del mineral a los alimentos que en él se cocinan (Huerta, 1997).

GRUPO DE ALIMENTOS	ALIMENTOS	CONCENTRACIÓN DE FLÚOR (ppm)
Té	Camelias	100-400
Pescado	Pescados frescos	5-7
Cereales	Cebada	1.5
	Arroz	4
	Frijol de soja	7
Leguminosas	Lentejas	18
Vegetales	Espinacas	3.8
	Tomate	41
	Papas	3
Frutas	Uvas	0.02-0.8
Carnes	Carne	1
	Hígado de vaca	5.5
	Riñón	2.5

Tabla 1. Contenido de flúor en varios grupos de alimentos (mg/kg peso húmedo o mg/L). Fuentes: Taves, 1983; EFSA, 2005; Fawell y col., 2006; Usyduy y col., 2008; Usyduy y col., 2009.

▣ *Bebidas* (OMS, 1986).

El agua que ingiere el humano constituye el mayor aporte a la ingestión diaria de fluoruros. La ingestión de fluoruros con el agua dependerá de:

- La concentración de fluoruros de ésta.
- Edad de la persona.
- Las condiciones climáticas.
- Los hábitos alimentarios.

El consumo de líquidos aumenta con la edad en especial desde el nacimiento hasta los 12 años. No obstante se ha demostrado que durante ese periodo el agua de bebida puede representar como máximo el 50% de la ingestión total de líquidos dentro de una población dada. El factor más importante para determinar el volumen de agua consumida es la temperatura diaria máxima que prevalece en la zona correspondiente.

La leche materna tiene un contenido bajo de fluoruros, inferior a 0.02 mg/L sin que parezca existir variación alguna a lo largo del día, la diferencia es escasa o nula entre el nivel de fluoruros presente en la leche de las madres que viven en zonas cuya agua contiene 0.1 mg/L de fluoruros. La concentración de fluoruros en la leche de vaca contiene de 0.02 mg/L – 0.05 mg/L.

▣ *Productos farmacéuticos para la prevención de la caries* (OMS, 1986).

Un sin número de productos farmacéuticos contienen fluoruros en forma orgánica o inorgánica. Ciertos productos como los comprimidos de fluoruro sódico o las tabletas a base de fluoruros y vitaminas, se emplean en forma de suplementos fluorados para prevenir las caries.

Los comprimidos suelen contener 0.25 – 0.50 mg o hasta 1.0 mg de fluoruro. La concentraciones de fluoruros en las soluciones y geles para el tratamiento tópico contienen entre 0.25 mg y 2.4 mg de fluoruro por litro o por kilogramo. La mayor parte de los dentífricos fabricados actualmente contienen entre 1.0 mg a 1.5 mg de fluoruros/Kg.

Preocupa particularmente la posibilidad de que los niños pequeños ingieran el dentífrico (fluorado) en ayunas o durante el cepillado, debido a que los fluoruros del dentífrico se absorbe por completo.

3.1.2. METABOLISMO DEL FLÚOR.

3.1.2.1. Ingestión y Absorción.

A pesar de que el flúor puede ingresar al organismo por vía inhalatoria, con la inspiración del polvo, gases anestésicos o gases procedentes de erupciones volcánicas o desechos industriales, la vía de absorción pulmonar es muy poco frecuente. Asimismo, la absorción a través de la piel sólo sucede bajo condiciones muy especiales, sobre todo por contacto con ácido fluorhídrico. La incorporación de flúor a partir de diferentes compuestos suele producirse por vía digestiva, dando lugar a su acumulación en el plasma sanguíneo, que constituye el compartimiento central a partir del cual se produce tanto su distribución a los tejidos orgánicos como su eliminación (Huerta, 1997).

La absorción de los fluoruros presentes en la dieta depende de la concentración, solubilidad y grado de ionización del compuesto ingerido. La absorción del fluoruro proveniente de compuestos solubles es rápida y casi completa; sin embargo, puede reducirse ligeramente por la presencia de otros elementos en la dieta, capaces de formar complejos con el fluoruro, obteniéndose formas relativamente insolubles que alteran la absorción. El organismo recibe habitualmente el aporte de flúor a partir de fluoruros inorgánicos, pero la solubilidad de estas sustancias no es uniforme, lo que permite clasificarlos como:

- *Solubles*: Fluoruro de sodio, ácido fluorhídrico, silicofluoruro de sodio.
- *Relativamente insolubles*: Fluoruro de calcio, fluorapatita, fluoruro de magnesio.
- *Inertes*: Fluoruroborato de potasio (Huerta, 1997; González, 1999; Rivas, 2005).

En función de su solubilidad, estos compuestos liberan iones fluoruros. Sólo la absorción en forma iónica tiene efectos biológicos significativos en odontología, medicina o salud pública (Huerta, 1997).

La absorción del flúor es un proceso especialmente pasivo, en el que no participa ningún mecanismo activo de transporte. Se realiza tanto en el estómago como en el intestino delgado y está relacionado con la acidez gástrica (presencia de iones H^+) (Huerta, 1997).

Cuando el flúor en forma iónica (F^-) aparece en el estómago, se combina rápidamente con los iones hidrógeno y se convierte en ácido fluorhídrico (HF), una molécula sin carga que atraviesa fácilmente las membranas biológicas, incluyendo la mucosa gástrica. En ratas se ha demostrado que si se neutraliza la acidez del estómago, se produce una brusca reducción de la absorción gástrica, que se acompaña de una sensible disminución de los niveles plasmáticos de flúor (Huerta, 1997).

La absorción de flúor a partir de formas solubles se produce de una manera bastante regular en condiciones normales; no obstante, como ya se mencionó, depende también de otros componentes de la dieta. Aproximadamente se absorbe el 80 % de los fluoruros de la alimentación humana, pero si se añaden compuestos de calcio o de aluminio, la absorción disminuye de una manera notable, hasta un 50%, debido a que el fluoruro se combina para dar compuestos menos solubles, con el consiguiente aumento de la cantidad eliminada en las heces (Huerta, 1997).

La absorción mineral a partir de la dieta oscila entre 40 y 100%, alcanzándose cifras en el plasma de entre 20 y 100 microgramos por decilitro del mineral combinado con albúmina plasmática.

El flúor en plasma se puede presentar de dos formas:

- 1) *Fluoruro iónico*, también llamado fluoruro libre o inorgánico
- 2) *Fluoruro no iónico o fluoruro combinado*. Éste va ligado a proteínas plasmáticas.

Estas dos formas determinan el fluoruro plasmático total (Huerta; 1997).

3.1.2.2. Distribución y excreción en el organismo.

El 50% del flúor es absorbido en el estómago e intestino aproximadamente en 30 minutos. La forma ionizante es la que atraviesa, por transporte pasivo, la membrana celular; la forma iónica no ingresa en la célula (González, 1999).

El flúor absorbido pasa al plasma sanguíneo y luego es distribuido a los diferentes tejidos, donde se mantiene de forma proporcional con respecto a la concentración plasmática (González, 1999).

El plasma sanguíneo es la pieza clave en la distribución del flúor en el organismo, ya que recibe el ión absorbido e inerte, tanto para su distribución a los tejidos orgánicos, como para su

eliminación por vía renal. La absorción del flúor es mayor en soluciones acuosas que cuando está ligado a proteínas (Huerta, 1997).

En la sangre se encuentra flúor inorgánico en concentraciones que dependen de la dieta (10-50 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$). El flúor orgánico varía según la industrialización del medio y un conjunto de factores ambientales. Por ejemplo, en el medio rural la concentración es menor que en lugares industrializados.

La concentración de flúor en los diferentes tejidos, luego de la absorción, depende de la ingesta y de la depuración plasmática. Esta última se efectúa en proporciones iguales a través de la captación en los tejidos calcificados y la excreción renal.

La afinidad de los tejidos calcificados por el flúor es importante, determinando su retención persistente y acumulativa en el hueso, y es mayor en los organismos en crecimiento. En el recién nacido, cerca del 90 % del flúor absorbido es retenido en el hueso. Hasta el 75% del flúor absorbido puede ser depositado en tejidos calcificados, con una alta deposición especialmente en niños en período activo de crecimiento de los huesos. Esta afinidad decrece con la edad y se estabiliza al completarse el desarrollo del esqueleto (Lewis, 1986).

La concentración de flúor en la leche materna es constante (0.008 ppm) e independiente de la concentración plasmática del mismo en la madre, lo que puede considerarse como el único mecanismo de regulación homeostática de este ión presente en el ser humano (Colín, 2006).

La mayoría de los fluoruros son absorbidos y transportados en el cuerpo y después excretados en forma de ión (Nikiforuk, 1985).

Los fluoruros son excretados por medio del riñón, el intestino y la piel. Los fluoruros con una baja solubilidad, y por tanto una baja absorción, son excretados por el intestino. Bajo condiciones en las cuales la ingestión de fluoruro es de 0.4 – 0.6 mg en comida y agua por día, la excreción fecal es del 8 % en relación a la ingestión total y sobre 10 % por vía urinaria (Rivera, 2001)

Ophaug (1991), Withford (1976), Delgado y col. (1991) y Shannonn y Sanders, (1979) han señalado que la excreción renal es la vía principal de eliminación del flúor ingerido; excreción que se produce también mediante procesos que son modificados por el pH. La excreción renal consta de filtración glomerular seguida de distintos grados de reabsorción tubular. Los pH bajos, es decir, la acidificación de la orina, aumentan la reabsorción y reducen la eliminación, y los pH altos, o la alcalinización de la orina, reducen la reabsorción e incrementan la eliminación (Hedman, 2006).

Como ya se indicó, la excreción está en función de la ingesta, de tal manera que cuando la exposición al flúor es regular, las concentraciones del elemento en la orina tienden a alcanzar las concentraciones presentes en el agua de consumo habitual (Hedman, 2006).

Belcourt (1988) y Delgado y col. (1991) han propuesto que también se excreta flúor a través del sudor y las heces, aunque ambas vías están muy limitadas por numerosos factores, suponiendo sólo un 10% del total del flúor ingerido (Hedman, 2006). En la **Figura 2** se esquematiza el metabolismo del flúor en el organismo.

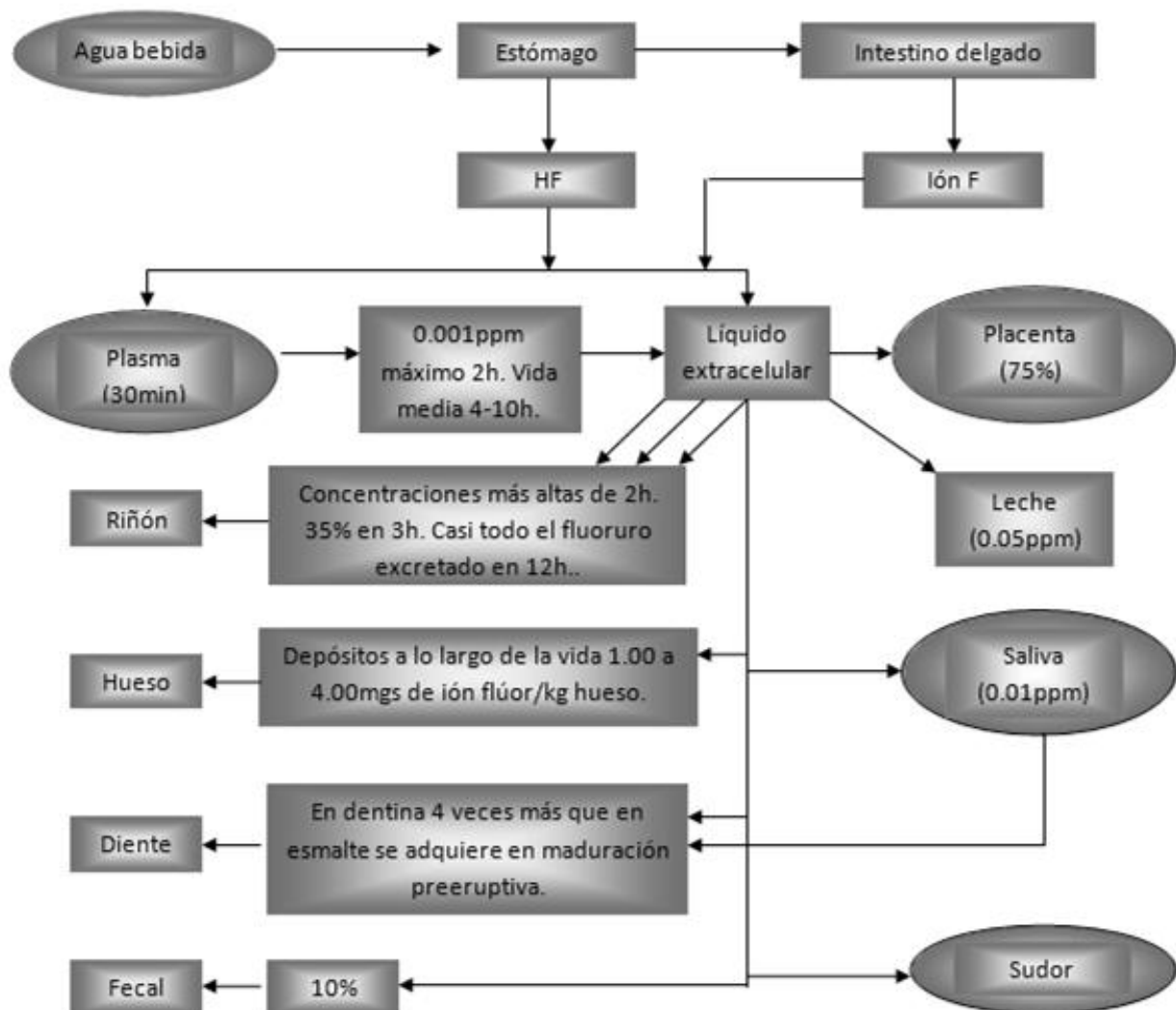


Figura 2. Metabolismo del flúor en el organismo.

3.1.3. VÍAS DE ADMINISTRACIÓN DEL FLÚOR.

1) *Vía sistémica.*

El flúor ingerido y transportado a través de la sangre, se deposita fundamentalmente en el hueso y en menor medida en el diente. Se puede administrar de varias formas:

- Fluoración de las aguas de consumo público (la concentración óptima en climas templados se sitúa en 1mg de flúor por litro).
- Fluoración de agua en las escuelas.
- Aguas de mesa con flúor.
- Fluoración de los alimentos, como sal, leche, harina o cereales.
- Suplementos dietéticos fluorados. Pueden prescribirse desde el nacimiento a los 13 años a los niños que vivan en áreas en las que el agua contenga 0.7 mg/litro de flúor o menos. Pueden administrarse como gotas, tabletas y preparaciones vitamínicas.



Figura 3. Mapa del Continente Americano mostrando los países que están en proceso, o ya está establecida la fluoración de la Sal y Agua (Courtesy Estupinan-Day SR, 2001).

2) Vía Tópica.

Se puede administrar como:

- Enjuagues bucales y geles fluorados.
- Pastas de dientes fluoradas.

3.1.4. TOXICIDAD DEL FLÚOR.

1) Intoxicación aguda.

Son muy raros los casos de intoxicación aguda y los únicos descritos se han relacionado con la adición accidental de cantidades excesivas al agua potable en plantas de fluoración o la ingestión masiva casual.

La toxicidad de las pastas de dientes convencionales es muy baja. La concentración estándar es de 0.1% de flúor y de 0.05% en las pastas infantiles.

2) Intoxicación crónica.

La intoxicación crónica es mucho más frecuente. Actualmente se cree que la toxicidad crónica puede llegar a involucrar otras funciones orgánicas como la función renal, muscular y nerviosa aunque en ninguno de los estudios epidemiológicos realizados se ha encontrado evidencia alguna que sustente esta hipótesis.

La fluorosis esquelética o incapacitante se caracteriza por una excesiva mineralización de los huesos, calcificación de tendones y ligamentos y formación de exóstosis; se ha observado únicamente en trabajadores en contacto directo con espatoflúor y en zonas con aguas de consumo público con niveles de concentración de flúor de más de 20 mg/l.

También una fluorosis puede agravar una enfermedad renal preexistente y alterar otros procesos metabólicos del organismo.

3.1.5. FLUOROSIS (OMS, 1986).

Se define como la acumulación excesiva de flúor en los dientes y en los huesos, provocado por una ingesta alta y prolongada de fluoruro.

La fluorosis se produce por una ingesta excesiva y prolongada de flúor, y produce alteraciones óseas y dentarias.

Para minimizar el riesgo, la dosis a utilizar debe ser entre 0.05 y 0.07 mg/Kg de peso corporal y evaluar si está recibiendo flúor por otras fuentes.







Puede existir una intoxicación aguda por ingestión accidental de insecticidas o raticidas con sales de flúor que puede provocar la muerte. Sin embargo, lo más frecuente es una intoxicación crónica con pequeñas cantidades de flúor, que produce una fluorosis dental. Debido a este exceso de flúor, aparecen manchas en los dientes.

La **fluorosis dental** se define como una hipomineralización del esmalte dental inducida por la ingestión excesiva de fluoruros durante la etapa de formación de los dientes (Loyola-Rodríguez, 1998). En la fluorosis dental se observan manchas dentales amarillas y/o marrones. La fluorosis dental no solamente involucra un problema cosmético, sino un serio problema social también, en términos de autoestima y relaciones interpersonales (Rao, 2003).

La **fluorosis esquelética** se define como una hipermineralización ósea que provoca calcificaciones en ligamentos y cartílagos, así como un aumento de la densidad ósea fácilmente visible en la pelvis y la columna vertebral. Se produce una mayor rigidez de las articulaciones que puede causar deformaciones y fracturas óseas recurrentes (EFSA, 2005).

Los dientes y huesos humanos están compuestos principalmente de hidroxiapatita. Cuando están presentes los fluoruros, la sustitución del ión OH⁻ por el F⁻ da como resultado el reemplazo de la hidroxiapatita por la flúoroapatita en los dientes y huesos, lo cual es la causa principal de la fluorosis dental y la fluorosis esquelética (Dharmagunawardhane y Dissanayake, 1993).

Tabla 2. Índice de Dean para determinar la afectación del esmalte dental.

Índice de fluorosis dental de Dean			
CONDICIÓN	CÓDIGO	DESCRIPCIÓN	APARIENCIA
Sano o Normal	0	El esmalte del diente tiene su translucidez usual, la superficie es lisa, brillante, generalmente es de color crema pálido; se incluyen dientes con características de esmalte sano y se añaden las alteraciones del esmalte que no son originadas por la fluorosis.	
Cuestionable	1	Pequeñas aberraciones en la translucidez del esmalte normal, que pueden ir desde unas sombras blanquecinas a manchas blancas de uno o dos milímetros de diámetro.	
Muy Leve	2	Se observan áreas blancas opacas irregulares sobre la superficie de los dientes, especialmente en sus caras labiales. Menos del 25 % de la superficie de los dientes está afectada.	
Leve	3	Las líneas y áreas opacas del esmalte ocupan por lo menos la mitad, 50% de la superficie del diente. Las caras oclusales de los dientes afectados muestran una atrición moderada.	
Moderada	4	Toda la superficie del diente está afectada, hay marcado desgaste de las superficies sujetas a atrición. Puede o no presentar pigmentación.	
Severa	5	La superficie del esmalte está muy afectada. Se observan puntos hipoplásicos en la superficie dental y en algunos casos la forma del diente puede estar afectada.	

Manual para el uso de Fluoruros Dentales en la República Mexicana

3.1.5.1. FLUOROSIS MUNDIAL.

Los problemas asociados con el exceso de flúor en el agua de bebida están ampliamente distribuidos y son altamente endémicos en muchos países, por lo que la ingestión de agua que contiene concentraciones de flúor que exceden las permitidas, es un serio problema de salud pública (Rao, 2003)

La última información muestra que por lo menos en 25 países del globo terráqueo se presenta fluorosis endémica (Ayoob y Gupta, 2006). Las zonas más afectadas se muestran en la figura 5. El número total de personas afectadas no es conocido, pero una estimación conservadora es de varias decenas de millones. En 1993, 15 de los 32 estados de la India se identificaron como endémico para la fluorosis. En México, 5 millones de personas (aproximadamente 6% de la población) son afectadas por el fluoruro debido al agua subterránea. La fluorosis es prevalente en algunas partes de China central y occidental, y no sólo causada por el agua de bebida sino por la respiración de ambientes saturados con flúor por la combustión de carbón mineral contaminado con este elemento. Por este motivo existe una fluorosis industrial que está en aumento.

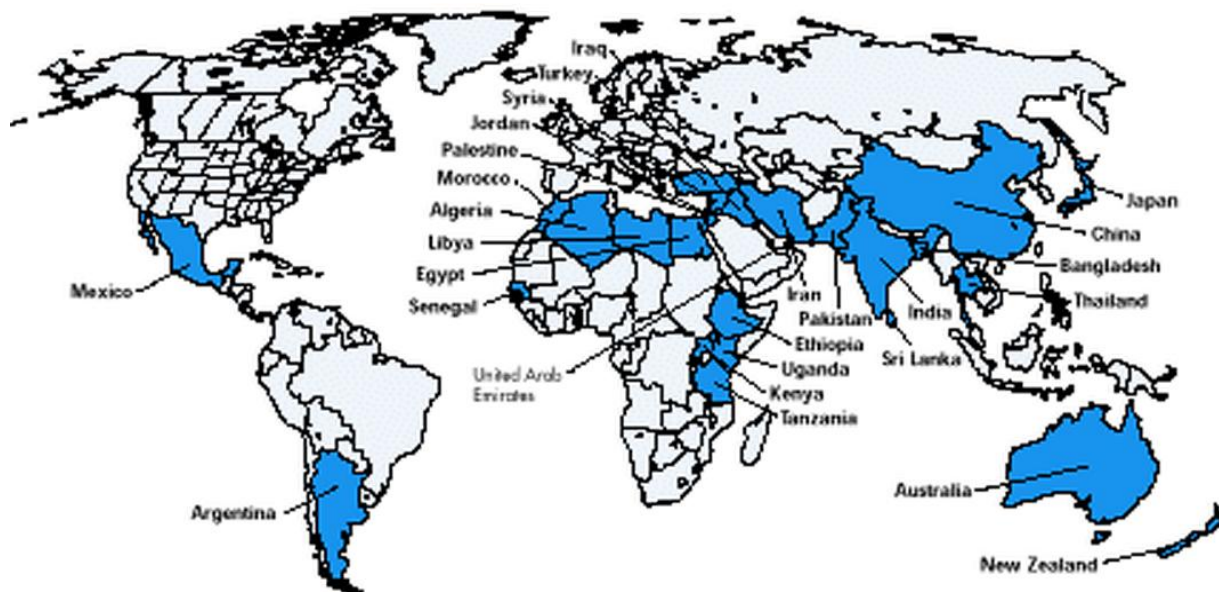


Figura 5. Mapa Mundial que muestra los diferentes países en color azul con fluorosis endémica debido al exceso de fluoruros en agua subterránea de bebida (Ayoob y Gupta, 2006).

Algunos gobiernos no son todavía totalmente conscientes del problema del fluoruro o no se convencieron de su impacto adverso en sus poblaciones. Se necesitan más esfuerzos para apoyar más investigaciones en este campo y promover políticas prudentes en los gobiernos con respecto al fluoruro como contaminante.

3.1.5.2. FLUOROSIS EN MÉXICO.

En México, la fluorosis dental es una afección que tiene una prevalencia importante incluso en las zonas donde la cantidad de flúor en el agua de consumo humano sobrepasa a las 2 ppm (Aguascalientes, Chihuahua, Durango, San Luis Potosí, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Puebla, Sonora, Tamaulipas, Baja California) (Trejo-Vazquez y Bonilla-Petriciolet, 2001). La relevancia de este problema no sólo se relaciona con su repercusión en los aspectos estéticos, sino además involucra las alteraciones físico-químicas del diente en desarrollo. Para el año de 1997 se reportó que en la República Mexicana, cerca de 5 millones de habitantes estaban expuestos a la excesiva ingesta de fluoruros a través del agua de bebida (Díaz-Barriga et al., 1997).

El fluoruro adicionado a productos de consumo humano como el agua y la sal ha demostrado efectos benéficos en poblaciones de otros países, manifestándose en una reducción significativa en la prevalencia de caries dental. En México, aunque existe una normatividad nacional respecto a los niveles óptimos en estos productos, se tiene antecedentes de una problemática llamada fluorosis dental que contrapone la relación daño-beneficio de esta medida.

La dieta representa la mayor fuente de consumo de flúor, ya sea de forma inadvertida o intencional siendo el consumo diario promedio de flúor a través de alimentos sólidos de alrededor de 0.3-0.5 mg. La Norma Oficial Mexicana 127A1-SSA1-1994, establece como límite máximo la concentración de 1.5mg/l en los sistemas de abastecimiento públicos y privados. La NOM-013-SSA2-1994, establece que la protección específica masiva contra la caries dental debe realizarse mediante la adición de fluoruro a la sal de consumo humano, argumentando que no debe adicionarse fluoruro a ningún otro condimento, alimento, golosina, refresco, goma de mascar y agua (redes de suministro a la población o agua envasada) por que puede causar fluorosis; en la áreas geográficas del país en donde la concentración del ión flúor sea igual o mayor de 0.7 ppm se debe evitar consumir fluoruro por vía sistémica y la utilización de productos fluorados (NOM-127A1-SSA1-1994). La documentación sobre las variaciones en el consumo de sal doméstica dificultan

aseguran una dosis correcta para la mayoría de los consumidores, sin incurrir en una sobredosis para algunos cuantos.

La elevada prevalencia y el aumento de necesidades de atención dental por el crecimiento natural de la población, aunado a la falta de recursos para satisfacerlas llevó a nuestro país a introducir la fluoración de la sal de mesa como medida de salud pública para la prevención de la caries dental. La fluoración de la sal de mesa en México se reglamentó en 1988 (NOM-OF 8,1988), y en octubre de 1991 se estableció un programa a nivel nacional. Esta medida aunque ha probado su eficacia en otros países con un bajo costo y amplia cobertura, no ha podido hasta ahora ser monitoreada en México.

A partir de 2005 la Norma Oficial Mexicana NOM-040-SSA1-1993. Bienes y Servicios. Sal yodada y sal yodada fluorurada. Especificaciones sanitarias.; indica que no deberá consumirse sal de mesa yodatada fluorurada en las entidades federativas donde el agua de consumo humano contenga una concentración natural de flúor igual o mayor a 0.7ppm.

En algunas comunidades de países desarrollados donde existen concentraciones óptimas de fluoruro en el agua recientemente se ha señalado la presencia de fluorosis dental que se atribuye a los productos dentales utilizados (enjuagues, dentífricos, tabletas, gotas, geles, etc) así como los “fluoruros ocultos”. Estos últimos referidos como aquellos fluoruros contenidos en productos tales como jugos, néctares, concentrados, cereales, yogurt, leche en polvo, leche y aguas embotelladas de los cuales se desconoce su concentración real. A las consecuencias del consumo de fluoruros ocultos se le ha denominado “*efecto halo*”. El efecto halo se ha considerado como posible factor en el desarrollo de la fluorosis dental, en áreas donde no se puede explicar su presencia en base a una ingesta total calculada de fluoruro.

3.1.6. MÉTODOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE FLÚOR.

En la bibliografía se describen numerosos métodos para la determinación de fluoruro en muestras de agua y alimentos. Actualmente los de mayor aplicación son el método colorimétrico, la potenciometría directa con electrodo selectivo de fluoruro y la cromatografía iónica acoplada a conductimetría. No obstante, también se han utilizado en menor medida técnicas como la espectrometría de absorción molecular (Takatsu y col., 1984), espectrometría de emisión con

plasma acoplado inductivamente (Montes Bayón y col., 1999), espectrofotometría UV-vis (Bratovčić y col., 2009), así como electroforesis capilar y cromatografía de gases ambas acopladas a conductimetría (Louis y col., 1996; Kaniansky y col., 1999).

- Método colorimétrico (AOAC, 1995.), que consiste en la reacción de flúor presente en la muestra, previamente acidificada, con nitrato de torio, para formar un complejo que se colorea con el indicador rojo de alizarina; luego, la determinación se realiza por comparación del color obtenido en la muestra frente a un estándar de flúor de concentración conocida. Esta técnica cuantitativa requiere que la cantidad adicionada de nitrato de torio sea exactamente la misma tanto en la muestra como en el estándar y que la comparación del color se realice en el punto final de la reacción. Cuando se aplica este método en alimentos, éstos deben ser llevados previamente a cenizas con alguna sal fundente, tratadas con ácido perclórico y luego destiladas. La reacción que se lleva a cabo es la siguiente:

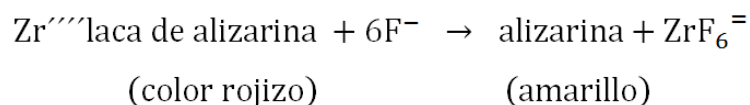


Figura 6. Reacción que se lleva a cabo en el método colorimétrico del SPADNS.

La concentración de fluoruros en la muestra se cuantifica mediante la reacción que se lleva a cabo entre estos y los iones circonio del reactivo colorido de SPADNS (ácido circonilo), disociando una porción de éste en un anión complejo incoloro (ZrF_6^{-}). La decoloración producida por los iones flúor, es proporcional a la concentración de estos y adecuada para mediciones fotométricas.

- Método por cromatografía líquida iónica acoplada a conductimetría.

La cromatografía iónica, acoplada en la mayoría de los casos a un detector de conductividad, permite la detección simultánea de iones inorgánicos (fluoruro, cloruro, bromuro, nitrato, sulfato, fosfato, etc) y desde su introducción en 1975 es una metodología frecuentemente utilizada para la cuantificación de fluoruro. En las columnas cromatográficas utilizadas en los inicios de esta metodología, la escasa interacción del

fluoruro con la fase estacionaria hacía que este elemento eluyese muy cercano al frente de elución, con frecuentes solapamientos con los compuestos orgánicos no retenidos. La mejora de las columnas de intercambio aniónico (velocidad, capacidad y compatibilidad de disolventes) ha resuelto este problema y ha ampliado el campo de aplicación de esta metodología (López-Ruiz, 2000).

Su aplicación al análisis de fluoruro en muestras de aguas es muy frecuente y existen varios métodos oficiales basados en la cromatografía iónica (Jackson y col., 2001). Su uso en el análisis de alimentos es menor. Tal y como recoge el trabajo de revisión de Buldini y col. (1997), los alimentos analizados incluyen muestras líquidas (café, té, zumos, leche) y en menor medida productos sólidos (frutas, carne, aceite, harina). Con posterioridad al trabajo de Buldini y col. (1997), la cromatografía iónica ha sido aplicada al análisis de fluoruro en algas (Gómez-Ordoñez y col., 2010) y setas (Isildak, 2009). La cromatografía iónica con detector de conductividad permite límites de cuantificación para el fluoruro en torno a 0.01 mg/L (Gómez-Ordoñez y col., 2010) similares a los descritos para la potenciometría con ion selectivo de fluoruro, si bien el rango de linealidad es menor al situarse la concentración más elevada en torno a 2 mg/L (Gómez- Ordoñez y col., 2010; Yiping y Caiyun, 2010). Recientemente, Isildak (2009) ha utilizado un detector potenciométrico acoplado a la cromatografía iónica consiguiendo para el fluoruro un rango de linealidad similar al del ion selectivo de fluoruro.

➤ Método por potenciometría directa con electrodo selectivo de fluoruro.

Actualmente la potenciometría con electrodo selectivo es una de las técnicas más utilizadas para la cuantificación de fluoruro en todo tipo de muestras. Requiere instrumentación de bajo coste y su aplicación es sencilla, lo que unido a su especificidad y adecuadas características analíticas hacen que sea la metodología de elección para muchos laboratorios. El método por potenciometría directa con electrodo selectivo de fluoruro, se basa en la medida del potencial de una solución que contiene iones fluoruro, cuando se sumerge dentro de ella un electrodo específico para fluoruro y uno de referencia, creándose una corriente eléctrica entre la muestra y la solución interna del electrodo de ión selectivo, cuyo potencial será la medida de la concentración de fluoruro.

Los métodos permitidos para la cuantificación de fluoruro en México son el método potenciométrico con electrodo ión selectivo (**MPEIS**) y el **colorimétrico SPADNS** (SECOFI 2001, SSA 2000, SSA 2002). El método potenciométrico es adecuado para concentraciones de fluoruro desde 0.1 a 1000 mg/L; es necesario adicionar una solución amortiguadora de alta fuerza iónica (TISAB por sus siglas en inglés) para el control del pH, el ajuste de la fuerza iónica total y mantener libre al ión fluoruro en la solución (Standard Methods, 1998).

3.2. SENSORES QUÍMICOS.

En general un sensor es un dispositivo que recibe y responde a una señal o estímulo. Un sensor electroquímico es un dispositivo químico que responde a cambios específicos en el potencial o en la corriente eléctrica como consecuencia de la presencia de una especie química que interactúa con él. Cuando el elemento sensor está constituido por un elemento químico inorgánico u orgánico se tiene un sensor químico. El elemento químico sensor se selecciona de tal manera que interactúa con la especie a analizar (analito) **de manera muy exclusiva o selectiva**. En la literatura química se conoce a estos sensores químicos por sus siglas en inglés: **ISE**, *Ion Selective Electrodes* (Pungor, 1998).

Cuando se utiliza la potenciometría como método de medida, los sensores electroquímicos forman parte de un sistema que corresponde a la celda electroquímica, como la que se muestra en la Figura 7.

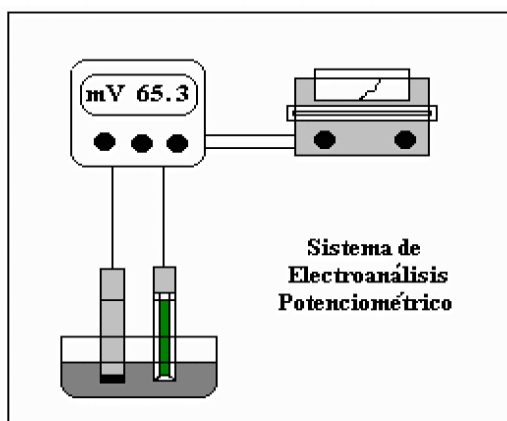


Figura 7. Celda electroquímica.

La **Potenciometría** es una técnica analítica electroquímica que permite extraer información cuantitativa sobre la composición de una disolución basándose en el establecimiento de una diferencia de potencial entre un electrodo indicador y uno de referencia; es decir, mide bajo condición de corriente cero, la diferencia de potencial entre dos electrodos, el indicador o de trabajo y el de referencia, de forma que no se perturba la muestra (Barquero, 2001).

La potenciometría presenta una serie de ventajas respecto a otras técnicas analíticas como son la simplicidad del dispositivo, la selectividad, la sensibilidad, la elevada velocidad de respuesta y que, generalmente, requiere de una química relativamente simple (Barquero, 2001).

El potencial medido se relaciona con las actividades de los analitos mediante la ecuación de Nernst cuyos valores numéricos representan una significativa información que permite interpretar el desarrollo de la reacción (Lorenzo, 1996; Hauptmann, 1991):

$$E = E^{\circ} + \left(\frac{RT}{nF}\right) \ln a_{\text{oxd}}/a_{\text{red}} \quad (1)$$

Donde E° es constante para una reacción dada y corresponde al potencial estándar del sistema, n es el número de electrones implicados en la reacción electroquímica, R la constante de los gases ideales ($8.314 \text{ JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$), T la temperatura absoluta en grados Kelvin, F la constante de Faraday (96487 Cmol^{-1}), y a_{oxd} y a_{red} son las actividades de las especies que toman parte en la reacción química.

3.3. ELECTRODOS SELECTIVOS A IONES (ISEs).

El constante desarrollo de la investigación científica impone nuevos requerimientos a los sistemas instrumentales de análisis químico, esto hace que en la actualidad se necesiten métodos de análisis con mayor sensibilidad, mejor exactitud, mejor reproducibilidad, mejor fiabilidad, mayor velocidad, menor manipulación de muestras, automatización y menor costo por análisis.

En los últimos veinte años se han publicado miles de trabajos sobre los ISEs (Buhlmann-Pretsch-Bakker, 1998). Este espectacular desarrollo se ha debido a necesidades medioambientales, tecnológicas y económicas.

3.3.1. HISTORIA DE LOS ELECTRODOS SELECTIVOS A IONES (ISEs).

La base de la potenciometría fue establecida por Nernst, en 1888, cuando describió el origen del potencial de electrodo entre un metal y una solución que contenía iones de ese metal, y el potencial redox entre un metal inerte y una solución que contenía un sistema redox (Loeb-Nernst, 1888).

A principios del siglo XX, la necesidad de cuantificar el grado de acidez era grande, lo que hizo que hubiera numerosos trabajos de investigación en este tema. El primer sensor potenciométrico usado para medir la acidez de una solución acuosa fue el electrodo de hidrógeno, propuesto por Nernst en 1897 (Nernst-Ber, 1897) que debido a su complejidad, no tenía aplicación práctica. En 1906 Cremer (Cremer, 1906) desarrolló el electrodo de vidrio para medidas de acidez, el cual fue posteriormente perfeccionado por Haber y Klemensiewicz.

Sin embargo, había dos problemas a resolver en la medida de acidez: definir las unidades y mejorar la instrumentación para conseguir una lectura más reproducible. Curiosamente el perfeccionamiento tecnológico del electrodo de vidrio se originó en la comunidad académica, mientras que los fundamentos teóricos, sobre las unidades de medida de acidez, surgió de la industria. Sørensen, trabajando para la empresa Carlsberg, fue quién propuso la escala de pH, debido a la necesidad de definir la influencia de la acidez sobre una serie de reacciones enzimáticas (Ruzicka, 1997). Casi al mismo tiempo, las empresas Beckman y Radiometer comercializaron el primer medidor de pH en 1935 (Beckman, 1987; Radiometer Annual Report, Copenhagen: 1994/1995), probablemente inspiradas en el trabajo pionero de Elder y Wright (Elder, 1928) sobre medidas de pH con electrodos de vidrio y potenciómetro de tubo de vacío¹. Así la cooperación entre industria y academia contribuyó al desarrollo de la potenciometría, volviéndola una técnica consagrada y enfocada en la medida de pH.

A pesar de que la potenciometría surgió a finales del siglo XIX, la era de oro de los ISEs comenzó a partir de 1957, con los trabajos teóricos de Eisenman y Nikolski (Eisenman, 1957). La

primera gran revolución en la fabricación de los ISEs puede ser atribuida a Ross (Ross, 1967), quién en 1966, propuso un nuevo concepto de electrodo selectivo a calcio basado en una membrana líquida. Posteriormente junto con Frant (Frant, 1966) desarrolló el electrodo de fluoruro a base de cristal de LaF_3 . Simultáneamente Stefanec y Simon (Stefanac, 1967) descubrieron la posibilidad de utilizar polipéptidos como materiales electroactivos, denominados cargadores neutros. Este trabajo culminó con la utilización de la valinomicina para la fabricación de ISEs selectivos a potasio, los cuales presentaban una impresionante selectividad respecto a este ión, frente a los otros iones de metales alcalinos o amonio. La segunda revolución ocurrió en 1970, cuando Moody y colaboradores usaron por primera vez, electrodos de membrana líquida a base del polímero PVC (cloruro de polivinilo) (Moody, 1970). La introducción del PVC en la membrana simplificó la fabricación de los ISEs. El desarrollo de los ISEs enzimáticos causó la tercera gran revolución en este campo (Clark, 1962), permitiendo que los sensores potenciométricos pudieran ser utilizados para medir sustancias biológicas no iónicas; a estos dispositivos se les llama *biosensores*; los cuales se basan en la inmovilización de un material biológicamente activo, en general enzimas, sobre la superficie de un transductor, en este caso un ISE que responde a la especie formada en la reacción enzimática. Finalmente, se puede considerar que la última revolución de los ISE's ocurrió con el desarrollo del transistor de efecto de campo sensible a iones (ISFET) (Bergveld, 1970). La importancia de los ISFETs puede ser atribuida a su capacidad de miniaturización y la posibilidad de utilizar procesos microelectrónicos en su fabricación. Esto permitiría la producción en masa de estos sensores, los cuales podrían ser empleados en la monitorización de especies de interés in vivo (Janata, 1994).

Una cronología del desarrollo de los electrodos selectivos a iones se muestra en la figura 8.

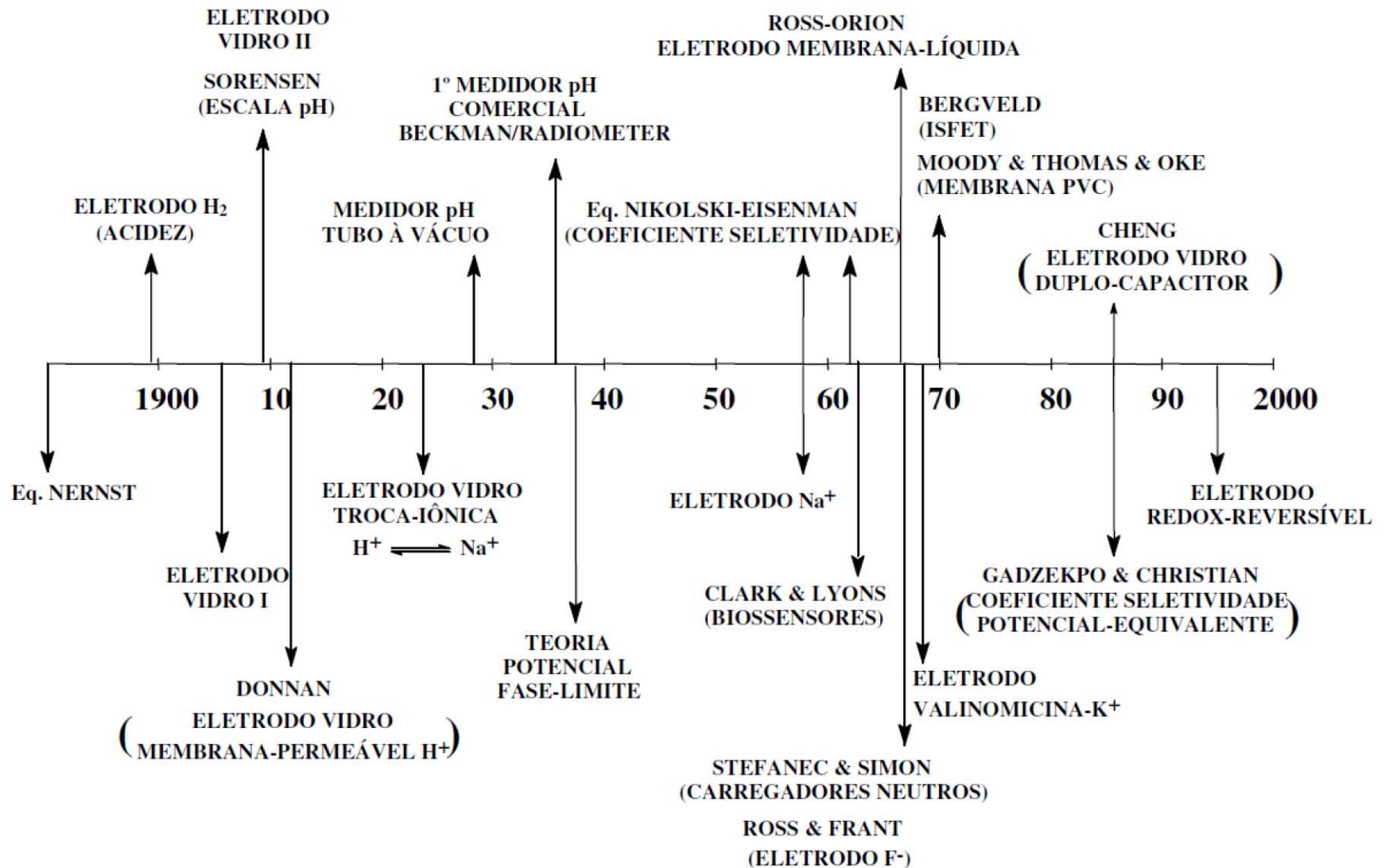


Figura. 8 Cronología del desarrollo de electrodos selectivos a iones.

3.3.2. CLASIFICACIÓN DE LOS ISE's (Pungor, 1970; Cheng, 1989).

Los electrodos selectivos a iones se clasifican de acuerdo al material con el que se construye la membrana pueden clasificar en 4 categorías: sensor de estado sólido, sensor de estado líquido, sensor de estado gaseoso y vidrio. Además pueden ser electrodos de media celda y/o electrodos combinados. A continuación se describen los diferentes tipos:

▣ Membranas de vidrio para H^+ y ciertos cationes monovalentes.

Pertenecen a los electrodos de vidrio que están en la categoría de sitio fijo de los electrodos de membrana de intercambio iónico. Esto quiere decir que los sitios activos en la superficie o en la capa hidratada del vidrio, no están libres para desplazarse durante el tiempo en que se realiza la medición. El potencial del electrodo resulta de una combinación de factores de intercambio catiónico y movilidad catiónica que conducen a una acumulación de carga en la interfase vidrio-disolución. La relación de selectividad observada de estos electrodos es el producto de la constante de equilibrio de intercambio iónico entre los sitios y la disolución, y la relación de movilidad de los iones que se intercambia en la capa hidratada del vidrio. Por lo tanto, las propiedades de selectividad de un electrodo determinado pueden optimizarse ajustando estos parámetros mediante la alteración de la composición del vidrio.

Existen tres subtipos de electrodos de vidrio con sus órdenes de selectividad respectivos hacia los iones, se resumen a continuación:

- *Tipo pH:* $H^+ \gg \gg Na^+ > K^+, Rb^+, Cs^+, \dots \gg Ca^{2+}$
- *Tipo sensible a cationes:* $H^+ > K^+ > Na^+ > NH_4^+, Li^+, \dots \gg Ca^{2+}$
- *Tipo sensible a sodio:* $Ag^+ > H^+ > Na^+ \gg K^+, Li^+, \dots \gg Ca^{2+}$

Como regla general, la selectividad catiónica (sobre el ión hidrógeno) se logra adicionando elementos que tienen números de coordinación más elevados que sus grados de oxidación. Los vidrios que contienen menos de 1% de Al_2O_3 (óxido de aluminio), permiten obtener electrodos con buena respuesta al pH y poca respuesta a iones metálicos. Por lo general, los vidrios con una composición de aproximadamente 27% Na_2O (óxido de sodio), 5% Al_2O_3 , 68% SiO_2 (dióxido de silicio) muestran una respuesta a los cationes. Los vidrios con una composición de 11% Na_2O , 18% Al_2O_3 , 71% SiO_2 son altamente selectivos al sodio en relación con otros iones metálicos alcalinos.

En la Figura 9 se muestra el electrodo de vidrio y sus componentes.

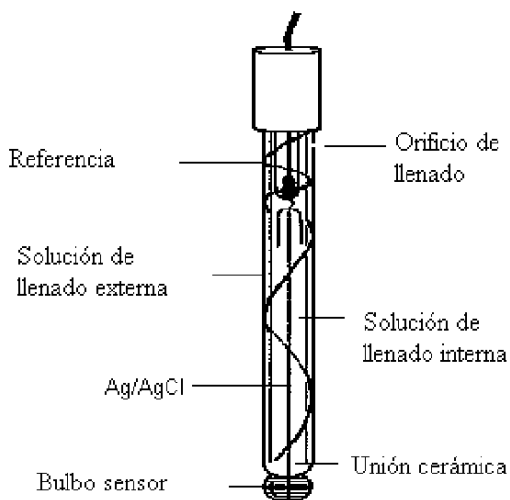


Figura 9. Componentes del electrodo ion selectivo de vidrio.

❑ Electrodo de estado sólido.

Los electrodos en estado sólido no vítreos sustituyen la membrana de vidrio por una membrana iónicamente conductora; debido a que utilizan sales inorgánicas insolubles en la membrana. El cuerpo del electrodo está compuesto por una formulación epóxida químicamente resistente. Unida al cuerpo del electrodo se encuentra la membrana sensora, que se compone de un material único, puro, no poroso, con superficie homogénea en forma de espejo de baja microporosidad, que mantiene en un mínimo la retención de la muestra. Ejemplo de este tipo de electrodos son el de flúor, cloro, bromo y yodo (Figura 10).

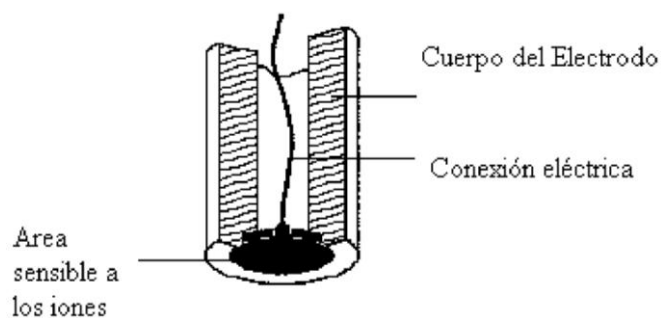


Figura 10. Electrodo ion selectivo en estado sólido.

Tabla 3. Propiedades de electrodos selectivos de iones de estado sólido.

Ion	Intervalo de concentración (M)	Material de la membrana	Intervalo de pH	Especies Interferentes
F^-	$10^{-6} - 1$	LaF_3	5 - 8	OH^- (0.1M)
Cl^-	$10^{-4} - 1$	AgCl	2 - 11	CN^- , S^{2-} , I^- , $S_2O_3^{2-}$, Br^-
Br^-	$10^{-5} - 1$	AgBr	2 - 12	CN^- , S^{2-} , I^-
I^-	$10^{-6} - 1$	AgI	3 - 12	S^{2-}
SCN^-	$10^{-5} - 1$	AgSCN	2 - 12	CN^- , S^{2-} , I^- , $S_2O_3^{2-}$, Br^-
CN^-	$10^{-6} - 10^{-2}$	AgI	11 - 13	S^{2-} , I^-
F^{2-}	$10^{-5} - 1$	Ag_2S	13 - 14	

❏ Electrodo con membrana polimérica.

La membrana polimérica de un electrodo consiste de varios materiales de intercambio iónico incorporados en una matriz inerte tal como PVC o silicón. La membrana separa la disolución interna de llenado y de referencia respecto de la disolución externa de la muestra. El potencial desarrollado en la superficie de la membrana se relaciona con la concentración de la especie de interés. Este tipo de electrodos se usa para medir calcio, potasio y nitrato (Figura 11).

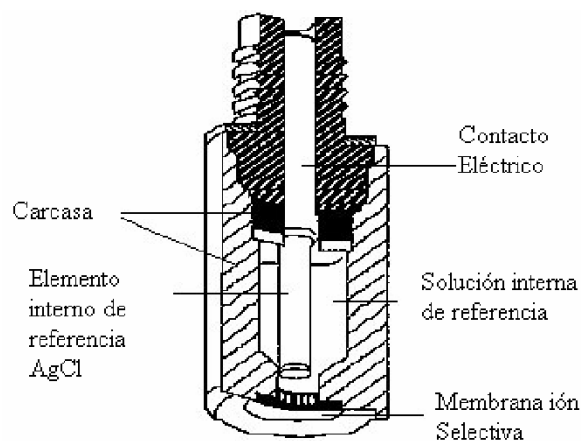


Figura 11. Electrodo con membrana de plástico.

Los electrodos selectivos de iones calcio usan una sal de calcio del ácido bis (2-etilhexil)-fosfórico. La disolución interna acuosa de llenado consiste en una concentración fija de iones calcio e iones cloruro. Para el electrodo de nitratos (o fluoroboratos), se usa un grupo con sitios de asociación de paredes de iones de níquel (II)-1,10-fenantrolina.

Tabla 4. Propiedades de electrodos selectivos de iones basados en un líquido.

Ion	Intervalo de concentración (M)	Material de la membrana	Disolvente del portador	Intervalo de pH	Especies Interferentes
Ca ²⁺	10 ⁻⁵ – 1	Didecilsulfato de calcio	Fosfonato de dioctifenilo	6 – 10	Zn ²⁺ , Pb ²⁺ , Fe ²⁺ , Cu ²⁺
K ⁺	10 ⁻⁶ – 1	Valinomicina	Sebacato de dioctilo	4 – 9	Rb ⁺ , Cs ⁺ , NH ₄ ⁺
NO ₃ ⁻	10 ⁻⁵ – 1	Nitrato de tridodecilhexadecilamonio	Octil – 2 – nitrofenil éter	3 – 8	ClO ₄ ⁻ , I ⁻ , ClO ₃ ⁻ , Br ⁻ , HS ⁻ , CN ⁻
ClO ₄ ⁻	10 ⁻⁵ – 1	Perclorato de hierro (III) tris (1,10 – fenantrolina) sustituida	<i>p</i> – Nitrocimeno	4 – 10	I ⁻ , NO ₃ ⁻ , Br ⁻
BF ₄ ⁻	10 ⁻⁵ – 1	Tetrafluoborato de Níquel (III) tris (1,10 – fenantrolina) sustituida	<i>p</i> – Nitrocimeno	2 – 12	NO ₃ ⁻

❑ Electrodos sensores de gases.

Este electrodo responde a gases disueltos en solución (Figura 12). El gas disuelto se difunde a través de la membrana en un pequeño volumen de buffer (específica para cada electrodo). La reacción del gas con el buffer causa un cambio de pH que es registrado por un electrodo interno de vidrio para pH. Debido a su construcción, este tipo de electrodos no requiere electrodo de referencia. El dióxido de carbono y el amonio se miden con este tipo de electrodos.

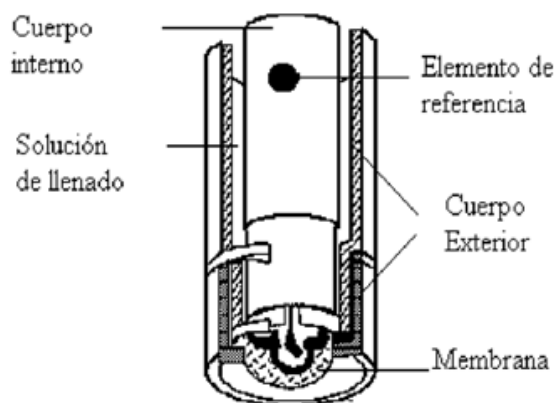


Figura 12. Electrodo con membrana de plástico.

3.3.3. PRINCIPIO DE MEDICIÓN.

Un electrodo de ion selectivo es un sensor que convierte la actividad de un ión específico disuelto en una solución, en un potencial eléctrico que puede ser medida por un voltímetro o pH-metro. Los electrodos de ion selectivo que producen una señal de voltaje como una respuesta a un ion disuelto en una solución. El potencial producido es dependiente de la concentración de las especies iónicas presentes en la solución. El sistema de medición potenciométrica está formado por un electrodo sensor y un electrodo de referencia. El electrodo sensor está hecho de un material que proporciona la selectividad de un ión determinado. El voltaje producido es teóricamente dependiente del logaritmo de la actividad iónica, de acuerdo a la ecuación de Nernst. El voltaje medido puede ser expresado por la ecuación de Nerst de la siguiente manera:

$$E_{obs} = E^{\circ} \pm 2.303 \left(\frac{RT}{nF} \right) \log[A] \quad (2)$$

Donde: E_{obs} es el potencial observado (mV), E° es el potencial de referencia, R la constante de los gases ideales ($8.314 \text{ JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$); T la temperatura absoluta en grados Kelvin, F la constante de Faraday (96487 Cmol^{-1}); n es el número de electrones implicados en la reacción electroquímica y A es la actividad del ión específico.

Electrodo de referencia.

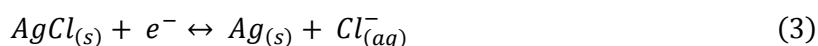
Dentro de un sistema de medida potenciométrico, el electrodo de referencia proporciona un potencial constante e independiente de la concentración de los analitos.

Uno de los electrodos de uso más común es el electrodo Ag/AgCl de doble unión, que consta de un cilindro que por su interior lleva un hilo de plata cubierto con una capa muy fina de

cloruro de plata e inmerso en una solución saturada de KCl. Por su extremo inferior está cerrado por un placa porosa que permite el contacto con la disolución electrolítica que se encuentra en el exterior tapón de dentro de otro tubo de mayor diámetro y que en su parte inferior hay un contacto anular que establece la unión eléctrica con la solución a analizar.

Este electrodo Ag/AgCl es, en esencia, un electrodo de ión selectivo que exhibe una fuerte sensibilidad a la concentración del ion cloruro (Harned, 1955).

La reacción electroquímica que tiene lugar en este electrodo es la siguiente:



El potencial de equilibrio (E) asociado con esta reacción está relacionado con las actividades de los reactivos y de los productos, como se expresa a continuación:

$$E = E^{\circ} - 2.303 \left(\frac{RT}{nF} \right) \ln a_{Cl^{-}} \quad (4)$$

Donde $a_{Cl^{-}}$ representa la actividad de cloruros libres y que se puede relacionar con la concentración (C) mediante el coeficiente de actividad (γ) de la forma siguiente:

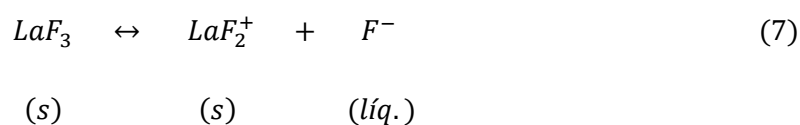
$$a = \gamma C \quad (5)$$

A concentraciones de iones cloruro muy bajas se asume un comportamiento ideal, donde $\gamma=1$ y por tanto la concentración es igual a la actividad. A partir de este punto, como se ha trabajado siempre con soluciones diluidas o en condiciones de fuerza iónica constante, se utilizarán exclusivamente concentraciones. Para una temperatura de 25°C, el factor del electrodo [$2.303 (RT/nF)$] se reduce al valor de 59.2mV/década (si E va expresado en mV) que, juntamente con el valor de n , en este caso 1, sería la pendiente nernstiana para este electrodo, quedando la ecuación anterior de la manera siguiente (Yao, 1999):

$$E = E^{\circ} - 54.16 \log[Cl^{-}] \quad (6)$$

3.3.4. ELECTRODO SELECTIVO A IONES FLUORURO (Harris, 1992).

Un *ISE* para el **ión fluoruro** está formado en su parte sensora por una membrana que consiste de un cristal de Fluoruro de Lantano (LaF_3) que se ha dopado con fluoruro de europio (EuF_2) para mejorar su conductividad al generar huecos en la red cristalina, por donde el F^- puede moverse debido a su pequeño tamaño y por consiguiente su gran movilidad iónica. Un ion de fluoruro adyacente a una vacante puede ocuparla por difusión, dejando atrás una nueva vacante. De esta manera los F^- difunden de un lado a otro (Ver figura 14.). La membrana se sella al final de un tubo plástico que contiene un electrodo de **referencia interno** y una solución de concentración constante de fluoruro (Ver figura 14.). La diferencia de potencial de este electrodo, refleja la distribución desigual del ión de interés a través del **límite** que representa la membrana. El mecanismo de desarrollo de un potencial sensible a fluoruro en una membrana de fluoruro de lantano es muy análogo al electrodo de pH. Es decir, la ionización crea una carga en la superficie de la membrana en las dos interfases, como se muestra mediante la siguiente ecuación:



La magnitud de la carga depende de la concentración de ión fluoruro en la disolución. El lado de la membrana que se encuentra a una concentración de iones fluoruros más baja se vuelve positivo respecto de la otra superficie.

El potencial de una celda que contiene un electrodo de fluoruros viene dado por la ecuación:

$$E = -59.16 \log a_{\text{F}^-} \quad (8)$$

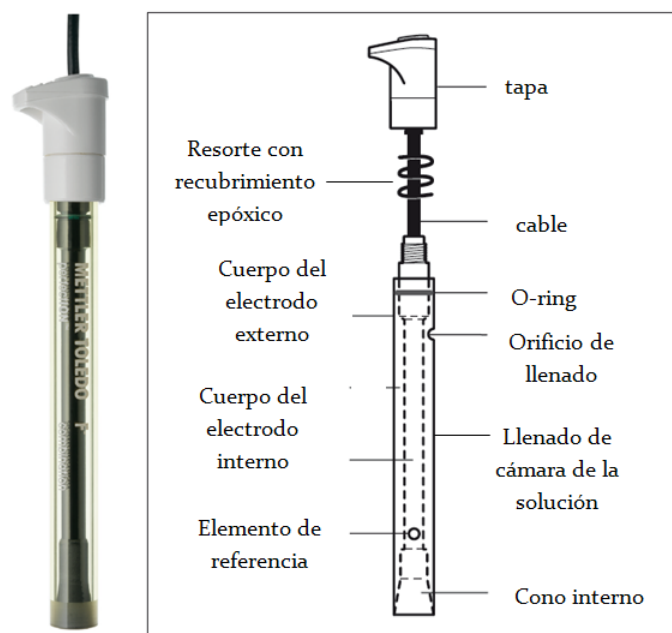


Figura 13. Partes del electrodo combinado de fluoruro.

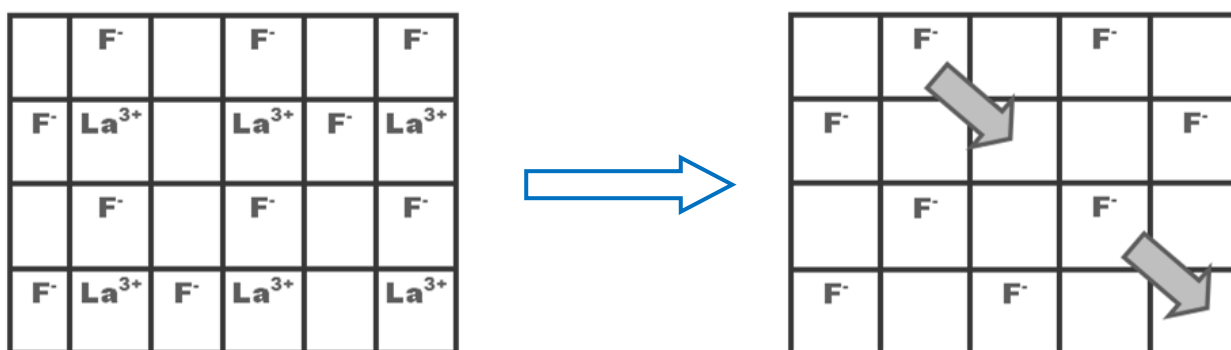


Figura 14. Mecanismo de conducción del ESI de fluoruros.

En cualquier muestra a analizar, el fluoruro debe estar en forma iónica, lo cual depende de la fuerza iónica y del pH del medio, así como de la presencia de sustancias que acomplejen el fluoruro. Por ello, es necesario adicionar a la muestra una disolución amortiguadora de la fuerza iónica total (TISAB siglas en inglés de “total ionic strength adjustment buffer”) que permite alcanzar un pH adecuado, ajustar la fuerza iónica total del medio y eliminar la interferencia del ion hidroxilo y de ciertos cationes (Martín Delgado y col., 1993). El TISAB amortigua el pH alrededor de 5, valor que permite que el fluoruro se encuentre mayoritariamente en forma iónica (ver figura 15). Contiene además sustancias que impiden la formación de complejos como el ácido ciclohexilamino-dinitrilotetraacético o el citrato, que liberan al fluoruro de su unión a

cationes como Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} y sobre todo Al^{3+} , los cuales actúan como interferentes. En la bibliografía se describe el empleo de distintos tipos de TISAB: TISAB-IV para muestras que contienen 100 mg/L de Fe y/o Al; TISAB-III y TISAB-II para muestras con <3 mg/L de Fe y/o Al; TISAB I para muestras con <0.1 mg/L de Fe y/o Al. La capacidad del TISAB para liberar el fluoruro depende de la composición de la muestra a analizar y debe ser optimizada para cada tipo de muestra. En general, para el análisis de alimentos se recomienda el uso de TISAB II o TISAB III.

Las condiciones experimentales necesarias para la determinación de fluoruro mediante un ISE en muestras de agua natural son:

- ❖ Rango útil de pH: 5 - 8 (Ver Figura 15).
- ❖ pH óptimo = 5.50 donde la relación molar de la especies F^-/HF tiene un valor de > 99%

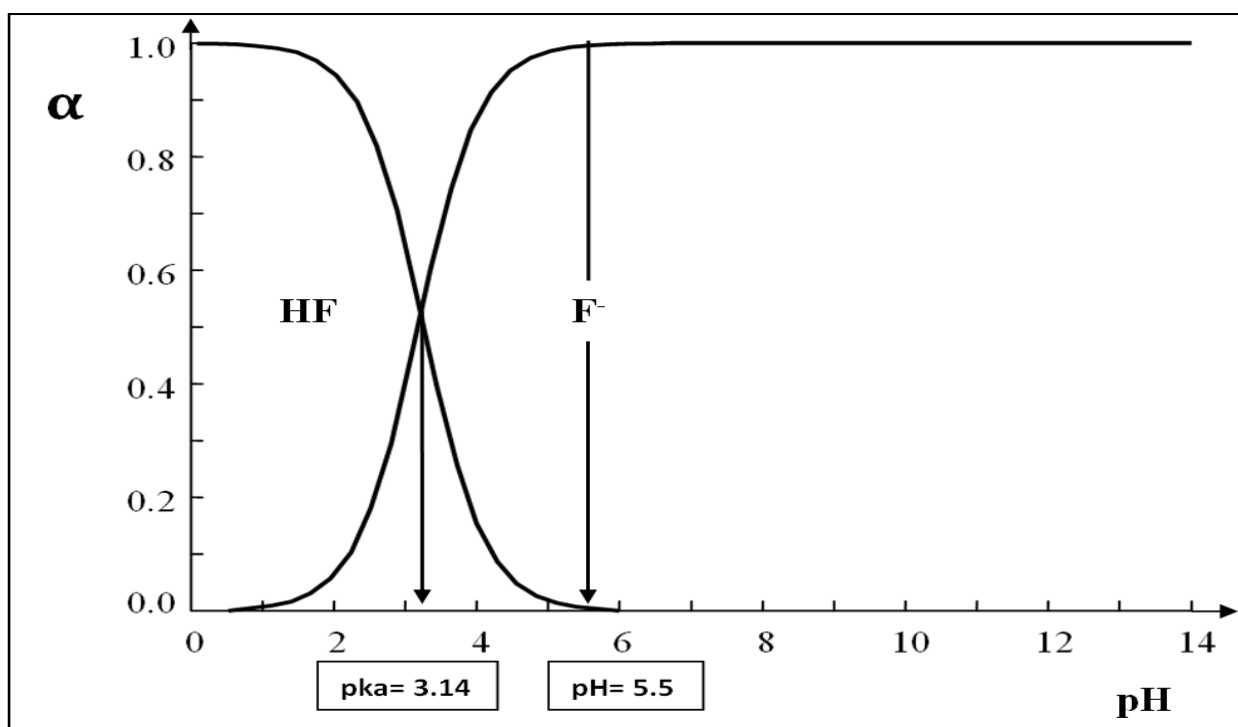


Figura 15. Diagrama de Distribución de Especies de fluoruro.

En pH ácido predomina la especie HF y no es reconocida por el ISE de fluoruro.

En pH alcalino predomina como especie el ión hidroxilo (OH^-).

- ❏ Las muestras de aguas naturales y potables pueden presentar cationes trivalentes Al (III) y Fe (III) que pueden formar complejos estables con el ión fluoruro. En consecuencia, se consideran interferentes en su determinación, ya que si no se eliminan de la muestra el ión fluoruro no se encontraría libre y no podría ser reconocido por el ISE.

Los electrodos comerciales de fluoruros son robustos, pueden utilizarse a temperaturas entre 0 y 80 °C, tienen una respuesta lineal desde 10^{-6} hasta 1 M y el único ión que interfiere directamente es el ión hidroxilo a pH mayores que 8. A pH menores que 5 interfieren los iones hidrógeno debido a la formación de fluoruro de hidrógeno no disociado frente a la cual el electrodo no responde.

3.3.5. VARIABLES A CONSIDERAR EN UNA MEDIDA CON ISE (CRISON, 2004).

Los electrodos selectivos a iones son muy sensibles y pueden verse afectados por algunos factores tales como la temperatura, interferencias, fuerza iónica, pH entre otras.

- **Temperatura:** Como es bien sabido variaciones en la temperatura alteran las mediciones en el potencial. Sin embargo el comportamiento de los electrodos selectivos con respecto a la temperatura no es muy conocido, por lo cual es importante que la temperatura se mantenga constante durante las mediciones, ya que no existen modelos matemáticos que compensen las variaciones de temperatura en las medidas con ISEs.
- **Interferencias:** Generalmente la sustancia problema reacciona con la interferencia mediante la formación de complejos, oxidación o reducción, lo cual genera la formación de una sustancia diferente, que incrementa o disminuye el resultado en la concentración del analito en cuestión. La mayoría de los cationes y aniones no interfieren con la respuesta del electrodo de fluoruros. El ión hidroxilo (OH^-) como ya se mencionó anteriormente es el único que interfiere directamente a pH mayores a 8.
- **Soluciones ISA:** Para que la actividad de un ión y su concentración se parezcan, se añade tanto a los patrones como a las muestras un ajustador de fuerza iónica (ISA), que es una solución de fuerza iónica elevada que no interfiere con la muestra y que iguala la fuerza iónica de soluciones patrón y muestras, ajusta el pH, elimina interferencias debidas a la

oxidación o reducción del electrodo o la reacción del ion libre que forma un complejo en la solución. Para cada electrodo selectivo se utiliza un ajustador de fuerza iónica específico.

- **pH de la muestra:** El pH de la muestra debe encontrarse en un determinado intervalo (5-8), en algunos casos por las interferencias que pueden causar los iones H^+ y OH^- y en otros debido a que las membranas del electrodo trabajan correctamente en una determinada zona de pH.
- **Escala de medida:** Es el rango de concentración del ión que se va a cuantificar, en el cual el electrodo es sensible a variaciones en la concentración del mismo. La respuesta que necesitamos del electrodo es una respuesta lineal, de forma que las cuantificaciones puedan llevarse a cabo mediante los fundamentos teóricos ya mencionados. Por lo que es importante que durante el desarrollo experimental se trabaje en la zona en que el electrodo ofrece una respuesta lineal. La figura 16 presenta una curva típica para un electrodo selectivo.

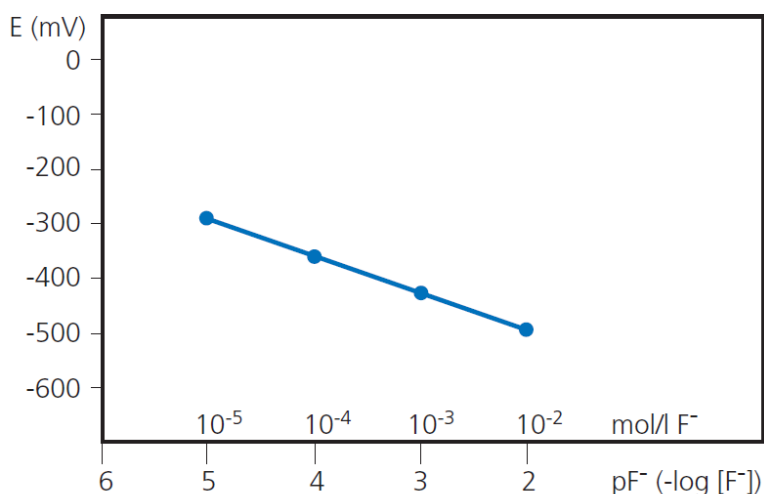


Figura 16. Curva típica de un electrodo selectivo.

- **Interferencias del electrodo:** Si en la muestra existen iones que afecten la respuesta del ESI, este responderá tanto a los iones de interés como a los interferentes. Por lo cual es necesario garantizar que no haya especies que puedan interferir con las lecturas del electrodo durante el análisis.

- **Interferencias en el método:** Durante la medición es indispensable que la especie que se vaya a medir se encuentre libre en la solución. Si no es así, es necesario tratar la muestra de modo que la especie se encuentre en su forma iónica.

3.3.6. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE ELECTRODOS ISE (CRISON, 2004).

- **Ventajas:**

- ❖ Determinan la concentración o actividad de los iones en soluciones acuosas.
- ❖ Relativamente baratos y fáciles de usar.
- ❖ Amplia gama de aplicaciones y rangos de concentración.
- ❖ Los electrodos de estado sólido o de gel rellenable son más robustos y duraderos, ideales para el campo o en laboratorios.
- ❖ No están sujetos a interferencias de color.
- ❖ Alcanzan niveles de exactitud y precisión de +/- 2 o 3% para algunos iones (con uso cuidadoso, calibración frecuente, y la consideración de las limitaciones).
- ❖ Las determinaciones mediante ISE son una de las pocas técnicas que pueden medir los iones positivos y negativos.
- ❖ Los ISE pueden ser utilizados en soluciones acuosas en un amplio rango de temperaturas.

- **Desventajas:**

- ❖ Cuando existen muchos interferentes no son del todo específicos.
- ❖ Sensibles a las interferencias (pueden reaccionar o ser atacados por otros iones presentes en las soluciones en cuestión).
- ❖ El rango es lineal en soluciones de baja concentración.
- ❖ Algunos electrodos ISE solamente son eficaces en un rango de pH estrecho.

3.4. VALIDACIÓN.

3.4.1. Definición, importancia y necesidad de validación.

3.4.1.1. Definición general e importancia del proceso de validación.

En química analítica es de gran importancia reportar resultados confiables, para lo cual es necesario establecer el proceso de validación para los métodos aplicados en el laboratorio. Dicho proceso de validación consiste en demostrar estadísticamente que el método es adecuado para un propósito determinado, esto es, que posee alto grado de confiabilidad, que puede ser aplicado a un amplio número de muestras y matrices y que es práctico con relación al costo y tiempo requerido en el análisis (Green, 1996).

La validación es el proceso establecido para la obtención de pruebas documentadas y demostrativas de que un método de análisis es lo suficientemente fiable y reproducible para producir el resultado previsto dentro de intervalos definidos (AEFI, 2001).

Existen varias formas de llevar a cabo una validación, de acuerdo a sus objetivos y alcances, los cuales dependen del analista, del laboratorio y del uso que se haga del método; además el analista debe conocer los resultados esperados y definir el nivel de confianza. El laboratorio que desarrolla o aplica el método es el responsable del proceso de validación.

La validación de un método, generalmente, está íntimamente relacionada con el *desarrollo del método*. En efecto, a menudo es difícil saber de forma exacta cuándo termina el desarrollo del método y cuando comienza la validación (EURACHEM, 1998).

En la figura 17 se esquematiza el ciclo de una validación, en teoría éste se repite indefinidamente debido a los continuos avances instrumentales y/o al desarrollo de nuevas técnicas.



Figura 17. Ciclo de Validación.

3.4.1.2. Necesidad de una validación (EURACHEM, 1998).

El análisis se considera hoy en día un proceso mediante el cual obtenemos información. Se realizan millones de análisis cada día en el mundo en los ámbitos más variados: análisis de productos manufacturados, medioambientales, clínicos, forenses, químicos y físicos,... En todos ellos se requiere una confianza en los resultados obtenidos. La validación de las metodologías analíticas, junto con otras actividades englobadas en la gran área del aseguramiento de la calidad, otorgando la confianza necesaria a la vez que confieren un grado elevado de comparabilidad entre los resultados de los análisis químicos.

Si las medidas que se realizan son el ámbito del análisis de magnitudes físicas, la calibración de aparatos e instrumentos adquiere un papel determinante, desde la vertiente económica, los costes asociados al proceso analítico suelen ser elevados y surgen costes adicionales ligados a las decisiones que se toman sobre la base de los resultados obtenidos. No nos podemos permitir el lujo, por ejemplo que nos devuelvan un lote de producto expedido en función de unos resultados analíticos que erróneamente expresaban conformidad a la normativa vigente. Una correcta validación del método debería haber detectado la presencia de error en los resultados emitidos.

3.4.1.3. Cuándo realizar una validación.

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

El proceso de validación debe realizarse cuando:

- Se desarrolla un nuevo método para una aplicación específica (primera validación).
- Se establece un método usado en otro laboratorio o con diferentes analistas.
- Cambio o actualización de equipos de análisis.
- Obsolescencia y correspondiente actualización del método.
- Se renueva el principio activo o se realizan correcciones al procedimiento debido a condiciones de logística o de diseño.
- Cuando el control de calidad indica que el método establecido reporta valores que varían con el tiempo.
- Cuando existen alteraciones de fondo en la matriz de análisis.
- Se desea demostrar la equivalencia de dos métodos, comparación entre un método alternativo y uno normalizado.

Estos factores no son excluyentes y por lo tanto pueden efectuarse varios a la vez. Se recomienda, entonces, cuando sea necesaria una *re-validación*, realizar la mayor cantidad de cambios previstos a futuro, y de esta forma no será necesario ejecutar validaciones de manera seguida; es decir, si por algún motivo se realiza una corrección en el procedimiento y es necesaria la validación, se debe realizar una búsqueda bibliográfica de la técnicas actuales para el método en cuestión y evaluar si en ese momento existen mejores técnicas para dicho análisis y si es apropiada su aplicación.

El proceso de validación está limitado por el alcance que se requiere, es importante definir bien los objetivos iniciales y el alcance que tendrá para de esta forma optimizar los ensayos. Es de anotar, que en una *re-validación* no es necesario realizar todo el proceso de validación, en ocasiones solo es necesario realizar el correspondiente análisis de robustez y precisión.

3.4.2. CLASIFICACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS (AOAC INTERNATIONAL, 2006).

3.4.2.1. Según la normalización y estado de desarrollo del método.

➤ **Métodos estándar o normalizados.**

Los métodos estándar son aquellos publicados por organizaciones internacionales, regionales o nacionales; por organizaciones técnicas respetables; referencias legales; métodos publicados por la FDA (Food and Drug Administration), y que se ejecutan tal como se describen en la norma.

Estos métodos incluyen aquellos publicados por:

- United States Pharmacopeia (USP)
- National Formulary (NF)
- Homeopathic Pharmacopeia of the United States
- Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists (AOAC)
- American Public Health Association (APHA)
- Pesticide Analytical Manual (PAM)
- Food Additives Analytical Manual
- Food Chemicals Codex
- FDA Bacteriological Analytical Manual (BAM)
- FDA Macroanalytical Procedures Manual (MPM)
- ORA Laboratory Information Bulletins (LIBs)

Se prefiere usar los métodos estándar, sin embargo es necesaria la verificación de la capacidad analítica dentro de los laboratorios en los cuales es usado. Un método estándar puede estar complementado con detalles adicionales sobre como los laboratorios deben proceder para asegurar una aplicación consistente.

Aquellos métodos especificados por fabricantes de equipos de análisis también son considerados como métodos estándar, por ejemplo los suministrados por HACH en el Handbook de análisis de agua por métodos espectrofotométricos (HACH, 2002).

➤ ***Métodos desarrollados por el laboratorio.***

En ocasiones cada laboratorio elabora sus propios métodos, esto puede deberse a que el análisis es muy específico y se evalúa, por ejemplo, cierta matriz especial que solo interesa al laboratorio; o que debido a restricciones de tipo comercial no se puede disponer de métodos análogos usados en otras empresas o compañías. El laboratorio, por consiguiente, debe evaluar la capacidad de los analistas, equipos y otros recursos relacionados con el método en cuestión. Los métodos deben estar debidamente validados, documentados y autorizados para su uso.

Para la evaluación de la capacidad del método se sugiere realizar comparaciones con otros métodos normalizados, preferiblemente que usen otro principio activo. En lo posible se debe usar materiales de referencia, estándares o muestras fortificadas.

➤ ***Métodos no normalizados.***

Los métodos no normalizados son aquellos que no han sido publicados por fuentes autorizadas y/o validadas. Es muy probable que los métodos sin normalización no dispongan de datos de validación o estudios colaborativos fiables o suficientes, por esto se recomienda realizar una validación cuanto sea posible. Si el método sufre cambios se requerirá una re-validación del método.

3.4.2.2. Según categoría de método (Castro, 2008)

Los métodos también pueden clasificarse según el ámbito en el cual es usado, estos pueden agruparse en tres categorías generales:

- Categoría I: para la cuantificación de materia prima o principio activo en producto terminado.
- Categoría II: para determinar impurezas en materia prima o compuestos de degradación en producto terminado; o para análisis de residuos en material biológico o alimentos.
- Categoría III: para determinar las características de funcionamiento como disolución o liberación de droga en el organismo.

3.4.3. PARÁMETROS DE DESEMPEÑO.

Entre los parámetros generalmente empleados en la validación de un método analítico se consideran:

- Linealidad
- Límite de detección
- Límite de cuantificación
- Exactitud
- Precisión
- Sensibilidad
- Robustez

3.4.3.1. Linealidad.

La linealidad de un método analítico es su capacidad para obtener resultados de prueba que sean proporcionales ya sea directamente, o por medio de una transformación matemática bien definida, a la concentración de analito en muestras en un intervalo dado (USP 31, 2008).

Existe la linealidad del sistema y la linealidad del método, en ambas se debe probar que la variable dependiente es directamente proporcional a la variable independiente, por lo cual se hace una regresión lineal, en el caso de linealidad del sistema la variable dependiente es la respuesta o señal y la variable independiente es la concentración del analito.

3.4.3.2. Límite de Detección (LD).

El concepto de límite de detección ha sido y sigue siendo uno de los más conflictivos en el área de la Química Analítica. Las múltiples definiciones propuestas a lo largo de los años, así como la diversidad de metodologías para su cálculo han provocado sin duda esta situación. Recientemente, organizaciones internacionales, como la ISO o la IUPAC, han tratado de consensuar sus definiciones y dar una serie de guías para la estimación de este parámetro de calidad tan importante en análisis químico.

En una definición más reciente, la ISO (ISO, 1997) introduce el término general “*concentración neta mínima detectable*” (equivalente al límite de detección), como la concentración (o cantidad) neta verdadera de analito en el material sujeto a análisis que

conducirá, con una probabilidad $(1-\beta)$, a la conclusión de que la concentración (o cantidad) de analito en el material analizado es mayor que la de un blanco. La IUPAC (IUPAC, 1995), en un documento preliminar, proporcionaba una definición similar y adoptaba el término “*valor (verdadero) mínimo detectable*”, como equivalente al límite de detección.

3.4.3.3. Límite de Cuantificación (LC).

“La menor cantidad de analito en una muestra que puede determinarse con precisión y exactitud aceptables bajo las condiciones del experimento establecidas” (USP 31, 2008).

3.4.3.4. Exactitud.

Según la ICH la exactitud de un procedimiento analítico expresa el acercamiento entre el valor admitido como valor verdadero o como una referencia aceptada y el valor encontrado (ICH, 2005).

3.4.3.5. Precisión.

La precisión de un procedimiento analítico expresa el nivel de concordancia o grado de dispersión entre una serie de mediciones obtenidas de múltiples muestras homogéneas bajo condiciones prescritas (Chung, 2004). Se evalúa mediante análisis de réplicas, análisis repetidos de un estándar estable o análisis de adiciones conocidas sobre las muestras.

La precisión indica la variabilidad de un método de ensayo y expresa en que rango es aceptable la variación de una misma muestra a condiciones reales, dato que posteriormente es usado como condición de criterio para la aceptación o rechazo de análisis.

En la precisión pueden considerarse tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad (Castro, 2008). En la figura 18 podemos observar de manera más clara la organización jerárquica de estos niveles.

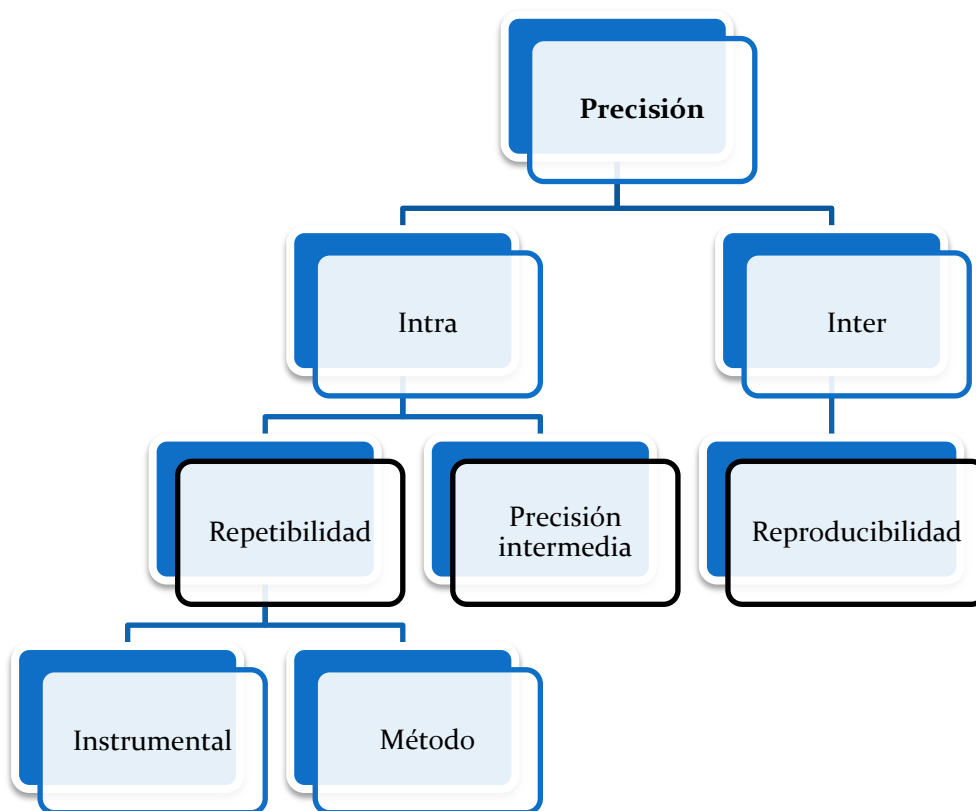


Figura 18. Jerarquía de los niveles de precisión

La precisión de un método analítico por lo general se expresa como la varianza, desviación estándar o coeficiente de variación de una serie de mediciones.

Repetibilidad: expresa el nivel de concordancia de los datos bajo las mismas condiciones de operación en un intervalo corto de tiempo. La repetibilidad también se conoce como precisión intra-ensayo.

Precisión intermedia: expresa la variación dentro de un mismo laboratorio: a diferentes días de análisis, distintos analistas, distintos equipos, etc.

Reproducibilidad: indica la precisión entre laboratorios, usualmente se lleva a cabo con ayuda de estudios colaborativos o interlaboratorios.

La precisión y exactitud a menudo son conceptos que pueden confundirse, para una mejor apreciación de lo que significa cada una podemos analizar la figura 19:

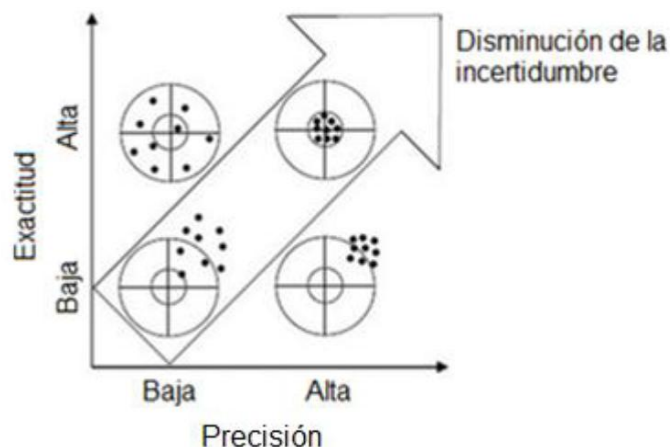


Figura 19. Diferencia entre exactitud y precisión.

3.4.3.6. Sensibilidad.

La sensibilidad de un método o un instrumento, mide su capacidad de discriminar entre pequeñas diferencias en la concentración del analito. Está delimitada por dos factores: la pendiente de la curva de calibración y la reproducibilidad o precisión del sistema de medida (FISCHBACH, 2001).

La definición cuantitativa más sencilla de sensibilidad es la aceptada por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), la llamada sensibilidad de calibración, que se define como la pendiente de la curva de calibración a la concentración de interés.

La mayoría de las curvas de calibración que se usan en química analítica son lineales.

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

3.4.3.7. Robustez

La AOAC International define la robustez como la habilidad de un procedimiento analítico para tolerar pequeñas variaciones de las condiciones del procedimiento, especialmente en variables como: volumen, temperatura, concentración, pH, tiempo de extracción y configuración del instrumento analítico (AOAC International, 2006).

4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.

4.1 MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS.

➤ MATERIALES

- ❖ Vasos de precipitados de vidrio. Marca Pyrex (50, 250 mL).
- ❖ Vasos de precipitados de plástico (25 mL).
- ❖ Matraces aforados. Marca Pyrex (25, 50, 100, mL).
- ❖ Micropipeta. Marca Finnippiette (0.5-10 μ L,)
- ❖ Micropipeta. Marca Finnippiette (100-1000 μ L,)
- ❖ Micropipeta. Marca Thermo Scientific (0.5-5 mL).
- ❖ Pipetas volumétricas. Marca Pyrex(10, 15, 20 mL)
- ❖ Puntas para micropipeta.
- ❖ Espátula metálica mediana.
- ❖ Pizeta (500 mL).
- ❖ Barras magnéticas de 7 mm.
- ❖ Celda termostatada de 25 ml de capacidad.
- ❖ Termómetro. Marca Brannan (-20-110°C)
- ❖ Mangueras de plástico.
- ❖ Envases de plástico (100 mL).
- ❖ Parafilm.

➤ EQUIPOS

- ❖ Electrodo Combinado selectivo a iones fluoruro Mettler Toledo modelo *DC219-F*.
- ❖ Potenciómetro Mettler Toledo modelo *SevenMulti S47-dual pH/conductividad*.
- ❖ Agitador magnético IKA modelo *LAB DISC S1*.
- ❖ Soporte para electrodos Mettler Toledo modelo *SevenMulti*.
- ❖ Baño Recirculador con calentamiento y enfriamiento modelo *FC 6*. Marca Polyscience.
- ❖ Desionizador modelo *Purelab Classic*. Marca ELGA.

➤ **REACTIVOS.**

- ❖ Estándar de referencia certificado *Fluoride Ion Selective Electrode Standard* de 1000 mg/L de $F^- \pm 0.5 \%$, lote No. ISEF513A1 Preparado con KF y H₂O (500 mL). Marca Mettler Toledo.
- ❖ Solución de llenado del electrodo combinado, *Ion Electrolyte A*, lote No.QU1 (60 mL). Marca Mettler Toledo.
- ❖ Solución amortiguadora de alta fuerza iónica (TISAB II con CDTA), lote No.940909 (3.79 L). Marca ION PLUS.
- ❖ Agua desionizada 18.2 MΩ•cm
- ❖ Ácido Clorhídrico R.A. (HCl), Ensayo: 36.5% Marca Química Meyer.
- ❖ Cloruro de Potasio R.A. (KCl), Ensayo: 99.2%; Marca J.T Baker.
- ❖ Muestras comerciales de enjuagues bucales:
 - Listerine Total Care. Cont. Neto 500 mL. Lot. 2022LZ. McNEIL-PPC.
 - Listerine Whitening Cont. Neto 473 mL. Lot. 2392LZ. McNEIL-PPC.
 - Colgate Plax Fresh Mint. Cont. Neto 250 mL. Lot. 2015H22. Colgate-Palmolive.
 - Colgate Plax Complete Care 10 en 1. Cont. Neto 500 mL. Lot. 2015H13. Colgate-Palmolive.
 - Colgate Plax Whitening. Cont. Neto 500 mL. Lot. 2015H19. Colgate-Palmolive.
 - Colgate Plax Kids Cont. Neto 250 mL. Lot. 2016H04. Colgate-Palmolive
 - Oral-B Complete Hierbabuena. Cont. Neto 250 mL. Lot. 2003852511. Laboratorios Rety de Colombia S.A.
 - Oral-B Complete Menta Refrescante. Cont. Neto 250 mL. Lot. 2089852511. Laboratorios Rety de Colombia S.A.
 - Oral-B Prosalud. Cont. Neto 250 mL. Lot. 22785395UB. P&G Manufacturing Company.
 - Astringosol ICE. Cont. Neto 300 mL. Lot. 681313. Glaxosmithkline México S.A de C.V.
 - Astringosol Advance. Cont. Neto 300 mL. Lot. 701310. Glaxosmithkline México S.A de C.V.
 - Dental Max Cont. Neto 350 mL. Lot. J1304256. Tropicosméticos S.A de C.V.

**Nota: Todos los enjuagues mencionados anteriormente contienen flúor y están envasados en plástico PET y PETE (Polietileno tereftalato) típico de envases de alimentos y bebidas.*

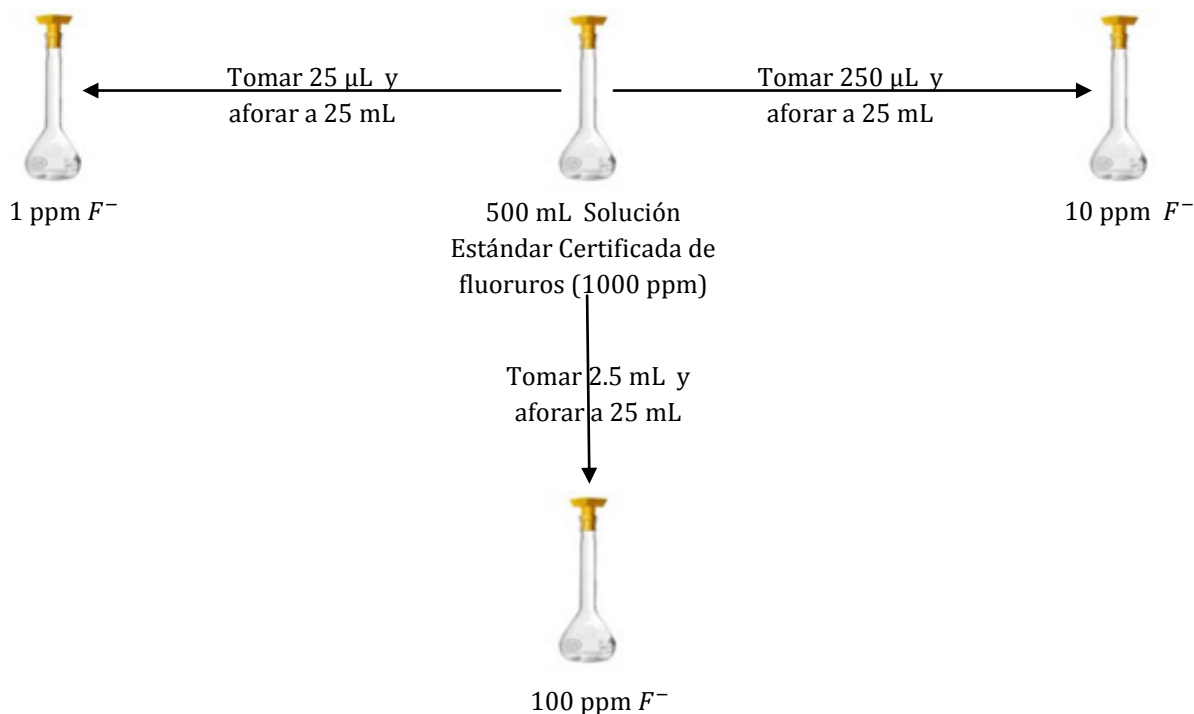
4.2 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.

4.2.1 CALIBRACIÓN Y VERIFICACIÓN DE LA OPERACIÓN DEL ISE DE FLUORUROS.

En este procedimiento se mide la pendiente del electrodo. La pendiente se define como el cambio en milivoltios observados con el cambio en la concentración. El valor de la pendiente es el mejor medio para comprobar el funcionamiento de un electrodo (Perfection Guidebook, 2011).

Preparación de soluciones.

1. A partir de la solución estándar de referencia certificada de fluoruros de 1000 mg/L se prepararon las siguientes soluciones.



- Una vez preparadas las soluciones fueron vertidas en envases de plástico; debido a que el fluoruro corroe el vidrio; éstas a su vez fueron almacenadas a una temperatura de 4°C lo que permite que sean estables por un período de 3 semanas (Guevara, Ortiz, 2009).



Figura 20. Soluciones almacenadas en envases de plástico.

- Se tomaron 5 mL de cada solución incluyendo el estándar; y se vertieron en vasos de plástico con capacidad de 25 mL; fue necesario adicionar una solución amortiguadora de alta fuerza iónica (TISAB por sus siglas en inglés) para el control del pH, el ajuste de la fuerza iónica total y mantener libre al ión fluoruro en la solución (Standard Methods 1998). A cada una de las soluciones se les agregó 5 mL de TISAB II (La micropipeta utilizada para la medición de volúmenes siempre fue misma). Las mediciones se realizaron por triplicado.

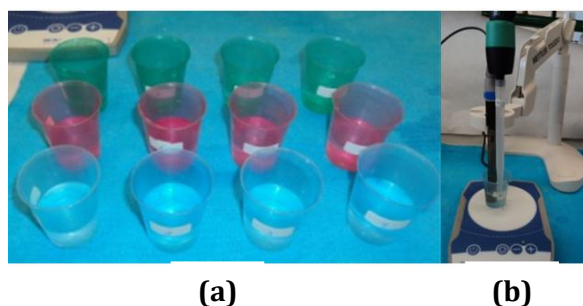


Figura 21. (a) Soluciones preparadas por triplicado; (b) Forma en la cual a cada solución se le agregaron 5 mL de TISAB II.

- Se procedió a medir las soluciones comenzando con la de menor concentración; todas las soluciones fueron medidas a temperatura ambiente y agitación constante.

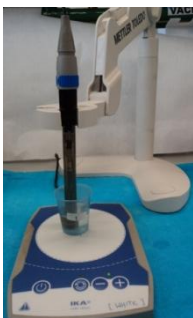


Figura 22. Forma en la que se midió cada una de las soluciones.

5. Se registraron las lecturas en donde se estabilizaba el electrodo (mV). Se retiraba el electrodo de la solución, se enjuagaba con agua desionizada y se secaba con papel sin tocar la membrana del electrodo con los dedos. (Este paso se llevó a cabo durante toda la medición de los sistemas y metodología de cada parámetro evaluado).
6. Los resultados de E(mV) fueron graficados en Excel, para determinar la pendiente la cual se debe encontrar entre -54 y -60 mV a una temperatura entre 20-25°C de acuerdo al manual del electrodo.

***Nota:** Antes de llevar a cabo la calibración del electrodo de fluoruros; el electrodo se dejó humectando durante una semana en una solución de Cloruro de potasio (KCl) 3M con fluoruro. **La concentración de la solución de fluoruro almacenada debe estar cerca de por lo menos el estándar de calibración concentrada de fluoruro;** esto debido a que el electrodo estaba guardado en seco. La calibración del electrodo debe realizarse diario antes de cada medición.



Figura 23. Humectación del electrodo, antes de su calibración.

4.2.2. VALIDACIÓN DEL MÉTODO.

Linealidad del sistema del ISE de fluoruros.

Preparación de soluciones y determinación de la respuesta analítica.

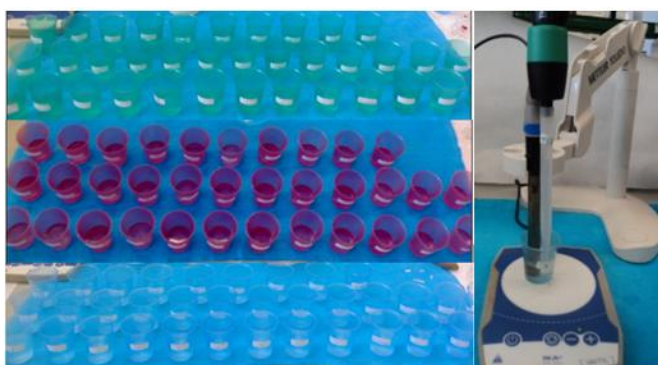
1. A partir de la solución estándar certificada de fluoruros de 1000 mg/L se prepararon 34 soluciones:

Sistema	Concentración a preparar (ppm)
1	0.000001
2	0.000005
3	0.00001
4	0.00005
5	0.0001
6	0.0005
7	0.001
8	0.005
9	0.01
10	0.02
11	0.05
12	0.1
13	0.5
14	1
15	5
16	10
17	40
18	100
19	130
20	160
21	180
22	200
23	250
24	280
25	320
26	360
27	400
28	450
29	510
30	570
31	640
32	710
33	800
34	900

***Nota:** La solución estándar certificada de fluoruros de 1000ppm cuenta como el sistema 35.

***En todas las mediciones se utilizaron siempre las mismas pipetas volumétricas y micropipetas.**

- De cada solución se tomaron 5 mL de solución para verter en vasos de plástico con capacidad de 25 mL. Se preparó por triplicado cada sistema. A cada sistema se le agregaron 5 mL del buffer TISAB II.



(a)

(b)

Figura 24. (a) Soluciones preparadas por triplicado; **(b)** Forma en la cual a cada una de las soluciones se les agregó 5mL de TISAB II.

- Una vez calibrado el electrodo con soluciones estándar de 1, 10, 100 y 1000 ppm; se realizaron las mediciones correspondientes a cada sistema; realizando las anotaciones correspondientes con respecto a los datos de calibración del electrodo.
- Al comenzar la medición de cada sistema, ésta se realizó del sistema más diluido al más concentrado, es decir; se comenzó a medir del sistema 1 al sistema 35 en orden ascendente. Se comenzó la agitación, y se sumergió el electrodo. Se procuró que la agitación se realizará constante y adecuadamente.
- Se registraron las lecturas medidas en mV.
- Con ayuda de Excel todas las lecturas fueron graficadas ($E(\text{mV})$ vs $\log [F^-]$) para determinar el intervalo de respuesta lineal para Linealidad del sistema; estos datos ya

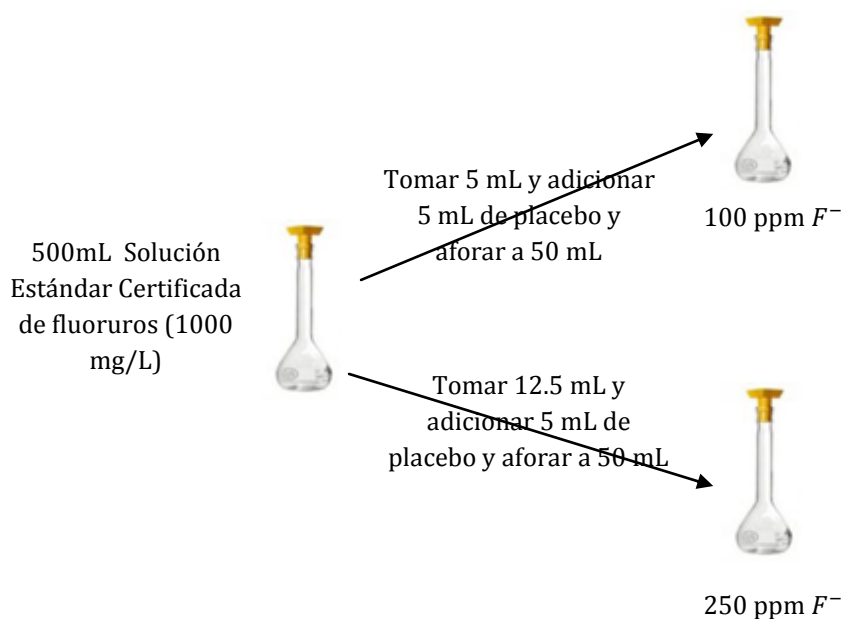
tratados fueron ingresados al programa *STATGRAPHICS Centurion XVI* los cuales sirvieron para un segundo tratamiento y así poder determinar finalmente la Linealidad del Sistema.

Exactitud del Método.

Preparación de soluciones y determinación de la respuesta analítica.

Para la evaluación de este parámetro se realizaron mediciones de 2 diferentes concentraciones de soluciones estándar dentro del intervalo lineal, por el mismo analista. Se calculó el porcentaje de recuperación, intervalo de confianza (*IC*) y coeficiente de variación (*CV*)

1. A partir de la solución estándar certificada de fluoruros de 1000 mg/L se prepararon 2 soluciones de la siguiente manera:



***Nota:** Como placebo se utilizó un enjuague bucal sin fluoruro, de la marca *Listerine Freshmint Cont. Net. 250 mL. Lot. 0102LZ.*

2. De cada solución se tomaron 5 mL para verter en vasos de plástico con capacidad de 25 mL. Se preparó por sextuplicado cada sistema. A cada sistema se le agregaron 5mL del

buffer TISAB II (La pipeta volumétrica a utilizar para la medición de volúmenes siempre fue la misma).



Figura 25. Dos niveles de concentración preparados por sextuplicado.

3. Se comenzó la agitación, y se sumergió el electrodo. Se procuró que la agitación se realizará constante y adecuadamente.
4. Se registraron las lecturas en mV.
5. Todas las lecturas se capturaron en Excel para determinar el porcentaje de recuperación, intervalo de confianza (IC) y coeficiente de variación (CV)

Linealidad del Método, Límite de Detección (LD) y Límite de Cuantificación (LC) del ISE de fluoruros.

Preparación de soluciones y determinación de la respuesta analítica.

Para la evaluación de estos parámetros se realizaron mediciones de 10 diferentes concentraciones de soluciones estándar dentro del intervalo lineal, determinado en la linealidad del sistema, como se conocen los componentes de los enjuagues bucales, fue posible utilizar un placebo analítico, en este caso un enjuague bucal sin fluoruro. Las mediciones fueron realizadas bajo las mismas condiciones y por un solo analista. Se debe reportar la relación cantidad adicionada vs cantidad recuperada, calcular el valor de la pendiente (b_1), ordenada al origen (b_0), coeficiente de determinación (r^2), intervalo de confianza para la pendiente ($IC(\beta_1)$), intervalo de confianza para la ordenada al origen ($IC(\beta_0)$), coeficiente de variación de regresión ($CV_{y/x}$), porcentaje de recobro del placebo adicionado, promedio aritmético (\bar{y}), desviación estándar (s), coeficiente de variación (CV) y el intervalo de confianza para la media poblacional ($IC(\mu)$) del porcentaje de recobro. Para los parámetros de LD y LC se debe reportar el coeficiente de determinación (r^2) y el intervalo de confianza (IC).

1. A partir de la solución estándar certificada de fluoruros de 1000 mg/L se prepararon 10 soluciones dentro del intervalo lineal de trabajo, antes de aforar, a cada solución se le agregaron 5 mL de placebo:

Sistema	Concentración a preparar (ppm)
1	1
2	2.5
3	5
4	10
5	25
6	50
7	100
8	250
9	500
10	1000

**Nota:* Como placebo se utilizó un enjuague bucal sin fluoruro, de la marca Listerine Freshmint Cont. Net. 250 mL. Lot. 0102LZ.

2. De cada solución se tomaron 5 mL de solución para verter en vasos de plástico con capacidad de 25 mL. Se preparó por triplicado cada sistema. A cada sistema se le agregaron 5 mL del buffer TISAB II.
3. Una vez calibrado el electrodo con soluciones estándar de 1, 10, 100 y 1000 ppm; se realizaron las mediciones correspondientes a cada sistema; realizando las anotaciones correspondientes con respecto a los datos de calibración del electrodo.
4. Al comenzar la medición de cada sistema, ésta se realizó del sistema más diluido al más concentrado, es decir; se comenzó a medir del sistema 1 al sistema 10 en orden ascendente, procurando que la agitación fuera la adecuada y constante en todas las mediciones.
5. Se registraron las lecturas medidas en mV.
6. Estos datos fueron ingresados al programa *STATGRAPHICS Centurion XVI* los cuales ayudaron a determinar finalmente la Linealidad del Método, LD y LC.

Precisión (Precisión intermedia, Repetibilidad y Reproducibilidad) del ISE de fluoruros.

Preparación de soluciones y determinación de la respuesta analítica.

Para la evaluación de este parámetro se realizaron mediciones de 10 diferentes concentraciones dentro del intervalo lineal, cada una de las soluciones fue preparada y medida independientemente por tres diferentes analistas; en diferentes días, con los mismos materiales, reactivos, equipos y bajo las mismas condiciones experimentales.

1. A partir de la solución estándar certificada de F^- de 1000 mg/L se prepararon 10 soluciones de diferentes concentraciones, todas fueron aforadas a 25 mL con agua desionizada :

Sistema	Concentración a preparar (ppm)
1	1
2	2.5
3	5
4	10
5	25
6	50
7	100
8	250
9	500
10	1000

**Nota: La solución estándar certificada de fluoruros de 1000ppm cuenta como el sistema 10.*

2. De cada solución se tomaron 5mL para verter en vasos de 25 mL. Se preparó por triplicado cada sistema. A cada uno se le agregaron 5 mL del buffer TISAB II.
3. Se calibró el electrodo con soluciones estándar de 1, 10, 100 y 1000 ppm. Se realizaron las anotaciones correspondientes con respecto a los datos de calibración del electrodo. La medición de cada sistema, se realizó del sistema más diluido al más concentrado, es decir; se comenzó a medir del sistema 1 al sistema 10 en orden ascendente, procurando que la agitación se realizará constante y adecuadamente en cada medición.
4. Las lecturas fueron registradas en mV.

5. Todas las lecturas se graficaron en Excel para determinar la varianza, desviación estándar ($S_{y/x}$) y coeficiente de variación (CV) de las mediciones; para poder determinar la repetibilidad, reproducibilidad y precisión intermedia, se utilizó el programa estadístico *STATGRAPHICS Centurion XVI*.

Sensibilidad del ISE de fluoruros.

Preparación de soluciones y determinación de la respuesta analítica.

Para la evaluación de este parámetro se realizaron mediciones de 23 diferentes concentraciones dentro del intervalo lineal (1-1000 ppm) por un mismo analista; las soluciones y los datos utilizados en el parámetro de Linealidad del sistema, fueron los mismos para determinar el parámetro de Sensibilidad.

1. A partir de la solución estándar certificada de F^- de 1000 mg/L se prepararon 22 soluciones de la siguiente manera:

Sistema	Concentración a preparar (ppm)
1	1
2	5
3	10
4	40
5	100
6	130
7	160
8	180
9	200
10	250
11	280
12	320
13	360
14	400
15	450
16	510
17	570
18	640
19	710
20	800
21	900
22	1000

***Nota:** La solución estándar certificada de fluoruros de 1000ppm cuenta como el sistema 23.

2. De cada solución se tomaron 5 mL de solución para verter en vasos de 25 mL. Se preparó por triplicado cada sistema. A cada sistema se le agregaron 5 mL del buffer TISAB II.
3. Se comenzó la agitación, y se sumergió el electrodo. Se procuró que la agitación se realizara constante y adecuadamente en cada medición.
4. Se registraron las lecturas en mV.
5. Todas las lecturas se graficaron en Excel (E(mV) vs $\log [F^-]$) para calcular la pendiente de la recta. Se presenta la pendiente obtenida y se espera obtener una respuesta Nernstiana (pendiente ≈ 59.16 mV).

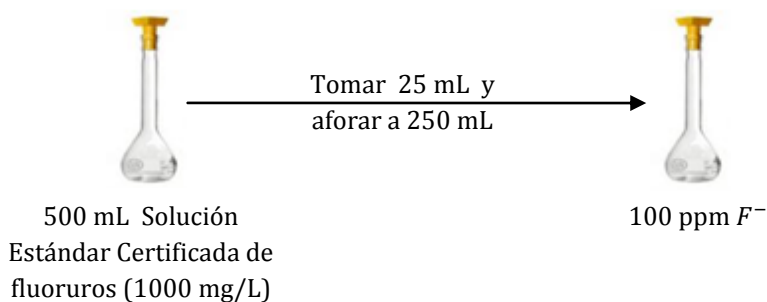
Robustez.

Preparación de soluciones y determinación de la respuesta analítica.

Para la evaluación de este parámetro se realizaron mediciones de 1 nivel de concentración (100ppm) la cual estuvo dentro del intervalo lineal, modificando los factores: temperatura y TISAB II.

1. A partir de la solución estándar certificada de F^- de 1000 mg/L se preparo la solución de la siguiente manera:

- Llevar la solución a un aforo de 50 mL con agua desionizada.



- Una vez preparada la solución fue vertida en un envase de plástico.

Tabla 5. Los factores a modificar fueron temperatura y TISAB II.

FACTORES A MODIFICAR	TEMPERATURA		
	Baja a 10°C	Normal a 25°C	Alta a 35°C
TISAB II	Presencia	Presencia	Presencia
	Ausencia	Ausencia	Ausencia

- De la solución se tomaron 5 mL para verter en vasos de plástico de 25 mL. Se preparó por cuadruplicado cada sistema. De acuerdo a la Tabla 5 la solución de 100 ppm fue medida a diferentes temperaturas, en presencia y ausencia de TISAB II.



Figura 26. Un nivel de concentración preparado por cuadruplicado.

- El vaso de plástico ya con la solución, tanto en presencia como en ausencia de TISAB II se introdujo en una celda termostata apropiada al tamaño del vaso, esta celda debe estar debidamente conectada a un baño recirculador con calentamiento y enfriamiento.
- El baño termostata se ajustó a una temperatura adecuada para mantener a cada uno de los sistemas a las diferentes temperaturas indicadas en la Tabla 5.

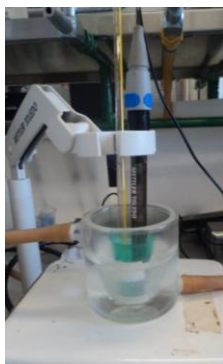


Figura 27. Medición de los sistemas con termómetro.

6. Se comenzó la agitación, y se sumergió el electrodo. Se procuró que la agitación se realizará constante y adecuadamente en cada medición.

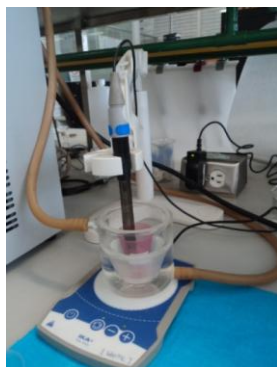


Figura 28. Forma como se llevó a cabo la medición de los sistemas.

7. Se registraron las lecturas en mV.
8. Todas las lecturas se graficaron en Excel para determinar la media aritmética de la condición normal de operación (\bar{y}_0) y de cada condición de operación diferente a la condición normal (\bar{y}); así como también la diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición respecto a la condición normal ($|d_i|$).

4.2.3. APLICACIÓN DEL MÉTODO VALIDADO (CURVA DE CALIBRACIÓN).

Preparación de soluciones, construcción de la curva de calibración (Linealidad del Método) y determinación de la respuesta analítica.

Para la aplicación del método se realizó una curva de calibración con 10 diferentes concentraciones dentro del intervalo lineal. Como se utilizó una curva de calibración, se tomo como base las soluciones de linealidad del método las cuales contienen un placebo analítico, que en este caso se utiliza para ver los efectos de matriz.

1. A partir de la solución estándar certificada de F^- de 1000 mg/L se prepararon 10 soluciones a las cuales se les agrego 5 mL del placebo a cada una antes de llevarlas al aforo.

Sistema	Concentración a preparar (ppm)
1	1
2	2.5
3	5
4	10
5	25
6	50
7	100
8	250
9	500
10	1000

**Nota:* Como placebo se utilizó un enjuague bucal sin fluoruro, de la marca Listerine Freshmint Cont. Net. 250 mL. Lot. 0102LZ. La solución estándar certificada de fluoruros de 1000ppm cuenta como el sistema 10.

2. De cada solución se tomaron 5 mL para verter en vasos de 25 mL. Se preparó por triplicado cada sistema. A cada sistema se le agregaron 5mL del buffer TISAB II.

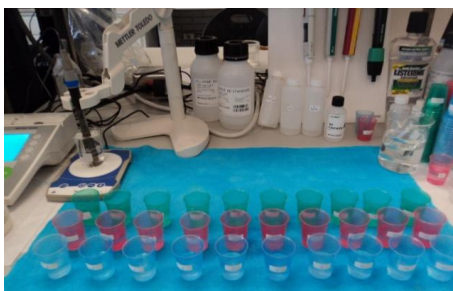


Figura 29. Sistemas preparados por triplicado.

3. Se comenzó la agitación, y se sumergió el electrodo. Se procuró que la agitación se realizará constante y adecuadamente en cada medición.



Figura 30. Forma como se midieron cada uno de los sistemas

4. Se registraron las lecturas en mV.
5. Todas las lecturas se graficaron en Excel ($E(\text{mV})$ vs $\log [F^-]$) para calcular los parámetros de respuesta lineal.

Antes de comenzar la medición de los enjuagues bucales, estos fueron clasificados en dos grupos; sin alcohol y con alcohol como se muestra a continuación:

Enjuagues bucales sin alcohol



Oral-B Complete Hierbabuena

País de procedencia: Colombia

Contenido de flúor: 0.05% (226ppm)

Ingredientes Activos: Fluoruro de sodio (NaF) y Cloruro de cetilpiridinio (CPC) 0.053%.

Precio: \$31.50



Oral-B Complete Menta

País de procedencia: Colombia

Contenido de flúor: 0.05% (226ppm)

Ingredientes Activos: Fluoruro de sodio (NaF) y Cloruro de cetilpiridinio (CPC) 0.053%.

Precio: \$34.00



Oral-B Prosalud

País de procedencia: U.S.A.

Contenido de flúor: 0.02% (95ppm)

Ingredientes Activos: Fluoruro de sodio (NaF) y Cloruro de cetilpiridinio (CPC) 0.07%.

Precio: \$49.00



Astringosol Advanced

País de procedencia: México

Contenido de flúor: 0.05% (225ppm)

Ingredientes Activos: Fluoruro de sodio (NaF), Cloruro de cetilpiridinio (CPC) 0.05% y Cloruro de Zinc (ZnCl) 0.10%.

Precio: \$30.50



Astringosol ICE

País de procedencia: México

Contenido de flúor: 0.05% (225ppm)

Ingredientes Activos: Fluoruro de sodio (NaF) y Cloruro de cetilpiridinio (CPC) 0.05%.

Precio: \$30.50



Colgate Plax Kids

País de procedencia: México

Contenido de flúor: 0.05% (225ppm)

Ingredientes Activos: Fluoruro de sodio (NaF).

Precio: \$38.50

Enjuagues bucales con alcohol



Listerine Advanced

País de procedencia: Colombia

Contenido de flúor: 0.022%
(100ppm)

Ingredientes Activos: Fluoruro de sodio (NaF).

Precio: \$65.00



Listerine Total Care

País de procedencia: E.U.A.

Contenido de flúor: 22.1mg
(100ppm)

Ingredientes Activos: Fluoruro de sodio (NaF).

Precio: \$70.00



Listerine Whitening

País de procedencia: E.U.A.

Contenido de flúor: 0.022%
(100ppm)

Ingredientes Activos: Fluoruro de sodio (NaF).

Precio: \$70.00



Colgate Plax Fresh Mint

País de procedencia: Brasil

Contenido de flúor: 0.05%
(225ppm)

Ingredientes Activos: Fluoruro de sodio (NaF) y Gantrez (0.20%).

Precio: \$34.40



Colgate Plax Complete Care 10 en 1

País de procedencia: Venezuela

Contenido de flúor: 0.05%
(225ppm)

Ingredientes Activos: Fluoruro de sodio (NaF) y Cloruro de cetilpiridinio (CPC) 0.05%.

Precio: \$60.00



Colgate Plax Whitening

País de procedencia: Brasil

Contenido de flúor: 0.05%
(225ppm)

Ingredientes Activos: Fluoruro de sodio (NaF).

Precio: \$62.50

Dental Max



País de procedencia: México

Contenido de flúor: 0.06%

(273ppm)

Ingredientes Activos: Fluoruro

de sodio (NaF).

Precio: \$14.90

Preparación de las muestras y determinación de la respuesta analítica.

1. Una vez clasificados los enjuagues bucales; de cada uno de ellos se tomaron 5mL y se vertieron en vasos de plástico de 25 mL. Se preparó por triplicado cada muestra.



Figura 31. Clasificación de los enjuagues bucales; del lado izquierdo se muestran los enjuagues con alcohol y del lado derecho se aprecian los enjuagues sin alcohol.

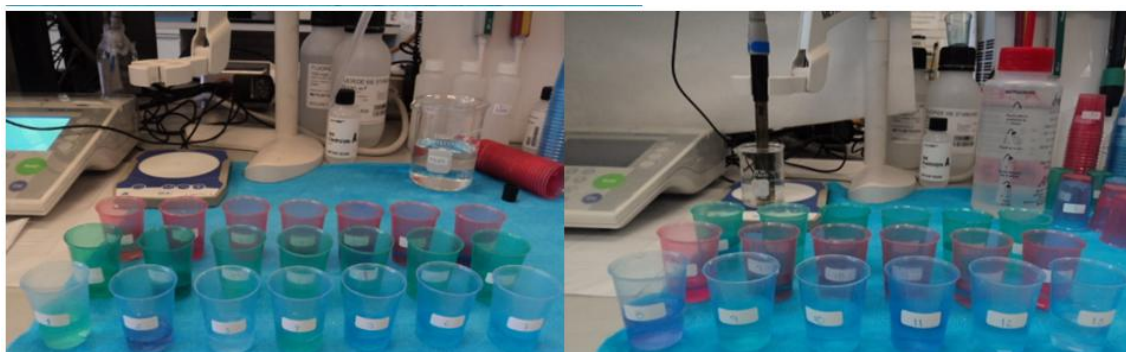


Figura 32. Muestras preparadas por triplicado y clasificadas. Los enjuagues bucales con alcohol fueron los primeros en medirse (izq.).

2. Se determinó el pH, mV y color antes de agregar TISAB II y comenzar la medición.



Figura 33. Colores observados de cada uno de los enjuagues bucales con alcohol (izq.) y sin alcohol (der.).

3. A cada sistema se le agregaron 5mL del buffer TISAB II. Se comenzó la agitación, y se sumergió el electrodo. Se procuró que la agitación se realizaría adecuadamente.

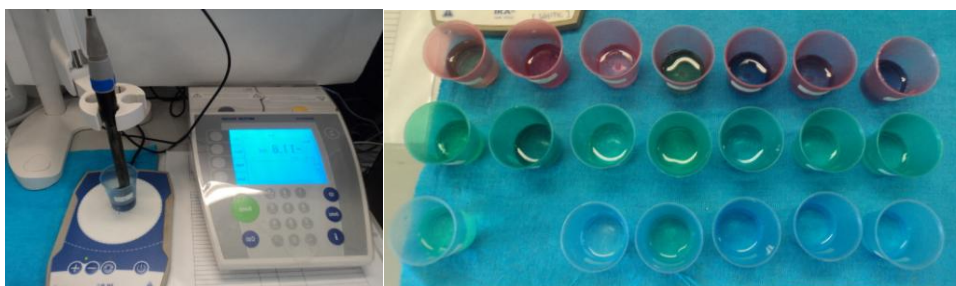


Figura 34. Medición de los enjuagues bucales con alcohol.

4. Se registraron las lecturas en donde se estabilizaba el electrodo pH y mV.
5. Todas las lecturas se graficaron en Excel (E (mV) vs $\log [F^-]$) para calcular la concentración de cada uno de los enjuagues bucales.

5. RESULTADOS Y ANÁLISIS EXPERIMENTALES.

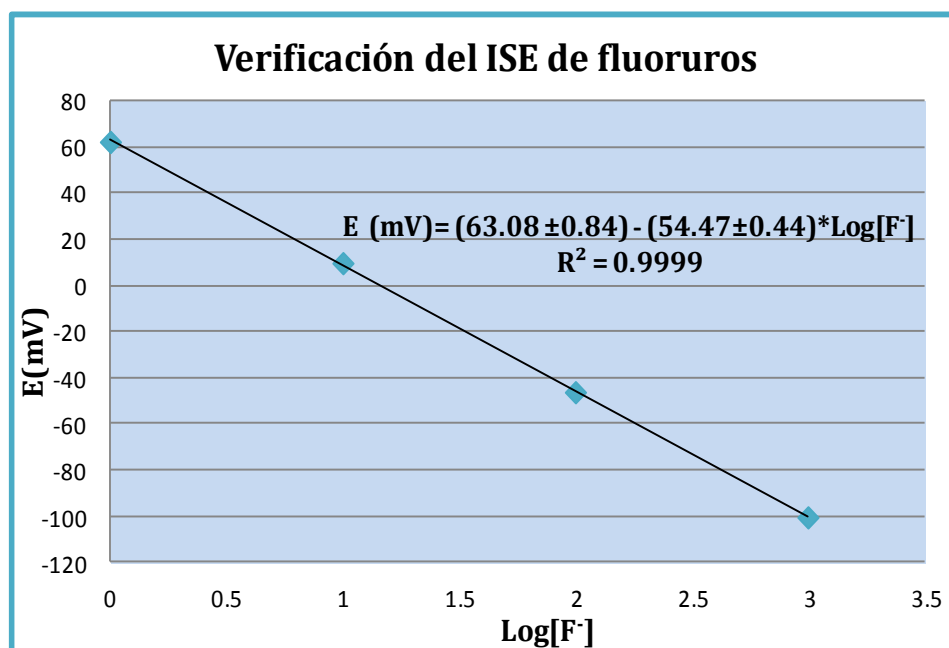
5.1 CALIBRACIÓN Y VERIFICACIÓN DE LA OPERACIÓN DEL ISE DE FLUORUROS.

Antes de realizar mediciones potenciométricas, fue necesario verificar que el ISE selectivo a iones fluoruro funcionara de manera adecuada. El funcionamiento correcto del electrodo se verificó mediante la determinación del valor de la pendiente de la curva de $E(\text{mV})$ vs $\text{Log}[F^-]$. En el caso del electrodo de fluoruro el valor de la pendiente obtenida debe estar entre 54 y 60 mV de acuerdo con el manual del electrodo.

En la Gráfica 1 se observa la curva de calibración del electrodo y su respectiva pendiente. La Tabla contiene los valores de concentración y diferencia de potencial representados en la gráfica 1. El valor de la pendiente obtenido en la verificación del electrodo se encuentra dentro del rango mencionado en el manual del electrodo. Se realizó un promedio de los valores de los potenciales debido a que el electrodo se calibraba de manera continua.

$[F^-]$ (ppm)	$\text{Log}[F^-]$	$E(\text{mV})$
1	0	62.4
10	1	9.8
100	2	-46.2
1000	3	-100.5

Tabla 6. Valores promedio de los potenciales en función de los logaritmos de las concentraciones de flúor.



Gráfica 1. Curva promedio de la verificación del electrodo.

5.2 VALIDACIÓN DEL MÉTODO.

Linealidad del Sistema.

Para la determinación de Linealidad del Sistema elaboró una curva de calibración por triplicado con un intervalo de concentraciones de 0.000001 – 1000 ppm, de acuerdo a este intervalo se puede observar el comportamiento del electrodo tanto a concentraciones muy bajas como a muy altas. En la **Tabla 7** se muestran dichos resultados.

En la **Gráfica 2** visualmente se puede percibir que existe una linealidad hasta valores cercanos al potencial de 60 mV lo que corresponde aproximadamente a 1 ppm; también se puede observar que a concentraciones menores a 1 ppm el electrodo no muestra una respuesta lineal; de acuerdo a las especificaciones indicadas por el proveedor este debería de haber sido de 0.02 ppm, lo que involucra un error de 0.98 ppm y este puede ser demostrado de acuerdo a los resultados obtenidos durante la validación del método.

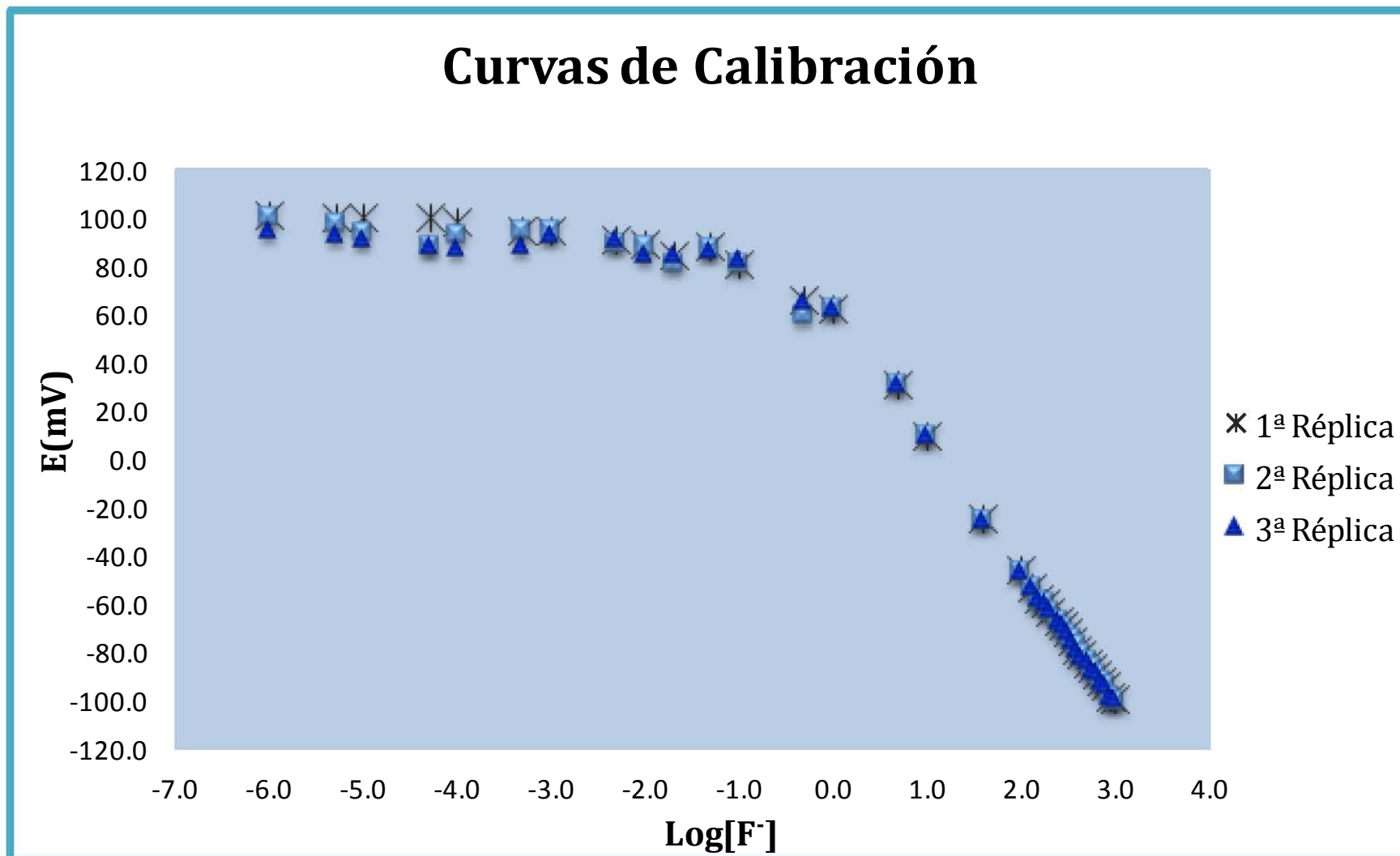
Con ayuda de Excel se logró determinar el intervalo lineal de trabajo en un rango de concentraciones de 1-1000 ppm; lo cual facilitó el tratamiento de datos, para poder determinar así la linealidad del sistema, en la **Tabla 8** se muestran los datos obtenidos con los que se determinó la linealidad del sistema, los cuales presentan mejor coeficiente de correlación ($R^2 > 0.99$); lo anterior facilitó el uso del programa STATGRAPHICS Centurion XVI, alimentando dicho programa con las tres réplicas de datos lineales mostrados en la **Tabla 8**, donde se observan los intervalos de respuesta lineales lo suficientemente amplios a partir de los sistemas 14 a 35 (1-1000ppm), el cual cubrió los valores esperados para enjuagues bucales y permitió su análisis.

La Linealidad del Sistema se resume en la **Tabla 8**, a estos datos se les realizó un análisis ANOVA en el modo de regresión lineal y el programa nos arroja la Linealidad del Sistema (ver **Gráfica 3**) los potenciales obtenidos con el electrodo presentan un alto coeficiente de determinación ($r^2=0.9994$) y un valor de pendiente de -55.0819 mV lo que indica que esta respuesta es muy cercana a una respuesta nernstiana (Evans, A, 1987 y *Pure & appl. Chem.* 1994) esperada para el ISE de fluoruros (en el anexo para Linealidad del Sistema se muestran las fórmulas utilizadas para la obtención de este parámetro, la tabla ANOVA y sus respectivos residuales). Por lo tanto este parámetro es aceptado de acuerdo a la Guía de Validación del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, A.C. con un intervalo de confianza de la pendiente $IC(\beta_1)$ al 97.5% de confianza:

$$IC(\beta_1) = -55.0819 \pm 0.4860 \text{ mV}$$

Tabla 7. Potenciales obtenidos por triplicado para cada sistema para determinar los parámetros de Linealidad, LD y LC.

Sistema	Concentración (ppm)	log[ppm]	1º Réplica	2º Réplica	3º Réplica
			E(mV)	E(mV)	E(mV)
1	0.000001	-6.000	101.5	100.3	94.6
2	0.000005	-5.301	100.3	97.9	92.8
3	0.00001	-5.000	100.6	94.4	90.8
4	0.00005	-4.301	100.3	88.2	88.1
5	0.0001	-4.000	98.7	93.1	87.6
6	0.0005	-3.301	94.8	94.8	88.6
7	0.001	-3.000	94.8	94.8	92.9
8	0.005	-2.301	90.8	89.4	90.9
9	0.01	-2.000	89.4	88.4	84.7
10	0.02	-1.699	84.7	81.3	84.9
11	0.05	-1.301	88.2	87.8	86.2
12	0.1	-1.000	81.3	81.2	83.0
13	0.5	-0.301	66.4	59.3	64.8
14	1	0.000	62.4	62.2	62.5
15	5	0.699	30.7	31.0	30.7
16	10	1.000	9.8	9.9	9.9
17	40	1.602	-24.9	-25.6	-25.6
18	100	2.000	-46.2	-46.8	-46.7
19	130	2.114	-53.3	-53.3	-53.9
20	160	2.204	-58.5	-59.0	-58.5
21	180	2.255	-60.1	-60.0	-60.0
22	200	2.301	-63.4	-63.4	-63.2
23	250	2.398	-67.1	-67.3	-67.2
24	280	2.447	-69.8	-69.9	-69.2
25	320	2.505	-72.2	-72.8	-72.2
26	360	2.556	-75.4	-75.3	-75.4
27	400	2.602	-79.8	-78.0	-79.4
28	450	2.653	-81.8	-81.0	-81.9
29	510	2.708	-84.9	-84.4	-84.1
30	570	2.756	-87.3	-87.0	-87.5
31	640	2.806	-89.6	-89.8	-89.2
32	710	2.851	-92.4	-92.7	-92.4
33	800	2.903	-94.3	-94.5	-94.7
34	900	2.954	-98.9	-98.6	-98.7
35	1000	3.000	-100.1	-100.5	-100.2

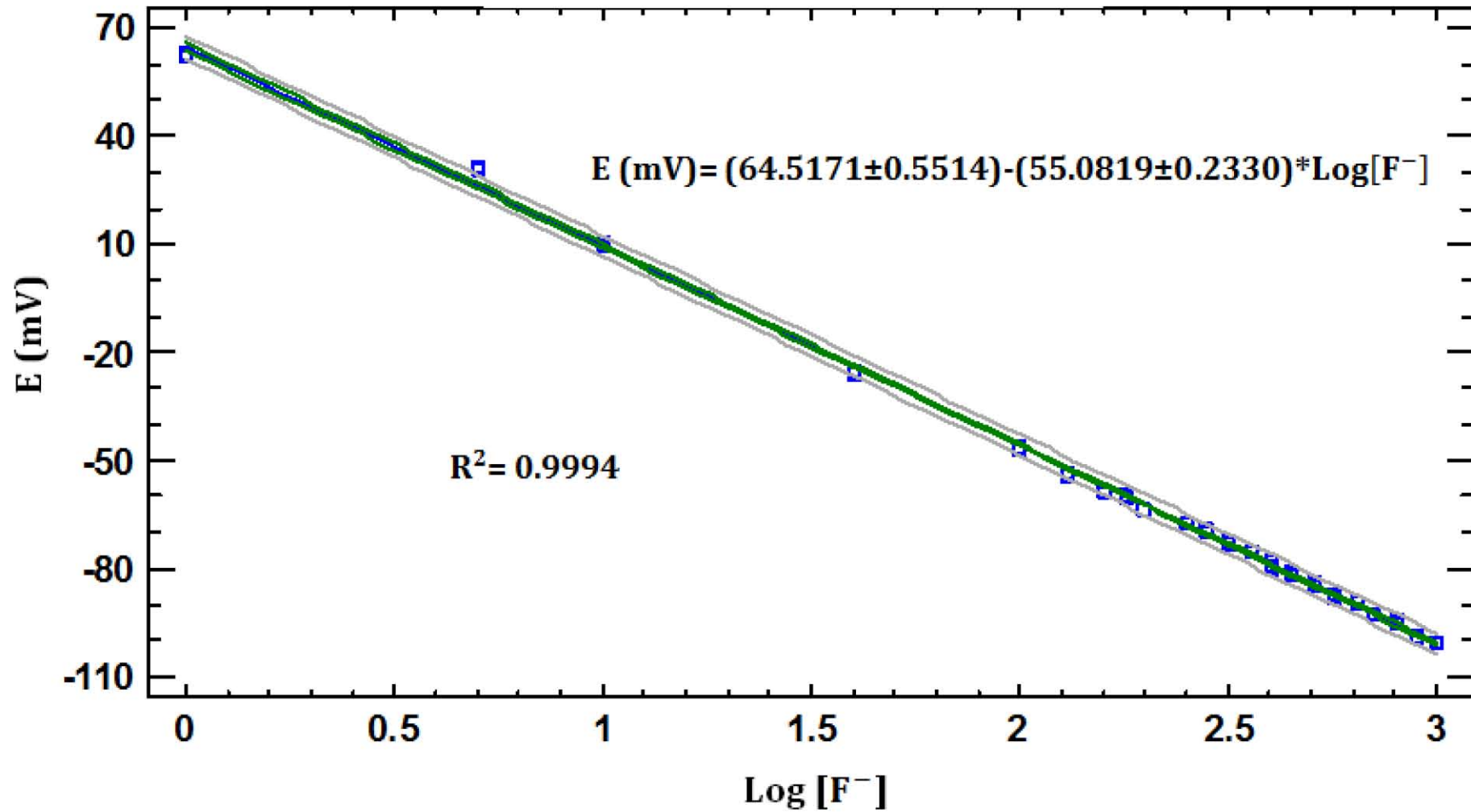


Gráfica 2. Representación gráfica del Log[F⁻] vs E(mV) de los datos de la Tabla 7.

Tabla 8. Potenciales obtenidos con ayuda de Excel en el intervalo lineal de trabajo y los coeficientes obtenidos a través de la gráfica de regresión lineal, generada usando el programa STATGRAPHICS Centurion XVI.

Sistema	Concentración (ppm)	log[ppm]	1º Réplica	2º Réplica	3º Réplica
			E(mV)	E(mV)	E(mV)
14	1	0.000	62.4	62.2	62.5
15	5	0.699	30.7	31.0	30.7
16	10	1.000	9.8	9.9	9.9
17	40	1.602	-24.9	-25.6	-25.6
18	100	2.000	-46.2	-46.8	-46.7
19	130	2.114	-53.3	-53.3	-53.9
20	160	2.204	-58.5	-59.0	-58.5
21	180	2.255	-60.1	-60.0	-60.0
22	200	2.301	-63.4	-63.4	-63.2
23	250	2.398	-67.1	-67.3	-67.2
24	280	2.447	-69.8	-69.9	-69.2
25	320	2.505	-72.2	-72.8	-72.2
26	360	2.556	-75.4	-75.3	-75.4
27	400	2.602	-79.8	-78.0	-79.4
28	450	2.653	-81.8	-81.0	-81.9
29	510	2.708	-84.9	-84.4	-84.1
30	570	2.756	-87.3	-87.0	-87.5
31	640	2.806	-89.6	-89.8	-89.2
32	710	2.851	-92.4	-92.7	-92.4
33	800	2.903	-94.3	-94.5	-94.7
34	900	2.954	-98.9	-98.6	-98.7
35	1000	3.000	-100.1	-100.5	-100.2
Parámetro	Cuadrados Mínimos Estimados	Error Estándar	IC(β_1)(mV) 97.5% de confianza		
Intercepto (b)	64.5171	0.55144			
Pendiente (m)	-55.0819	0.233025			

Linealidad



Gráfica 3. Linealidad del sistema con su respectiva ecuación de la recta y coeficiente de correlación.

Exactitud del Método.

Se evaluaron las concentraciones de 100 y 250 ppm por sextuplicado, como se conocen los componentes de los enjuagues bucales fue posible utilizar un placebo analítico, para este parámetro se utilizó un enjuague bucal sin fluoruro de la marca Listerine Freshmint con la finalidad de cuantificar los enjuagues bucales y descartar que la matriz de los enjuagues interfiere en la medición de la presencia del ión fluoruro en estos; y así determinar la concentración de cada enjuague bucal con mayor confianza y exactitud al momento de aplicar el método.

La **Tabla 9** muestra los datos obtenidos para cada concentración por sextuplicado, en donde a través de los potenciales podemos determinar la concentración real y contrastarla contra la concentración teórica y con estos datos calcular el porcentaje de recobro, el cual se calcula al obtener el cociente de la cantidad recuperada a la cantidad adicionada expresada en porcentaje. A través de estos resultados también podemos observar que a mayor concentración mayor dispersión de los datos; esto se ve reflejado en el coeficiente de variación (CV) de cada concentración, es decir hay menor dispersión de datos en la concentración de 100 ppm que en la de 250 ppm. Los coeficientes de variación (CV) y los intervalos de confianza (IC) cumplen los criterios de aceptación establecidos en la Guía de Validación del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, A.C. indicados para el porcentaje de recobro (%R); en donde se establece que para métodos fisicoquímicos el CV debe ser menor al 3% y el IC debe incluir el 100% o que el promedio aritmético del % de recobro se incluya en el intervalo (97-103%). Los cálculos pertinentes están indicados en el Anexo correspondiente al parámetro de Exactitud.

Tabla 9. Datos obtenidos para determinar el % de recobro de las concentraciones de 100 y 250 ppm.

Concentración	100 ppm				250 ppm				
	# Medición	E(mV)	Log [F ⁻]	[F ⁻] ppm	% de Recobro	E(mV)	Log [F ⁻]	[F ⁻] ppm	% de Recobro
	1	-45.9	2.005	101.064	101.064	-67.3	2.393	247.236	98.894
	2	-45.6	1.999	99.805	99.805	-68.5	2.415	259.954	103.982
	3	-46.1	2.008	101.913	101.913	-67.1	2.389	245.177	98.071
	4	-46.8	2.021	104.939	104.939	-67.3	2.393	247.236	98.894
	5	-46.2	2.010	102.340	102.340	-67.2	2.391	246.204	98.482
	6	-46.1	2.008	101.913	101.913	-68.6	2.417	261.043	104.417
				promedio	101.996			promedio	100.457
				CV	1.667			CV	2.905
				IC(μ)	99.9±1.79			IC(μ)	99.3±3.06

Linealidad del Método, Límite de Detección (LD) y Límite de Cuantificación (LC) del ISE de fluoruros.

Para la determinación de Linealidad del Método se elaboró una curva de calibración por triplicado con un intervalo de concentraciones de 1 – 1000 ppm, el cual se encuentra dentro del intervalo lineal de acuerdo a la linealidad del sistema donde ya se conoce el comportamiento del electrodo. La metodología entre linealidad del sistema y linealidad del método es muy similar, pero lo que cambia es que como ya se conoce el intervalo de trabajo lineal se preparan diferentes soluciones a diferentes concentraciones dentro de este intervalo, y como el método se aplicó en enjuagues bucales con fluoruro, se conocen los componentes que están presentes en estos, se les agrega un placebo analítico en este caso un enjuague bucal sin fluoruro de la marca Listerine Freshmint con la finalidad de descartar que la matriz de los enjuagues interfiere en la cuantificación del ión fluoruro. A diferencia de la exactitud del método donde solo se utilizan 2 soluciones de diferentes concentraciones y se miden por sextuplicado, en este parámetro se utilizan 10 soluciones con las cuales se construye una curva de calibración.

En la **Tabla 10** se muestran los potenciales obtenidos por triplicado, los cuales ayudaron a determinar la linealidad del método con ayuda del STATGRAPHICS Centurion XVI, el programa fue alimentado con estos datos y da por resultado la **Gráfica 4**, la cual muestra un alto coeficiente de determinación ($r^2=0.9988$) y un valor de pendiente de -54.1123 mV lo que indica que esta respuesta es muy cercana a una respuesta nernstiana (Evans, A, 1987 y *Pure & appl. Chem.* 1994) esperada para el ISE de fluoruros (en el anexo para Linealidad del Método se muestran las fórmulas utilizadas para la obtención de este parámetro, la tabla ANOVA y sus respectivos residuales). Por lo tanto este parámetro es aceptado de acuerdo a la Guía de Validación del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, A.C. con un intervalo de confianza de la pendiente $IC(\beta_1)$ al 97.5% de confianza:

$$IC(\beta_1) = -55.0819 \pm 0.4860 \text{ mV}$$

Así también los datos de la Tabla 10 fueron interpolados en la Gráfica 4 con la finalidad de obtener el porcentaje de recuperación de cada uno de los potenciales (Ver **Tabla 11**) y reportar la relación entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada, y de esta manera generar un gráfico (Ver **Gráfica 5**), para obtener el valor de la pendiente (b_1), la ordenada al origen (b_0), el coeficiente de determinación (r^2), el intervalo de confianza para la pendiente ($IC(\beta_1)$), el intervalo de confianza para la ordenada al origen ($IC(\beta_0)$) y el coeficiente de variación de regresión ($CV_{y/x}$). Los resultados de estos parámetros se encuentran en la tabla 11.

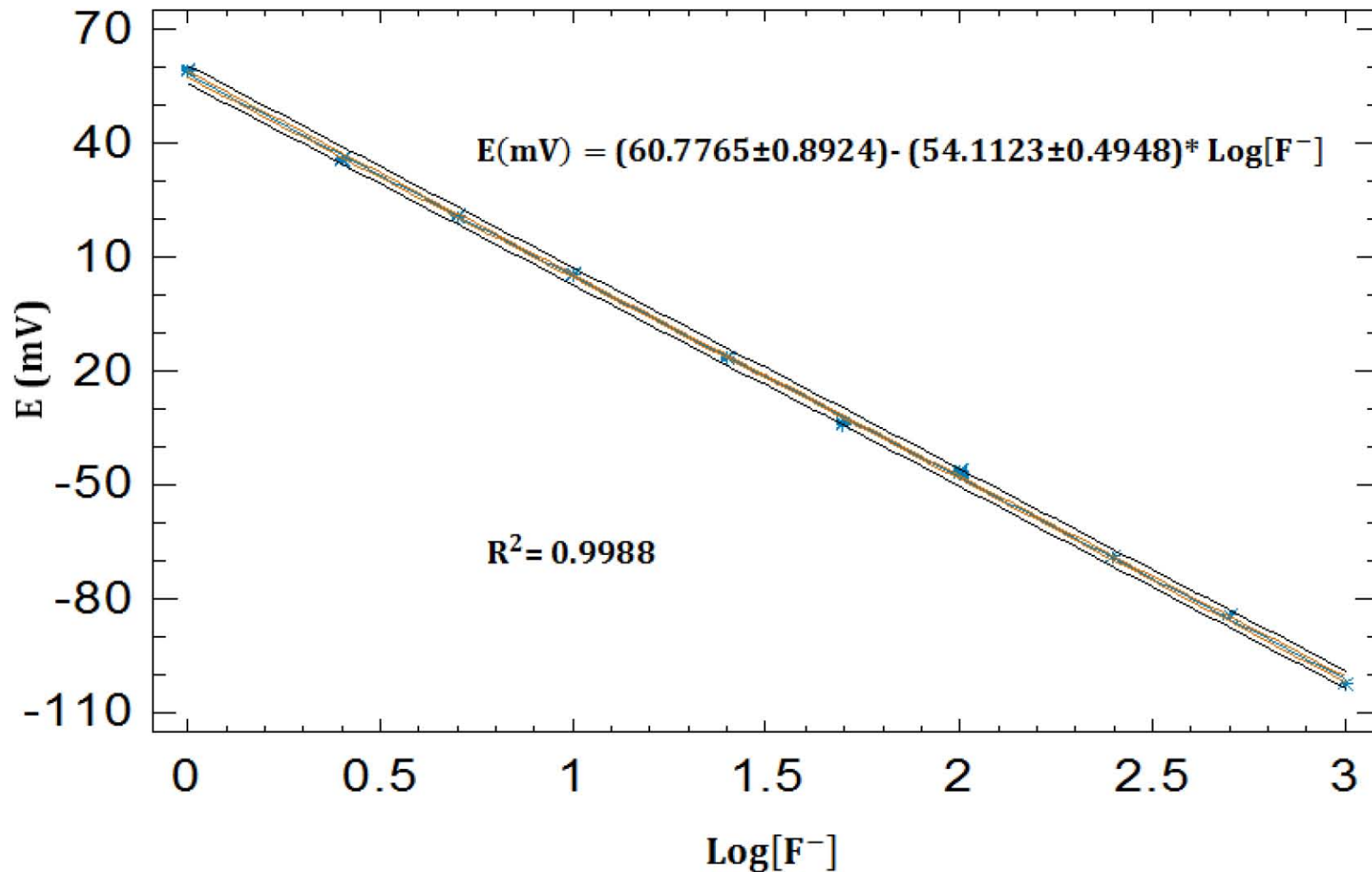
Tabla 10. Potenciales obtenidos a 10 diferentes niveles de concentración por tres diferentes analistas, para determinar la

Concentración [F ⁻](ppm)	Log [F ⁻]	1ª Réplica (mV)	2ª Réplica (mV)	3ª Réplica (mV)
1	0	62.5	62.4	62.2
2.5	0.398	35.7	35.9	35.7
5	0.699	19.6	19.8	19.7
10	1	9.8	9.9	9.8
25	1.398	-10.4	-10.5	-10.5
50	1.699	-32.8	-32.6	-32.7
100	2	-46.8	-46.6	-46.2
250	2.398	-68.9	-68.9	-68.7
500	2.699	-87.3	-87.5	-87.5
1000	3	-101.4	-101.3	-101.4

Tabla 11. Cantidad adicionada y cantidad recuperada y porcentajes de recobro de cada una de las réplicas de la Tabla 10.

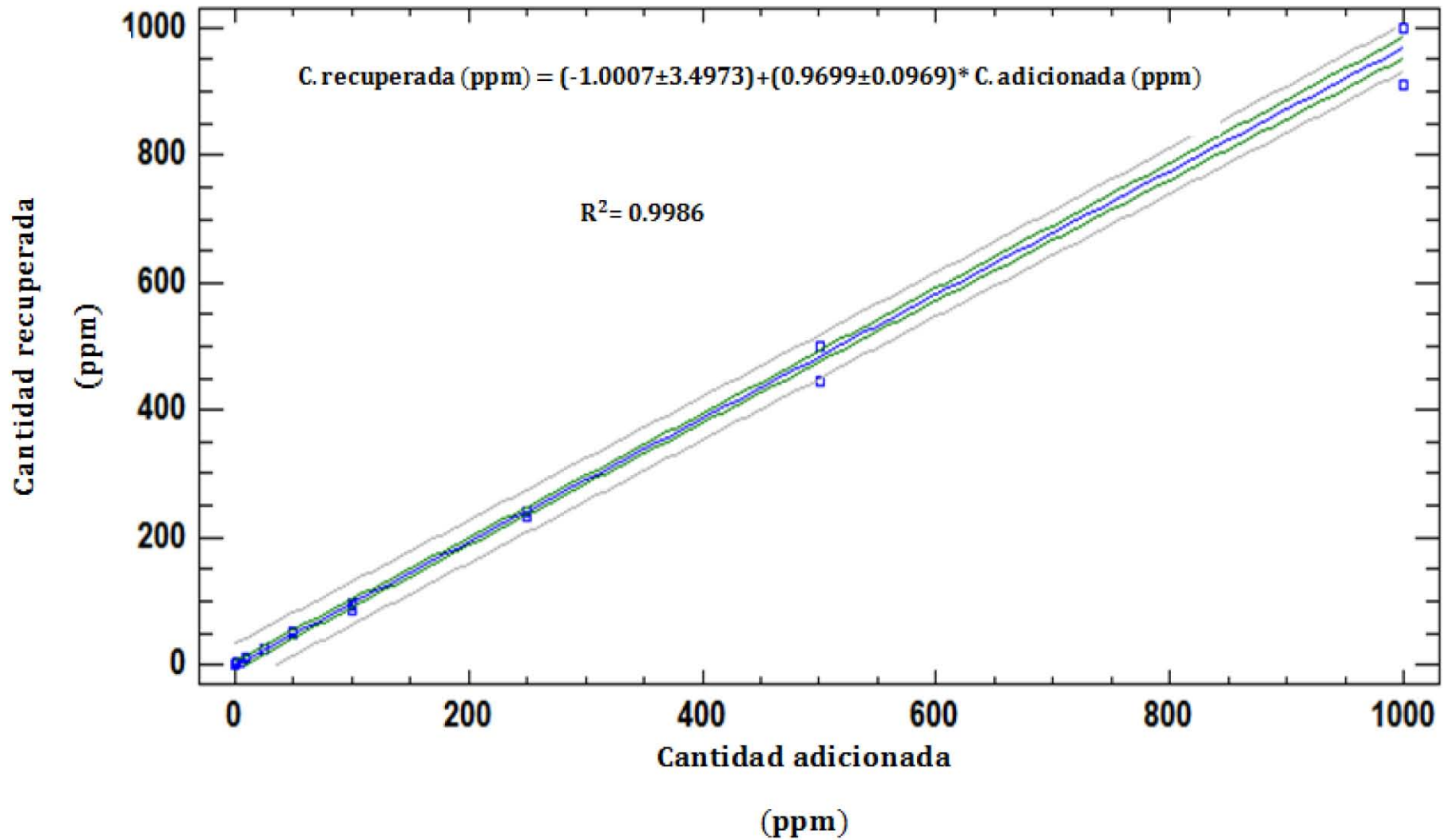
Concentración adicionada [F ⁻](ppm)	Cantidad recuperada			Porcentaje de recobro		
	1ª Réplica	2ª Réplica	3ª Réplica	1ª Réplica	2ª Réplica	3ª Réplica
	(ppm)	(ppm)	(ppm)	(%R)	(%R)	(%R)
1	0.953	0.933	0.955	95.280	93.325	95.499
2.5	2.570	2.692	2.570	102.816	107.661	102.816
5	4.677	4.898	4.786	93.547	97.956	95.726
10	10.000	10.233	10.000	100.000	102.329	100.000
25	23.988	24.547	24.547	95.953	98.188	98.188
50	51.286	47.863	48.978	102.572	95.726	97.956
100	95.499	91.201	87.096	95.499	91.201	87.096
250	239.883	239.883	234.423	95.953	95.953	93.769
500	446.684	501.187	501.187	89.337	100.237	100.237
1000	1000.000	912.011	1000.000	100.000	91.201	100.000
Parámetro	Cuadrados mínimos estimados		Error estándar	IC(mV) 97.5% de confianza		CV (%)
Intercepto (b)	-1.0007		3.4973	-1.0007±7.1624		0.0051
Pendiente (m)	0.9699		0.0969	0.9699±0.1984		

Linealidad del Método



Gráfica 4. Linealidad del Método con su respectiva ecuación de la recta y coeficiente de correlación.

Cantidad adicionada vs Cantidad recuperada



Gráfica 5. Relación cantidad adicionada vs cantidad recuperada con su respectiva ecuación de la recta y coeficiente de correlación.

Límite de Detección (LD) y Límite de Cuantificación (LC)

Debido a que no se tiene una relación lineal entre la concentración y la respuesta del electrodo a bajas concentraciones de analito (concentraciones menores a 1 ppm) los límites de detección (LD) y de cuantificación (LC) no es recomendable calcularlos por el método de Miller ni por el método de la curva de calibración a bajas concentraciones. Cuando se trabaja con electrodos de ión selectivo no se recomienda la lectura de blancos porque es inestable e inexacta (PerfectION™ Guidebook, 2011). No obstante, se ensayó calcular estos parámetros utilizando los datos de Linealidad del Método (Ver **Tabla 10**), el cual es el más adecuado en comparación al parámetro de linealidad del sistema, porque este ya incluye el efecto de matriz; el programa STATGRAPHICS Centurion XVI ayudo mucho, ya que al ingresarle los datos por triplicado, además de generar el gráfico correspondiente para linealidad del método, genera también la tabla de análisis de varianza (ANOVA) en la cual nos arroja directamente la desviación estándar a utilizar que se muestra en el anexo correspondiente para LD y LC.

El límite de detección (LD) se determinó utilizando la ecuación que se muestra en el anexo correspondiente a este parámetro utilizando los datos generados en linealidad del método permitiendo así la determinación del valor de LD con un intervalo de confianza *IC* al 97.5% (Ver anexo: LD):

$$LD=1.07\pm 0.03 \text{ ppm.}$$

El límite de cuantificación se determinó como lo establece la IUPAC de igual forma utilizando los mismos valores que se generaron en la linealidad del método; solo que su determinación fue diferente utilizando las respectivas fórmulas de acuerdo al Anexo de LC. Se determinó este parámetro debido a que es el punto mínimo útil para realizar cuantificaciones y como las mediciones también se hicieron por triplicado también fue posible establecer un *IC* al 97.5% (Ver anexo: LC):

$$LC=1.23\pm 0.09 \text{ ppm.}$$

Precisión (Precisión intermedia, Repetibilidad y Reproducibilidad) del ISE de fluoruros.

Como ya se menciona anteriormente la precisión indica la variabilidad de un método de ensayo y expresa en que rango es aceptable la variación de una misma muestra a condiciones reales, dato que posteriormente es usado como condición de criterio para la aceptación o rechazo de análisis.

En la precisión pueden considerarse tres niveles: repetibilidad (r), precisión intermedia y reproducibilidad (R) (Velásquez, 2008); los cuales se obtuvieron por 3 diferentes analistas a 10 niveles diferentes de concentración; como se recomienda en el método *Two way* (dos vías) ANOVA (análisis de varianza) (Adaptive Business Management Systems Ltd, 2011) modelo de efectos fijos con repeticiones. Este método calcula la variabilidad total de medición del sistema y permite la separación de la variabilidad del sistema total de medición en repetibilidad (r) y reproducibilidad (R).

Con la precisión intermedia se busca evaluar la variabilidad del método usado en un mismo laboratorio pero a condiciones operativas distintas, los factores a modificar incluyen el día de análisis, analista, instrumento, entre otros.

La **Tabla 12** muestra los valores obtenidos de los potenciales a 10 diferentes concentraciones de fluoruro, las cuales se midieron por triplicado por tres diferentes analistas. En la **Tabla 13** se muestra el reporte de repetibilidad y reproducibilidad la cual se obtuvo a través del programa *STATGRAPHICS Centurion XVI*; el cual se alimentó con los potenciales mostrados en la tabla 10. El programa permitió que a través de sus herramientas de calidad se realizara un estudio r & R , por el método ANOVA el cual ya directamente arroja los valores de r & R individuales y combinados.

El método ANOVA como su nombre lo indica, es un método que permite descomponer la variabilidad del sistema en sus diversos componentes, en este caso repetibilidad y reproducibilidad. Aunque podría desglosarlos en los diversos componentes que se quisieran analizar, por ejemplo: error experimental puro, error de ajuste al modelo, día, sexo, tipo de disolvente, origen de los reactivos etc.

Los indicadores $\%r$ & R proporcionan la siguiente información (ICH, 2005):

- Si el valor $\%r$ & R es igual o menor al 15% el sistema operador o instrumento es el apropiado para la aplicación diseñada.

- Si el valor %r&R está entre 15% y 25% el sistema en general requiere mejoras, sin embargo puede ser utilizado de manera temporal.
- Si el valor %r&R es superior al 25% el sistema no es aceptable.

Tabla 12. Potenciales obtenidos a 10 diferentes niveles de concentración por tres diferentes analistas, para determinar la precisión del sistema.

ANALISTA		A			B			C		
Nivel	Concentración (ppm)	1 ^a Réplica (mV)	2 ^a Réplica (mV)	3 ^a Réplica (mV)	1 ^a Réplica (mV)	2 ^a Réplica (mV)	3 ^a Réplica (mV)	1 ^a Réplica (mV)	2 ^a Réplica (mV)	3 ^a Réplica (mV)
1	1	62.4	62.2	62.5	63.7	63.9	63.5	61.6	61.8	61.7
2	2.5	35.9	35.9	35.7	35.8	35.7	35.8	35.7	35.7	35.4
3	5	15.4	15.3	15.4	15.5	15.8	15.8	15.8	15.9	15.9
4	10	5.2	5.1	5.2	5.6	5.5	5.6	5.1	5	5.1
5	25	-20.4	-20.5	-20.4	-20.3	-20.5	-20.4	-20.4	-20.5	-20.3
6	50	-33.9	-33.8	-33.8	-33.9	-33.7	-33.8	-33.9	-33.9	-33.8
7	100	-46.6	-46.6	-46.8	-46.2	-46.2	-46.3	-46.7	-46.8	-46.7
8	250	-68.9	-68.8	-68.9	-68.8	-68.7	-68.8	-68.8	-68.8	-68.8
9	500	-84.3	-84.1	-84.3	-84.2	-84.3	-84.2	-84.5	-84.4	-84.1
10	1000	-102.4	-102.3	-102.4	-102.4	-102.4	-102.3	-102.3	-102.5	-102.5

Tabla 13. Reporte de Repetibilidad y Reproducibilidad (r&R).

Medición	Sigma Estimada	Porcentaje de Variación Total	Varianza Estimada	Porcentaje de Contribución	Porcentaje de R&R
Repetibilidad	0.287617	0.536184	0.0827236	0.00287493	75.37
Reproducibilidad	0.164424	0.306523	0.0270351	0.000939565	24.63
r&R	0.331299	0.617616	0.109759	0.0038145	100.0
Partes	53.6405	99.9981	2877.3	99.9962	
Variación Total	53.6415	100.0	2877.41		

Con base en el estudio que se muestra en la **Tabla 13**, se involucraron 3 operadores, cada uno midiendo 10 niveles de concentración (partes) por triplicado, la desviación estándar estimada del proceso de medición es igual a **0.331299**. Incluyendo niveles de concentración (partes), la variación total (VT) es igual a **53.6415**. Para este estudio, el valor de r%R es igual a **0.617616%**; y de acuerdo a los indicadores %r&R mencionados anteriormente como %r&R es menor al 15% el ISE de fluoruros es el apropiado para la aplicación diseñada.

En cuanto a precisión intermedia, se determinó a partir del porcentaje de recobro (% R) (ver **Tabla 14.**), el cual se determinó a partir de los potenciales contenidos en la tabla 12, estos potenciales fueron interpolados en la curva de calibración (gráfica obtenida para linealidad del método, ver **Gráfica 4**), en donde se obtuvo el logaritmo de la concentración para cada uno de ellos y posteriormente se determinó el antilogaritmo de la concentración para determinar la concentración experimental y en base a esto se calculó el %R, (ver fórmulas en anexo de precisión) a partir de estos datos se determinó el coeficiente de variación (CV) y el intervalo de confianza (IC) los cuales determinan la precisión intermedia.

La **Tabla 15** muestra los resultados obtenidos de los cuales podemos concluir que el criterio de aceptación para el CV no es aceptable ya que para métodos químicos o espectrofotométricos el criterio de aceptación es $CV \leq 3\%$ y en nuestro caso el CV es igual a 4.56%, y con respecto al IC(μ) debe incluir el 100% o el promedio aritmético del %R (100.035%) se debe incluir en el intervalo, el cual si es aceptable ya que como se muestra en la tabla mencionada anteriormente nuestro IC(μ) incluye tanto el 100% así como el promedio aritmético del %R que es igual a 100.035%; esto basado en los criterios de aceptación establecidos en la Guía de Validación del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, A.C.

En el anexo correspondiente a precisión se muestra la Tabla ANOVA, la Tabla de Intervalos de Confianza y su respectiva interpretación, también se encuentran las fórmulas para la determinación de precisión intermedia.

Tabla 14. Porcentajes de recobro de los diferentes analistas, para obtener la precisión intermedia.

ANALISTA		A			B			C		
Nivel	Concentración (ppm)	1 ^a Réplica (%)	2 ^a Réplica (%)	3 ^a Réplica (%)	1 ^a Réplica (%)	2 ^a Réplica (%)	3 ^a Réplica (%)	1 ^a Réplica (%)	2 ^a Réplica (%)	3 ^a Réplica (%)
1	1	93.325	95.499	95.280	112.202	114.815	107.152	87.096	83.176	85.114
2	2.5	107.661	107.661	102.816	105.211	102.816	105.211	102.816	102.816	98.188
3	5	93.547	91.418	93.547	95.726	102.572	102.572	102.572	104.961	104.961
4	10	102.329	97.724	102.329	112.202	109.648	112.202	102.329	97.724	102.329
5	25	98.188	102.816	98.188	98.188	102.816	95.953	98.188	98.188	95.953
6	50	102.572	97.956	97.956	102.572	95.726	97.956	102.572	102.572	97.956
7	100	102.329	102.329	107.152	93.325	93.325	95.499	104.713	107.152	104.713
8	250	98.188	95.953	98.188	95.953	93.769	95.953	95.953	95.953	95.953
9	500	100.237	95.726	100.237	97.956	100.237	97.956	104.961	102.572	95.726
10	1000	102.329	95.499	102.329	102.329	102.329	95.499	95.499	104.713	104.713

Tabla 15. Resultados obtenidos para la precisión intermedia.

CV(%)	IC(μ)	
4.56	98.8616274	101.207756

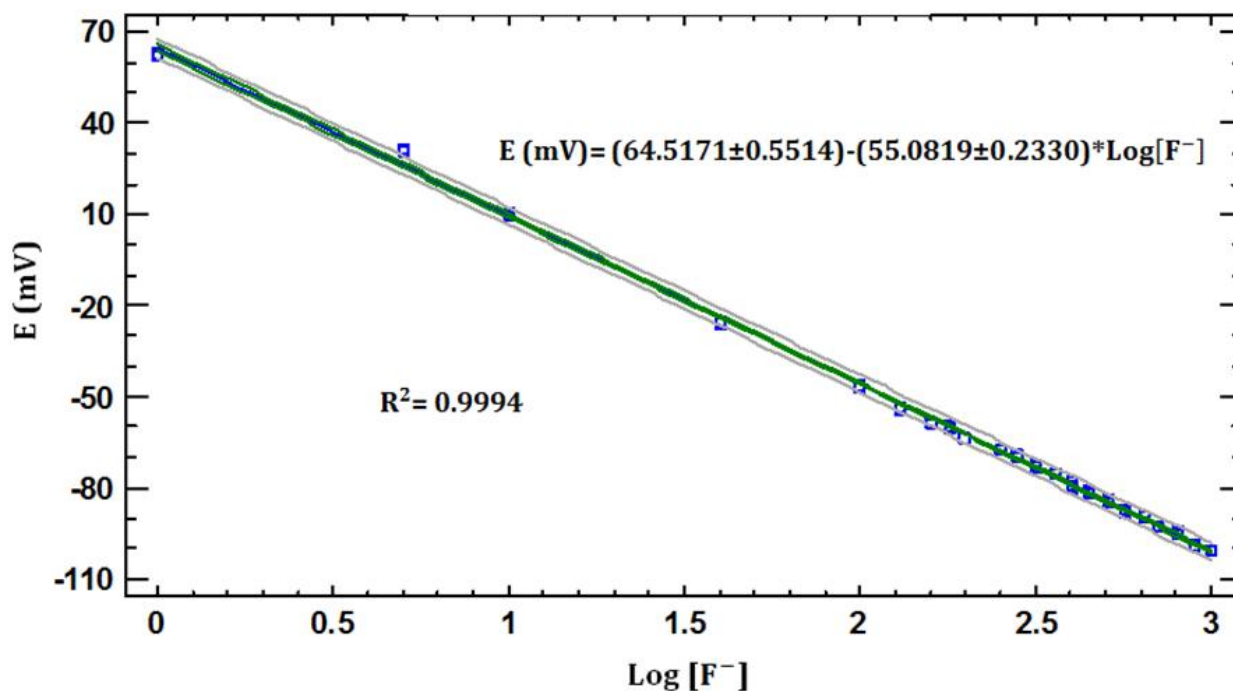
Sensibilidad del ISE de fluoruros.

En la **Tabla 16** se presentan los datos para la determinación del parámetro de sensibilidad, al obtener las respuestas por triplicado para 22 diferentes concentraciones las cuales están dentro del intervalo lineal. Este parámetro se determina al obtener la pendiente de la curva, es decir, el cambio en la respuesta del instrumento. La sensibilidad fue tomada de la linealidad del sistema, debido a que tiene suficientes puntos para su evaluación; así que la gráfica es la misma para ambos parámetros, en la **Gráfica. 6**, la pendiente (m) es igual a -55.0819 mV lo cual es muy cercano a una respuesta *nernstiana*, indicando así una buena sensibilidad del ISE de fluoruros (*Pure & appl. Chem.* 1994). En el anexo correspondiente a sensibilidad se encuentran las fórmulas para la determinación de $IC(\mu)$.

Tabla 16. Potenciales obtenidos para determinar la sensibilidad del electrodo.

Sistema	Concentración (ppm)	log[ppm]	1ª Réplica	2ª Réplica	3ª Réplica
			E(mV)	E(mV)	E(mV)
1	1	0.000	62.4	62.2	62.5
2	5	0.699	30.7	31.0	30.7
3	10	1.000	9.8	9.9	9.9
4	40	1.602	-24.9	-25.6	-25.6
5	100	2.000	-46.2	-46.8	-46.7
6	130	2.114	-53.3	-53.3	-53.9
7	160	2.204	-58.5	-59.0	-58.5
8	180	2.255	-60.1	-60.0	-60.0
9	200	2.301	-63.4	-63.4	-63.2
10	250	2.398	-67.1	-67.3	-67.2
11	280	2.447	-69.8	-69.9	-69.2
12	320	2.505	-72.2	-72.8	-72.2
13	360	2.556	-75.4	-75.3	-75.4
14	400	2.602	-79.8	-78.0	-79.4
15	450	2.653	-81.8	-81.0	-81.9
16	510	2.708	-84.9	-84.4	-84.1
17	570	2.756	-87.3	-87.0	-87.5
18	640	2.806	-89.6	-89.8	-89.2
19	710	2.851	-92.4	-92.7	-92.4
20	800	2.903	-94.3	-94.5	-94.7
21	900	2.954	-98.9	-98.6	-98.7
22	1000	3.000	-100.1	-100.5	-100.2
<i>Parámetro</i>	Cuadrados Mínimos Estimados	Error Estándar	IC(β_1)(mV) 97.5% de confianza		
Intercepto (b)	64.5171	0.55144			
Pendiente (m)	-55.0819	0.233025			

Sensibilidad



Gráfica 6. Demostración del parámetro de sensibilidad con su respectiva ecuación de la recta y coeficiente de correlación.

Robustez.

En las **Tablas 17 y 18** se presentan los resultados obtenidos para el parámetro de robustez, en los cuales se observan los resultados al modificar dos diferentes condiciones (temperatura y solución TISAB II) al sistema de 100ppm. En la **Tabla 17** se observan los diferentes resultados obtenidos de la concentración de 100ppm a condiciones normales (25°C), condiciones bajas (10°C) y condiciones altas (35°) utilizando la solución TISAB II, determinando su concentración con una curva de calibración igualmente bajo condiciones normales; y así a su vez se determinó el %R de cada una de las condiciones mencionadas. De la misma manera se determinó la concentración de 100ppm por cuadruplicado bajo las tres condiciones mencionadas anteriormente, solo que en esta parte no se agregó la solución TISAB II a las condiciones alta y baja, pero el procedimiento fue el mismo (ver **Tabla 18**). Se determinó la media aritmética del %R para cada una de las diferentes condiciones (i) con y sin TISAB II (i), se determinaron las diferencias absolutas $|d_i| = |y_1 - y_0|$ y $|d_i| = |y_2 - y_0|$. Los resultados fueron: $|d_i| = 36.2411\%$ y $|d_i| = 42.8207\%$ para el cambio en temperatura, $|d_i| = 7.3859\%$ y $|d_i| = 127.808\%$ para la medición del sistema sin solución TISAB II.

Con estos resultados se pueden determinar los factores que presentan mayor efecto sobre el desempeño del método, ordenándolos en base al efecto que causan: condiciones a temperatura alta (35°C) con y sin solución buffer, seguida de la condición de temperatura baja (10°C). Estos experimentos y sus resultados indican que no se debe variar la temperatura ya que a concentraciones bajas la concentración disminuye y a temperaturas altas la concentración aumenta y la solución TISAB II siempre tiene que ser añadida a cada muestra o solución a medir debido a que es la que regula actividad iónica. Debido a que los $|d_i|$ de la temperatura y de la solución TISAB II rebasan el 3% por lo tanto el parámetro de robustez no es aceptado esto basado en los criterios de aceptación establecidos en la *Guía de Validación de Métodos Analíticos del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, A.C.*

Tabla 17. Comparación de los % R entre la condición normal (25°C) y las temperaturas alta (35°C) y baja (10°C) utilizando TISAB II.

Mediciones de 1 nivel de concentración (100ppm) con TISAB II	Temperatura		
	Baja a 10°C (% R)	Normal a 25°C (% R)	Alta a 35°C (% R)
1	68.89636	104.7939	147.6985
2	67.78333	104.3681	147.1047
3	66.96037	103.9440	146.5133
4	67.78333	104.3681	147.1047
Media aritmética	$y_1 = 68.3398$	$y_0 = 104.5809$	$y_2 = 147.4016$

$$|d_i| = |y_1 - y_0| = |68.3398 - 104.5809| = 36.2411\%$$

$$|d_i| = |y_2 - y_0| = |147.4016 - 104.5809| = 42.8207\%$$

Tabla 18. Comparación de los % R entre la condición normal (25°C) y las temperaturas alta (35°C) y baja (10°C) sin TISAB II.

Mediciones de 1 nivel de concentración (100ppm) sin TISAB II	Temperatura		
	Baja a 10°C (% R)	Normal a 25°C (% R)	Alta a 35°C (% R)
1	98.18438865	104.7939	231.9158577
2	96.20567861	104.3681	232.8520345
3	96.99233184	103.9440	230.9834448
4	98.98722137	104.3681	231.9158577
Media aritmética	$y_1 = 97.195$	$y_0 = 147.4016$	$y_2 = 232.3839$

$$|d_i| = |y_1 - y_0| = |97.195 - 147.4016| = 50.2066\%$$

$$|d_i| = |y_2 - y_0| = |232.3839 - 147.4016| = 84.9823\%$$

Con base en los resultados obtenidos, se puede concluir que el método está validado y como lo muestra la **Tabla 19**, la mayoría de los parámetros cumplen con los criterios de aceptación, a excepción del parámetro de robustez; los cuales indican que el método analítico puede ser utilizado para una correcta determinación de iones fluoruro en enjuagues bucales en un intervalo de concentración de 1-1000 ppm.

Tabla 19. Comparación de los datos experimentales con los criterios de aceptación establecidos en la *Guía de Validación de Métodos Analíticos del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, A.C.*

Parámetro	Criterios de aceptación	Resultados Experimentales
Linealidad del Sistema	$r^2 \geq 0.98$ IC(β_1) no debe incluir el cero.	$r^2=0.9994$ IC(β_1)= -55.0819±0.9665 mV Intervalo: 1-1000 ppm
Exactitud	CV<3% IC (μ); debe incluir el 100% o que el promedio aritmético del %R se incluya en el intervalo (97-103%)	CV=1.667% y 2.905% IC(μ)=99.9±1.79 mV y 99.3±3.06 mV $\bar{y} = 101.996$ y 100.457
Linealidad del Método	$r^2 \geq 0.98$ IC(β_1) no debe incluir el cero. ❖ <i>Cantidad adicionada vs Cantidad recuperada</i> $r^2 \geq 0.98$ IC(β_1) debe incluir la unidad. IC(β_0) debe incluir el cero. CV _{y/x} del %R no mayor al 3% ❖ <i>Porcentaje de recobro (%R)</i> IC (μ); debe incluir el 100% o que el promedio aritmético del %R se incluya en el intervalo (97-103%) CV<3%	$r^2=0.9988$ IC(β_1)= -54.1123±0.4860 mV $r^2=0.9986$ IC(β_1)= 0.9699±0.1984 mV IC(β_0)= -1.0007±0.7.1624 mV CV _{y/x} = 0.0051% IC (μ)= 97.207%±1.6650 CV= 4.5814%
Límite de detección (LD)	-----	1.07±0.03 ppm
Límite de cuantificación (LC)	-----	1.23±0.09 ppm
Precisión	%r&R<15% CV≤3%	r&R= 0.6176% CV= 4.56%
Sensibilidad	pendiente≈59.16mV	-55.0819±0.9665 mV
Robustez	d _i ≤3%	Temperatura= d _i = 36.2411% y 42.8807% TISAB II= d _i = 50.2066% y 84.9823%

5.3 APLICACIÓN DEL MÉTODO VALIDADO (CURVA DE CALIBRACIÓN).

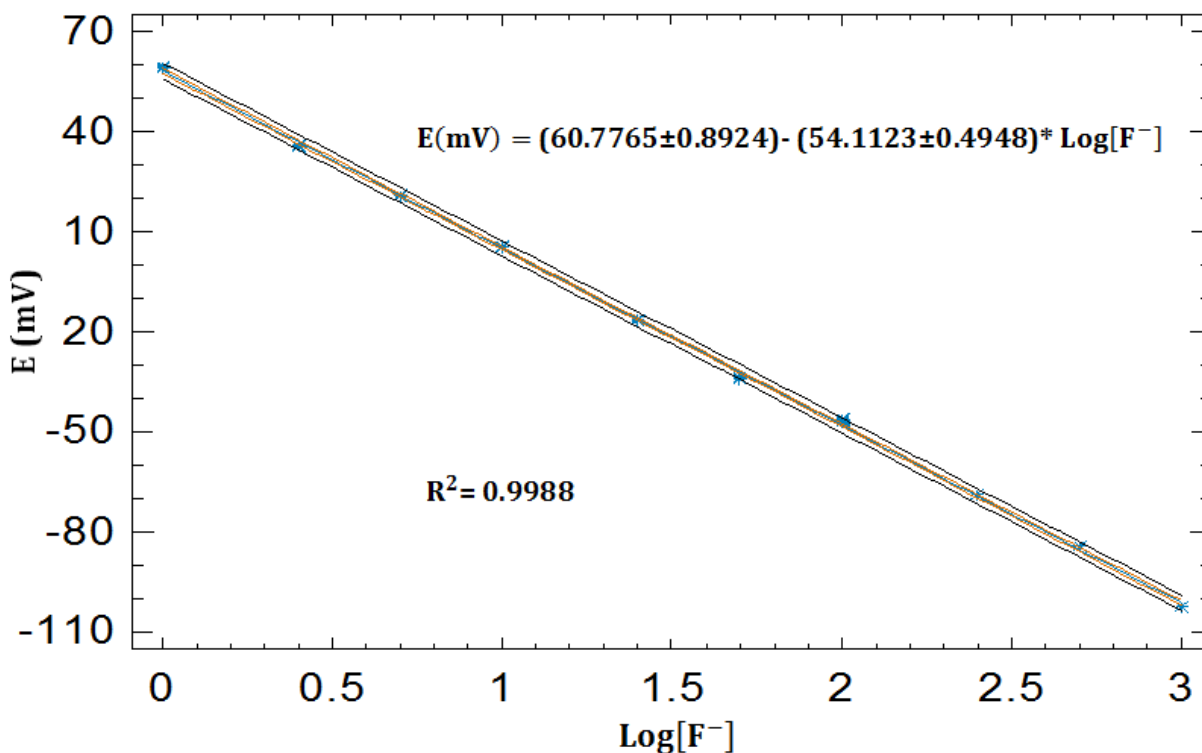
Para cuantificar el contenido de flúor en enjuagues bucales fluorados a través del Método de Electrodo de Ión Selectivo, se realizó un estudio de tipo cuantitativo y descriptivo; se aplicó el método validado para la determinación de fluoruro por curva de calibración a 13 diferentes enjuagues bucales (Listerine Advance, Listerine Total Care, Listerine Whitening Colgate Plax Fresh Mint, Colgate Plax Complete Care 10 en 1, Colgate Plax Whitening, Colgate Plax Kids , Oral-B Complete Hierbabuena, Oral-B Complete Menta Refrescante, Oral-B Prosalud, Astringosol ICE, Astringosol Advance y Dental Max).

Se realizó una curva de calibración de 10 niveles diferentes de concentración utilizando un Estándar de referencia certificado *Fluoride Ion Selective Electrode Standard* de 1000 mg/L de $F^- \pm 0.5 \%$, lote No. ISEF513A1 Preparado con KF y H_2O (500mL). Marca Mettler Toledo y utilizando como placebo un enjuague bucal sin fluoruro; esto con el fin de determinar si la matriz de los enjuagues afectaban la medición del ión fluoruro y a su vez determinar la linealidad del método. En la **Tabla 20** se muestran los resultados obtenidos para la construcción de la curva de calibración. En la **Gráfica 7** se observa la Curva de calibración y a su vez la Linealidad del método donde se puede percibir que la matriz de los enjuagues bucales no interfiere en la cuantificación de flúor en estos y no fue necesario realizar un tratamiento previo a las muestras para su medición. Otro dato muy relevante es que la pendiente obtenida es muy cercana a la linealidad del sistema, y el coeficiente de correlación es idéntico, por lo tanto las mediciones de los enjuagues bucales pudieron ser medidas directamente

Tabla 20. Datos obtenidos por triplicado para la construcción de la curva de calibración y linealidad del método.

Concentración $[F^-]$ (ppm)	Log $[F^-]$	1ª Réplica (mV)	2ª Réplica (mV)	3ª Réplica (mV)
1	0	62.5	62.4	62.2
2.5	0.398	35.7	35.9	35.7
5	0.699	19.6	19.8	19.7
10	1	9.8	9.9	9.8
25	1.398	-10.4	-10.5	-10.5
50	1.699	-32.8	-32.6	-32.7
100	2	-46.8	-46.6	-46.2
250	2.398	-68.9	-68.9	-68.7
500	2.699	-87.3	-87.5	-87.5
1000	3	-101.4	-101.3	-101.4

Curva de calibración.



Gráfica 7. Linealidad del método con su respectiva ecuación de la recta y coeficiente de correlación.

Con los resultados obtenidos en la gráfica 7, se procedió a medir los 13 diferentes enjuagues bucales, determinando a cada uno de ellos pH y mV por duplicado, el pH se determinó antes de agregar TISAB II a cada uno de los enjuagues, así como también el color observado de cada uno de ellos. En las **Tablas 21** y **22** se observan los resultados obtenidos tanto para enjuagues bucales con alcohol y sin alcohol; donde puede concluirse que el rango de pH de los enjuagues bucales antes de agregarles TISAB II está entre 7-7.8; el enjuague bucal con menor pH medido corresponde a Oral-B Prosalud con 7.034 unidades de pH y el enjuague bucal con mayor pH medido corresponde a Dental Max con 7.755 unidades de pH. También puede observarse que al agregar TISAB II el pH disminuye en un rango de 0.2-0.8 unidades de pH en donde nuevamente vuelven hacer presencia los enjuagues bucales mencionados anteriormente y el primer enjuague bucal tuvo una disminución de 0.282 unidades de pH y el segundo tuvo una disminución de 0.727 unidades de pH. Por último de

estás tablas también puede concluirse que el color más comercial entre los enjuagues bucales es el azul y el que menos comercial entre éstos es el color rosa.

A partir de los potenciales experimentales obtenidos por duplicado en las tablas 21 y 22 y con ayuda de la curva de calibración y los cálculos pertinentes (Ver Anexo: Linealidad del método) se determinó la concentración experimental promedio para cada uno de los enjuagues bucales.

Las **Tablas 23 y 24** muestran los resultados experimentales de la $[F^-]_{exp}$, %R, el promedio de cada una de las $[F^-]_{exp}$, $[F^-]$ reportada en la etiqueta, presentación y país de procedencia de cada enjuague bucal con flúor con y sin alcohol respectivamente. En estas tablas se puede observar que el rango del %R se encuentra entre 76-114%, el rango de la $[F^-]_{exp}$ se encuentra entre 90-258 ppm.

En cuanto a la presentación de cada enjuague bucal podemos observar que la más comercial es la presentación de 250 mL, seguida de la de 500 mL y las menos comerciales son las presentaciones de 350 y 473 mL. En cuanto al contenido de flúor en cada una de las marcas es variable en un rango de 95-270 ppm siendo 225 ppm la concentración más comercial y 95 ppm la menos comercial; de los 13 enjuagues bucales más comercializados 4 son mexicanos, 3 colombianos, 3 brasileños, 2 estadounidenses y 1 venezolano.

Por último en la **Tabla 25** se muestra el promedio de la concentración de flúor cuantificada en cada una de las marcas comerciales de enjuagues bucales analizadas; en donde se realizó una comparación entre la concentración experimental promedio, la reportada en la etiqueta y la concentración mínima recomendada por la ADA (Asociación Dental Americana) evaluando con los siguientes criterios: Cumple o No Cumple. De las 13 marcas investigadas, solo Listerine Advance cumple con lo declarado en su etiqueta, pero no así con la recomendada por la ADA; y Colgate Plax Complete Care 10 en 1, Dental Max, Colgate Plax Kids y Oral-B Complete Hierbabuena sí cumplen con el contenido mínimo de flúor recomendado por la Asociación Dental Americana (ADA), pero no así con lo declarado en su etiqueta. Las 8 marcas restantes no cumplen con la concentración declarada en la etiqueta ni con la concentración recomendada por la ADA.

Tabla 21. Datos obtenidos por duplicado y color observado para enjuagues bucales con alcohol.

Con TISAB II						
Enjuagues bucales con alcohol	pH S/B	mV	pH	mV	pH	Color
<i>Listerine Advance</i>	7.442	-49.1	6.744	-51.1	6.756	verde
<i>Listerine Total Care</i>	7.387	-46	6.739	-45.9	6.735	morado
<i>Listerine Whitening</i>	7.049	-46.5	6.742	-46.7	6.745	incoloro
<i>Colgate Plax Fresh Mint</i>	7.538	-60.7	6.893	-60.3	6.89	verde
<i>Colgate Plax Complete Care 10 en 1</i>	7.689	-69.3	7.04	-69.2	7.039	azul
<i>Colgate Plax Whitening</i>	7.616	-65.3	6.997	-65.3	6.997	azul
<i>Dental Max</i>	7.755	-67.3	7.028	-67.1	7.031	azul

Tabla 22. Datos obtenidos por duplicado y color observado para enjuagues bucales sin alcohol.

Con TISAB II						
Enjuagues bucales sin alcohol	pH S/B	mV	pH	mV	pH	Color
<i>Colgate Plax Kids</i>	7.613	-70.1	7.1	-69.8	7.085	rosa
<i>Oral-B Complete Hierbabuena</i>	7.496	-68.5	6.973	-68.3	6.973	azul
<i>Oral-B Complete Menta Refrescante</i>	7.496	-66.7	6.972	-66.7	6.972	azul
<i>Oral-B Prosalud</i>	7.034	-51.1	6.756	-51.0	6.752	morado
<i>Astringosol ICE</i>	7.479	-64.9	6.986	-64.9	6.986	azul
<i>Astringosol Advance</i>	7.481	-65.1	6.99	-65.1	6.99	incoloro

Tabla 23. Resultados Experimentales obtenidos para las diferentes marcas de enjuagues bucales con alcohol, se obtuvieron los valores de concentración para cada marca de enjuague.

Enjuagues bucales con alcohol	[F] ⁻ _{exp} (ppm)		% de Contenido		Promedio de la [F] ⁻ _{exp} (ppm).	[F] ⁻ reportada en la etiqueta.	Cont. Neto (ml)	País de procedencia
	1	2	1	2				
<i>Listerine Advance</i>	104.2761	113.7134	104.2761	113.7134	108.9947	0.022% (100ppm)	500	Colombia
<i>Listerine Total Care</i>	91.1724	90.7783	91.1724	90.7783	90.9753	22.1mg (100ppm)	500	E.U.A
<i>Listerine Whitening</i>	93.1687	93.9794	93.1687	93.9794	93.5741	0.022% (100ppm)	473	E.U.A
<i>Colgate Plax Fresh Mint</i>	172.3534	169.3927	76.6015	75.2856	170.8730	0.05% (225ppm)	250	Brasil
<i>Colgate Plax Complete Care 10 en 1</i>	250.1583	249.0770	111.1814	110.7008	249.6176	0.05% (225ppm)	500	Venezuela
<i>Colgate Plax Whitening</i>	210.3592	210.3592	93.4929	93.4929	210.3592	0.05% (225ppm)	500	Brasil
<i>Dental Max</i>	229.3972	227.4183	84.9619	84.2290	228.4078	0.06%	350	México

Tabla 24. Resultados Experimentales obtenidos para las diferentes marcas de enjuagues bucales sin alcohol, se obtuvieron los valores de concentración para cada marca de enjuague.

Enjuagues bucales sin alcohol	[F ⁻] _{exp} (ppm)		% de Contenido		Promedio de la [F ⁻] _{exp} (ppm).	[F ⁻] reportada en la etiqueta.	Cont. Neto (ml)	País de procedencia
	1	2	1	2				
<i>Colgate Plax Kids</i>	258.9796	255.6357	115.1020	113.6159	257.3077	0.05% (225ppm)	250	Brasil
<i>Oral-B Complete Hierbabuena</i>	241.6374	239.5530	106.9192	105.9969	240.5952	0.05% (226ppm)	250	Colombia
<i>Oral-B Complete Menta Refrescante</i>	223.5116	223.5116	98.8989	98.8989	223.5116	0.05% (226ppm)	250	Colombia
<i>Oral-B Prosalud</i>	113.7134	113.2218	113.7134	113.2218	113.4676	0.02% (95ppm)	250	México
<i>Astringosol ICE</i>	206.7455	206.7455	91.8869	91.8869	206.7455	0.05% (225ppm)	300	México
<i>Astringosol Advance</i>	208.5445	208.5445	92.6864	92.6864	208.5445	0.05% (225ppm)	300	México

Tabla 25. Comparación entre la concentración experimental promedio, la reportada en la etiqueta y la mínima recomendada por la ADA.

Marca de enjuague bucal	Promedio de la [F ⁻] _{exp} (ppm).	Desviación estándar	[F ⁻] reportada en la etiqueta.	Cumple la [F ⁻]	
				Etiqueta	ADA (225ppm)
<i>Listerine Advance</i>	108.9947	±6.6731	0.022% (100ppm)	Cumple	No Cumple
<i>Listerine Total Care</i>	90.9753	±0.2786	22.1mg (100ppm)	No Cumple	No Cumple
<i>Listerine Whitening</i>	93.5741	±0.5732	0.022% (100ppm)	No Cumple	No Cumple
<i>Colgate Plax Fresh Mint</i>	170.8730	±2.0935	0.05% (225ppm)	No Cumple	No Cumple
<i>Colgate Plax Complete Care 10 en 1</i>	249.6176	±0.7646	0.05% (225ppm)	No Cumple	Cumple

VALIDACIÓN DE UN ELECTRODO SELECTIVO A IONES FLUORURO Y SU APLICACIÓN EN LA CUANTIFICACIÓN DE ESTA ESPECIE EN MUESTRAS REALES.

Colgate Plax Whitening	210.3592	0	0.05% (225ppm)	No Cumple	No Cumple
Dental Max	228.4078	±1.3992	0.6% (270ppm)	No Cumple	Cumple
Colgate Plax Kids	257.3077	±1.1822	0.05% (225ppm)	No Cumple	Cumple
Oral-B Complete Hierbabuena	240.5952	±0.7369	0.05% (226ppm)	No Cumple	Cumple
Oral-B Complete Menta Refrescante	223.5116	0	0.05% (226ppm)	No Cumple	No Cumple
Oral-B Prosalud	113.4676	±0.1737	0.02% (95ppm)	No Cumple	No Cumple
Astringosol ICE	206.7455	0	0.05% (225ppm)	No Cumple	No Cumple
Astringosol Advance	208.5445	0	0.05% (225ppm)	No Cumple	No Cumple
Oral-B Complete Menta Refrescante	223.5116	0	0.05% (226ppm)	No Cumple	No Cumple
Oral-B Prosalud	113.4676	±0.1737	0.02% (95ppm)	No Cumple	No Cumple
Astringosol ICE	206.7455	0	0.05% (225ppm)	No Cumple	No Cumple
Astringosol Advance	208.5445	0	0.05% (225ppm)	No Cumple	No Cumple

6. CONCLUSIONES.

- Se logró desarrollar y validar el método potenciométrico para el ISE de fluoruros, el cual cumple satisfactoriamente con los parámetros de Linealidad, LD, LC, Precisión, Exactitud y Sensibilidad.
- Se llevó a cabo satisfactoriamente la aplicación del método validado en la determinación y cuantificación del ion fluoruro en enjuagues bucales.
- De las 13 marcas de enjuagues bucales analizadas se encontró que solo una cumple con la concentración declarada en su etiqueta (Listerine Advance), pero no así con la recomendada por la Asociación Dental Americana (ADA).
- De las 13 marcas de enjuagues bucales analizadas se encontró que solo cuatro marcas (Colgate Plax Complete Care 10 en 1, Dental Max, Colgate Plax Kids y Oral-B Complete Hierbabuena) cumplen con la concentración recomendada por la Asociación Dental Americana ADA).
- De las 13 marcas de enjuagues bucales cuatro son mexicanas y ninguna cumple con la concentración especificada en su etiqueta, tres marcas (Dental Max, Astringosol ICE y Astringosol Advance) están por debajo de su concentración indicada en un rango de concentración de 16-41ppm siendo Dental Max la marca que tiene una concentración mayor por debajo de la indicada (40.193ppm). Solo una marca (Oral-B Prosalud) está por encima de la concentración especificada en su etiqueta con 18.2939ppm.
- Con los resultados obtenidos y debido a que solo una marca cumple con la concentración especificada en su etiqueta, y de las marcas mexicanas ninguna cumple es necesario volver a implementar el **PROYECTO de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-219-SSA1-2002, Límites máximos de concentración de fluoruros en productos higiénico-odontológicos e insumos de uso odontológicos fluorados** la cual fue cancelada, y dar un seguimiento más estricto a estos productos de higiene personal.

7. BIBLIOGRAFÍA.

- ADA (American Dental Association). (2009). Fluoruro y Fluoración. Recuperado de <http://www.ada.org/public/espanol/topics/fluoride.asp>
- ADA. (Asociación Dental Americana). (2009). Un propósito de año nuevo: cuidar de su salud oral. Consultado el 15 de Septiembre del 2009. Recuperado de http://www.colgate.com.do/app/Colgate/DO/OC/Information/ADA/Article_2008_12_AnoNuevo.cvsp
- American Dental Association Council on Scientific Affairs. Professionally applied topical fluoride.
- American Dental Association (ADA). *Terapeutica dental*. 2^º Ed. Barcelona: Editorial Masson SA. 1995: 231-238.
- AOAC INTERNATIONAL. *Official Methods of Analysis*, 18th Edition. United States of America, 2006.
- Arellano R, Dávila L, Domínguez N, Flores V y Ortiz D. (2009). Recuperado de http://odontologia.iztacala.unam.mx/instrum_y_lab1/otros/ColoquioXVIII/contenido/oral/1307/INFORME_FINAL_Coloquio%20Final%20al%20fin.doc; Eficacia de las diferentes marcas comerciales de Pastas dentales "In Vitro". (Consultado 2012, 07,20).
- Association of Official Analytical Chemists. AOAC 939.11: *Fluoride in water, colorimetric method*. AOAC; 1995.)
- ATSDR (2003). Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological Profile for Fluorides, Hydrogen Fluoride, and Fluorine. U.S. Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA.
- Ayoob, S., & Gupta, A. K. (2006). Fluoride in drinking water: A review on the status and stress effects. *Crit Rev Environ Sci Technol*, 36(6), 433-487.
- Backer, E.; Buhman, P., y Pretsch, E. (1998). Carrier-based ion-selective electrodes and bulk optodes. 1. General characteristics. *Chemical Reviews*, 97(8), 3083.
- Barquero, E.J. (2001). *Disseny, construcció i avaluació d'analitzadors automàtics per a la monitorització mediambiental*. Tesis Doctoral, Bellaterra.
- Beckman, A.O. (1987). *Hexagon*, 78, 41.

- Bergveld, P. (1970). Development of an ion-sensitive solid-state device for neurophysiological measurements. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering, BM17* (1), 70.
- Bratovčić, A., Odošašić, A., & Čatić, S. (2009). The advantages of the use of ionselective potentiometry in relation to UV/VIS Spectroscopy (Conference Paper). *Agriculturae Conspectus Scientificus* 74(3), 139-142.
- Buldini, P. L., Cavalli, S., & Trifiro, A. (1997). State-of-the-art ion chromatographic determination of inorganic ions in food. *J Chromatogr A*, 789(1-2), 529-548.
- Castro, Velásquez Jaime Andrés. Elaboración e Implementación del Procedimiento de Validación de Métodos de Análisis Físicoquímicos utilizados en el Laboratorio Central de Postobón S.A. Universidad de Antioquia, 2008.
- Cheng, K.L. (1989). pH glass electrode and its mechanism. In *Electrochemistry, Past and Present, American Chemical Society Symposium Series, 390*, 286-302.
- Chinoy NJ. Effects of fluoride on physiology of some animals and human beings. *Indian J Environ Toxicol* 1991;1:17-32.
- Chung Chow Chan, Herman Lam, Y. C. Lee, Xue-Ming Zhang. Analytical Method Validation and Instrument Performance Verification. New Jersey. John Wiley & Sons, Inc., 2004.
- Clark, LC., y Lyons, C.(1962). Electrode systems continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Annals Of The New York Academy Of Sciences*, 102, 29.
- Colín, R., J.; Cruz D.; Sánchez, I. O.; Vázquez, I.(2006). *La lactancia materna como factor de prevención de caries*. Recuperado de http://odontologia.iztacala.unam.mx/instrum_y_lab1/otros/ColoquioXVI/contenido/indice_oral_archivos/TRAB%20COMPL%20COLOQ%20ORAL/HTML/1301L.htm.
- Cremer, M. (1906). *Z. Biol*, 47,562.
- CRISON, *Electrodos ion selectivos. Catalogo de laboratorio 2004, 1ª Edición*.
- Cronin, S. J., Manoharan, V., Hedley, M. J., & Loganathan, P. (2000). Fluoride: A review of its fate, bioavailability, and risks of fluorosis in grazed-pasture systems in New Zealand. *N Z J Agric Res*, 43(3), 295-321.
- Crutzen, P. J. (2006). Introduction to "Fluorine and the Environment". In T. Alain (Ed.), *Adv Fluorine Sci*, vol. Volume 1 (pp. xv-xvii): Elsevier.
- D'Alessandro, W. (2006). Human fluorosis related to volcanic activity: A review. *WIT Trans Biomed Health*, 10, 21-30.

- Dharmagunawardhane, H A, Dissanayake, C B. (1993). Fluoride problems in Sri Lanka. *Environmental Management and Health*. Bradford. 4(2):9-8.
- Díaz-Barriga F. Análisis de la contaminación por compuestos tóxicos en el acuífero que abastece a la ciudad de San Luis Potosí. Querétaro, México: Sistema de Investigación Miguel Hidalgo, Cuaderno de Trabajo, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología; 2000.
- Díaz-Barriga, F., Navarro-Quezada, A., Grijalva, M., Grimaldo, M., Loyola-Rodríguez, J. P., y Ortiz M.D. (1997). Endemic fluorosis in Mexico. *Fluoride*, 30(4), 233-239.
- ediciones; 1998.p. 2237-47.
- EFSA (2005). European food safety authority. Opinion of the Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies on a request from the Commission related to the Tolerable Upper Intake Level of Fluoride. *The EFSA Journal* 192, 1-65.
- EFSA (2008). European food safety authority. Sodium monofluorophosphate as a source of fluoride added for nutritional purposes to food supplements. *The EFSA Journal*, 886, 1-18.
- EFSA (2010). European food safety authority. Statement of EFSA on the posible risks for public and animal health from the contamination of the feed and food chain due to possible ash-fall following the eruption of the Eyjafjallajökull volcano in Iceland – urgent advice. *The EFSA Journal* 8(4):1593.
- Eisenman, G., y Rudin, DO.; Casby, JU. (1957). Glass electrode for measuring sodium ion. *Science*, 126, 831-834.
- Elder, L. W.; Wright, W. H. (1928). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 14, 938.
- EURACHEM. (1998). The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, 1th Edition. United Kingdom. Recuperado de <http://www.eurachem.org/guides/mval.htm>
- FISCHBACH R., "Metrological Demands of ISO 17025 on Testing Laboratories". Accred Qual Assur (2001) 6:41. Germany
- Frant, MS., y Ross, JW. (1966). Electrode for sensing fluoride ion activity in solution. *Science*, 154, 1553.
- Gómez Ordoñez, E., Alonso, E., & Ruperez, P. (2010). A simple ion chromatography method for inorganic anion analysis in edible seaweeds. *Talanta*, 82(4), 1313-1317.
- Gómez, S. G., S. D. Gómez, D. M. Martín. 2002. Flúor y fluorosis dental. Santa Cruz de Tenerife, España.
- González A, Casado A, Fernández A. Flúor. En: Tratado de Odontología. Madrid: Trigo

- González Sanz A. 1999. Bases para el uso racional del flúor en la prevención y tratamiento de caries en pediatría. *Revista Pediatría de Atención Primaria*. I(2).
- Goodman Gilman A, 2003 “Las bases farmacológica de la terapéutica” decima edición. México, editorial Mc Graw Hill Interamericana, volumen II. Pág. 104-106.
- Grandjean, P., & Thomsen, G. (1983). Reversibility of skeletal fluorosis. *Br J Ind Med*, 40(4), 456-461.
- *Guía de Validación de Métodos Analíticos*. (2002). Ed. Colegio Nacional de químicos Farmacéuticos Biólogos.
- HACH. Water Analysis Handbook, 4th Edition. HACH, 2002. U.S.A.
- Harned, H., y Robert G. (1955). The activity coefficient of hydrochloric acid in concentrated aqueous higer Valence type chloride. *Journal of the American Chemical Society*, 77, 4393-4397.
- Harris, D. C. Análisis Químico Cuantitativo. 2da edición. Ed. Iberoamérica Reverté. México, 1992. Pág. 377-379
- Hedman, J., Sjöman R, Sjöström I, Twetman S. (2006). Fluoride concentration in saliva after consumption of a dinner meal prepared with fluoridated salt. *Caries res*. 40(2):158-62
- Herazo, A. B. (1994). *Crema dentales*. Bogota, Ediciones ECOE 1ª Edición.
- Higashida, B. (2001). *Odontología Preventiva*. México D.F. Ed. Mc Graw-Hill.
- Huerta Vega L. (1997) . Prevalencia de fluorosis dental y su relación con la prevalencia de caries dental en niños de la escuela “General Enrique Estrada” Zacatecas, Zac. Tesis para la Especialidad de Odontopediatría/UAO. Universidad Autónoma de Zacatecas.
- ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. 2005. Recuperado de <http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf>
- ICH, International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, (2005). HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE “Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)”, Unión Europea, Japon y Estados Unidos.
- IPCS (1984). International Programme on Chemical Safety. Fluorine and fluorides. Environmental Health Criteria 36. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 133 pp. ISBN 92 4 154096 6.
- Isildak, O. (2009). Determination of inorganic anions in mushrooms by ion chromatography with potentiometric detection. *J Anal Chem*, 64(12), 1242- 1246.
- ISO 11843-1:1997. Capability of detection – Part 1 Terms and definitions.

- J. M. Green, *A practical guide to analytical method validation*, Anal. Chem. News & Features, 1 May 1996, pp. 305A-309A.
- Jackson, P. E., Thomas, D. H., Donovan, B., Pohl, C. A., & Kiser, R. E. (2001). New block-grafted anion exchanger for environmental water analysis by ion chromatography. *J Chromatogr A*, 920(1-2), 51-60.
- Janata, J. (1994). 20 years of ion-selective field-effect transistors. *Analyst*, 119, 2275-2278.
- Katz L, McDonal R, y Stookey G, (1975). *Odontología preventiva en acción*. Buenos Aires: Editorial Panamericana.
- Katz, S., Mc Donald, JL., y Stookey, GK. (1982). *Odontología Preventiva en Acción*. 3ª Edición. Buenos Aires, Ed. Médica Panamericana.
- LEWIS. (1986). Bases biológicas de la caries dental. Salvat Editores. Recuperado de http://www.frbb.utn.edu.ar/frbb/images/stories/frbb/materias/ingenieria_sanitaria/ENOHSa_Remocion_Fluor.pdf
- López-Ruiz, B. (2000). Advances in the determination of inorganic anions by ion chromatography. *J Chromatogr A*, 881(1-2), 607-627.
- Louis, D., Wilkes, A. J., & Talbot, J. M. (1996). Optimisation of total fluoride analysis by capillary gas chromatography. Part I: Silica based dental creams. *Pharm Acta Helv*, 71(4), 273-277.
- Loyola-Rodríguez, J.P., Pozos-Guillén, A. y Hernández-Guerrero, J.C. (1988). *Bebidas embotelladas como fuentes adicionales de exposición a flúor*. Salud pública. 40(5).
- Lozano C., L. (1998). *Validación de métodos cromatográficos*. Tesis publicada de químico farmacéutico biólogo, Universidad Nacional Autónoma de México, D.F, México.
- Martín Delgado, M.M., Hardisson de la Torre, A., Alvarez Marante, R. (1992). Concentration of fluoride in beers and soft drinks consumed in the Autonomous Community of the Canary Islands, Spain. *J Food Comp Anal* 5, 172-180.
- Masten, S. (2001). Toxicological summary for sodium hexafluorosilicate [16893-85-9] and fluorosilicic acid [16961-83-4]: USA National Toxicology Program.
- Montes Bayón, M., Rodríguez Garcia, A., García Alonso, J.I., & Sanz-Medel, A.(1999). Indirect determination of trace amounts of fluoride in natural waters by ion chromatography: A comparison of on-line post-column fluorimetry and ICP-MS detectors. *Analyst* 124(1), 27-31
- Moody, GJ.;Oke, RB. y Thomas, JDR. (1970). Calcium-sensitive electrode based on a liquid ion exchanger in a poly(vinyl-chloride) matrix. *Analyst*, 95, 910.
- Nernst, U. Ber, Deutsch. (1897). *Chem. Ges*, Vol. 30, p.1547.

- Nernst, W.; Loeb, K; *Z. Phys. Chem.* (1888), 2, 948-963.
- NIKIFORUK G. (1985). Understanding dental caries, vol 2, Prevention, basic and clinical aspects. Editorial Karger. New York. Pp. 113 – 128.
- NMX-AA-077-SCFI-2001. Análisis de aguas –determinación de fluoruros en aguas naturales, residuales y residuales tratadas.
- Nomenclature in evaluation of analytical methods, including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995). *Pure & appl. Chem.*, 1995, **67**, 1699-1723.
- Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994. Salud Ambiental, agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización. 1996. Secretaría de Salud. Diario Oficial de la Federación. Pp. 41-50
- OMS (1994). *Los fluoruros y la Salud Bucodental*. Informe técnico n° 86, Ginebra.
- OMS. (Organización Mundial de la Salud). 1986. “El uso correcto de fluoruros en salud publica”. Edición de J. J. Murray, Ginebra. Pág. 64-86.
- OMS. El uso correcto de Fluoruros en Salud Pública. Ginebra 1986.
- Organización Mundial de la Salud. Metodología y programa de prevención de las enfermedades buco-dentales. Serie de Informes Técnicos Número 173. OMS; 1984.
- Ozsvath, D. L. (2009). Fluoride and environmental health: A review. *Rev Environ Sci Biotechnol*, 8(1), 59-79.
- Profeco (Procuraduría Federal del Consumidor). (2008). Enjuagues bucales. México D.F. Consultado 16 de Agosto del 2012. Recuperado de www.profeco.gob.mx.
- Proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-219-SSAI-2002, (2002). *Límites máximos de concentración de fluoruros en productos higiénico-odontológicos e insumos de uso odontológico fluorados*. Recuperado de <http://www.economia.gob.mx/work/normas/noms/kpronoman/p142semarnat.pdf>;
- Pungor, E. (1998). The theory of ion selective electrodes. *Analytical Science*, 14, 249-256.
- Pungor, E., y Tóth, K. (1970). Ion- selective membrane electrodes- a review. *Analyst*, 95, 625.
- *Pure & appl. Chem.* (1994), Vol. 66, No. 12, pp. 2527-2536.
- *Radiometer Annual Report 1994/1995*; Copenhagen.
- Rao, Nagendra, .R. “Fluoride and Environment a Review” in Martin J. Bunch, V. Madha Suresh and T. Vasantha Kumaran, eds., *Proceedings of the Third International Conference on Environment and Health*, Chennai, India, 15-17 December, 2003. Chennai: Department of

Geography, University of Madras and Faculty on Environmental Studies, York University. Pp. 386-399.

- *Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Methods CDER.* (1994) CMC3.
- RIVAS GUTIÉRREZ, J; Huerta Vega L. 2005. Fluorosis dental metabolismo, distribución y absorción del fluoruro. *Revista ADM*; LXII(6):225-229 MG.
- Rivera, S. (2001). *Rev. Chll. Pediatr.* 64 (4); 278-283.
- Ross, JW. (1967). Calcium-selective electrode with liquid ion exchanger. *Science*, 156, 1378.
- Ruzicka, J., (1997). The seventies-Golden age for ion selective electrodes. *Journal of Chemical Education*, 74(2), 167-170.
- SECOFI (2001). Norma Mexicana NMX-AA-077-SCFI-2001. Análisis de Aguas. Determinación de fluoruros en aguas naturales, residuales y residuales tratadas. Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. Diario Oficial de la Federación. 13 de Agosto 2001.
- Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. Norma Oficial Mexicana NOM F-8-1988. Alimentos, Sal Yodada y Sal Fluorurada. SECOFI; 1988.
- Secretaría de Salud. MODIFICACION a la Norma Oficial Mexicana NOM-013-SSA2-1994, Para la prevención y control de enfermedades bucales, publicada el 6 de enero de 1995. SSA México; 1999.
- Secretaría de Salud. Norma Oficial Mexicana NOM- 040-SSA1-1993, Bienes y Servicios. Sal Yodada y Sal Yodada Fluorurada. Especificaciones Sanitarias. SSA México; 1995.
- Secretaría de Salud. Norma Oficial Mexicana NOM-013-SSA2-1994, Para la prevención y control de enfermedades bucales. SSA México; 1995.
- Secretaría de Salud. Programa Nacional de Salud 2001- 2006. SSA México; 2001. p. 97.
- Secretaría de Salud. Subsecretaría de Prevención y control de enfermedades. Programa de Salud Bucal. SSA México; 2000.
- Secretaría de Salud. Subsecretaría de Servicios de Salud. Dirección General de Fomento de la Salud. Modelo de Salud Bucal para Escolares. SSA México; 1990.
- SSA (2000). Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994. Salud Ambiental. Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización. Secretaría de Salud. Diario Oficial de la Federación. 22 de Noviembre de 2000.
- SSA (2002). Norma Oficial Mexicana NOM-201-SSA1-2002. Productos y Servicios. Agua y hielo para consumo humano, envasados y a granel. Especificaciones sanitarias. Secretaría de Salud. Diario Oficial de la Federación. 18 de Octubre 2002

- Standard Methods, Method 1060-C., 1998. Sample storage and preservation. Standard methods for the examination of water and wastewater, 20th Edition. Washington, DC. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation.
- Standard Methods, Method 4500-C., 1998. Ion-Selective Electrode Method. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th Edition. Washington, DC. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation.
- Stefanac, Z., y Simon, W. (1967). Ion specific electrochemical behavior of macrotetrolides in membranes. *Microchemical Journal*, 12, 125.
- Strunecká, A., Patočka, J., & Connett, P. (2004). Fluorine in medicine. *J Appl Biomed*, 2(3), 141-150.
- Takatsu, A., Chiba, K., Ozaki, M., Fuwa, K., & Haraguchi, H. (1984). Direct determination of trace fluorine in milk by aluminum monofluoride molecular absorption spectrometry utilizing an electrothermal graphite furnace. *Spectrochim Acta Part B At Spectrosc*, 39(2-3), 365-370.
- Taves, D. R. (1983). Dietary intake of fluoride ashed (total fluoride) v. unashed (inorganic fluoride) analysis of individual foods. *Br J Nutr*, 49(3), 295-301.
- U.S. EPA (2010). United States Environmental Protection Agency. Fluoride. Exposure and relative source contribution analysis. Health and ecological criteria division office of water. December 2010.
- USP 31–NF 26, Capítulo General <1225> Validación de métodos farmacopéicos. (2008).
- Usydus, Z., Szlinder-Richert, J., Polak-Juszczak, L., Kandarska, J., Adamczyk, M., Malesa-Cieciewicz, M., & Ruczynska, W. (2008). Food of marine origin: Between benefits and potential risks. Part I. Canned fish on the Polish market. *Food Chem*, 111(3), 556-563.
- Usydus, Z., Szlinder-Richert, J., Polak-Juszczak, L., Komar, K., Adamczyk, M., Malesa-Cieciewicz, M., & Ruczynska, W. (2009). Fish products available in Polish market-assessment of the nutritive value and human exposure to dioxins and other contaminants. *Chemosphere*, 74(11), 1420-1428.
- Whitford, G. M., Pashley, D. H., & Stringer, G. I. (1976). Fluoride renal clearance: a pH dependent event. *Am J Physiol*, 230(2), 527-532.

- Yao, J., Yan, W., Xu, Y., y Han, S. (1999). Activity coefficients for NaCl in MeOH + H₂O by electromotive force measurements at 308.15 K and 318.15 K. *J. Chem. Eng. Data*, 44, 497-500.
- Yi, J., & Cao, J. (2008). Tea and fluorosis. *J Fluor Chem*, 129(2), 76-81.
- Yiping, H., & Caiyun, W. (2010). Ion chromatography for rapid and sensitive determination of fluoride in milk after headspace single-drop microextraction with in situ generation of volatile hydrogen fluoride. *Anal Chim Acta*, 661(2), 161-166.

8. ANEXOS.

8.1. Linealidad del Sistema.

Fórmulas para Linealidad del Sistema (Guía de Validación de Métodos Analíticos, 2002).

Pendiente.

$$b_1 = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

n= número de mediciones (concentración - respuesta analítica).

Ordenada al origen.

$$b_0 = \frac{\sum y - b_1 \sum x}{n}$$

Coefficiente de determinación.

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

Intervalo de confianza para la pendiente.

Donde:

$$IC(\beta_1) = b_1 \pm t_{0.975, n-2} S_{b_1}$$

$\sum x$ =Sumatoria de las respuestas medidas de Log[F⁻].

$$(t_{0.975, (8-2=6)} = 2.447)$$

$\sum y$: Sumatoria de las respuestas medidas de E (mV).

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

$\sum x^2$: Suma de cuadrados de las respuestas medidas de Log[F⁻].

$\sum y^2$: Suma de cuadrados de las respuestas medidas de E (mV).

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - b_1 \sum xy - b_0 \sum y}{n - 2}}$$

$\sum xy$: Sumatoria de los productos entre Log[F⁻] y E(mV).

S_{b_1} : Desviación estándar de la pendiente.

$S_{y/x}$ = Desviación estándar.

Tabla A1. ANOVA para Linealidad del Sistema.

Análisis de varianza con falta de ajuste					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	Estadístico F	Valor P
Modelo	115241	1	115241	55874.33	0.0
Residual	132.001	64	2.06251		
Falta de Ajuste	127.174	20	6.35869	57.97	0.0
Error Puro	54.82667	44	0.109697		
Total (Corr.)	115273	65			

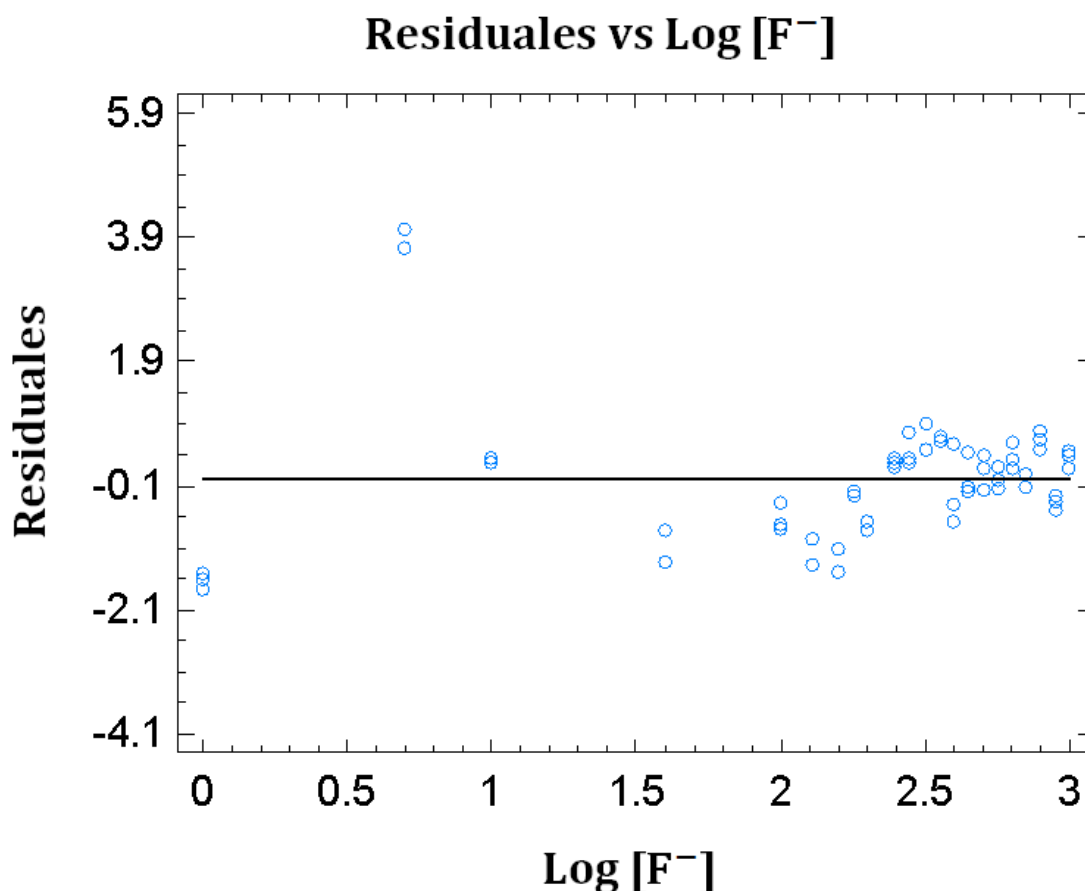


Fig. A1. Gráfica de Residuales contra Log [F⁻] para linealidad.

8.2. Exactitud del Método.

Fórmulas para Linealidad del Sistema (Guía de Validación de Métodos Analíticos, 2002).

Media aritmética

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

Desviación estándar

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

Coefficiente de variación

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

Intervalo de confianza para la media poblacional

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

n = numero de recobros.

8.3. Linealidad del Método.

Fórmulas para Linealidad del Sistema (Guía de Validación de Métodos Analíticos, 2002).

Cantidad adicionada vs Cantidad recuperada.

Pendiente.

$$b_1 = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

n= número de mediciones (cantidad adicionada – cantidad recuperada).

Ordenada al origen.

$$b_0 = \frac{\sum y - b_1 \sum x}{n}$$

Coefficiente de determinación.

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

Intervalo de confianza para la pendiente.

$$IC(\beta_1) = b_1 \pm t_{0.975, n-2} S_{b_1}$$

$$(t_{0.975, (30-2=28)} = 2.048)$$

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

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - b_1 \sum xy - b_0 \sum y}{n - 2}}$$

Donde:

$\sum x$ =Sumatoria de las respuestas medidas de Log[F⁻].

$\sum y$: Sumatoria de las respuestas medidas de E (mV).

$\sum x^2$: Suma de cuadrados de las respuestas medidas de Log[F⁻].

$\sum y^2$: Suma de cuadrados de las respuestas medidas de E (mV).

$\sum xy$: Sumatoria de los productos entre Log[F⁻] y E(mV).

S_{b_1} : Desviación estándar de la pendiente.

$S_{y/x}$ = Desviación estándar.

Intervalo de confianza para la ordenada al origen.

$$IC(\beta_1) = b_1 \pm t_{0.975, n-2} S_{b_1}$$

$$(t_{0.975, (30-2)=28}) = 2.048$$

$$S_{b_0} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(x)^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

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

Coefficiente de Variación de regresión.

$$CV_{y/x} = \frac{S_{y/x}}{\bar{y}}$$

Porcentaje de recobro.

Media aritmética.

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

Desviación estándar.

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

Coefficiente de Variación de regresión.

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

Donde:

$\sum x$ = Sumatoria de las respuestas medidas de Log[F].

$\sum x^2$: Suma de cuadrados de las respuestas medidas de Log[F].

S_{b_0} : Desviación estándar de la ordenada al origen..

$S_{y/x}$ = Desviación estándar.

n: número total de mediciones realizadas.

\bar{x} = Media de las respuestas medidas de Log[F].

\bar{y} = Media de las respuestas medidas de E (mV).

Tabla A2. ANOVA para Linealidad del Método.

Análisis de varianza con falta de ajuste					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	Estadístico F	Valor P
Modelo	80303.2	1	80303.2	11956.99	0.0
Residual	188.048	28	6.71601		
Falta de Ajuste	187.675	8	23.4594	1256.75	0.0
Error Puro	0.373333	20	0.0186667		
Total (Corr.)	80491.3	29			

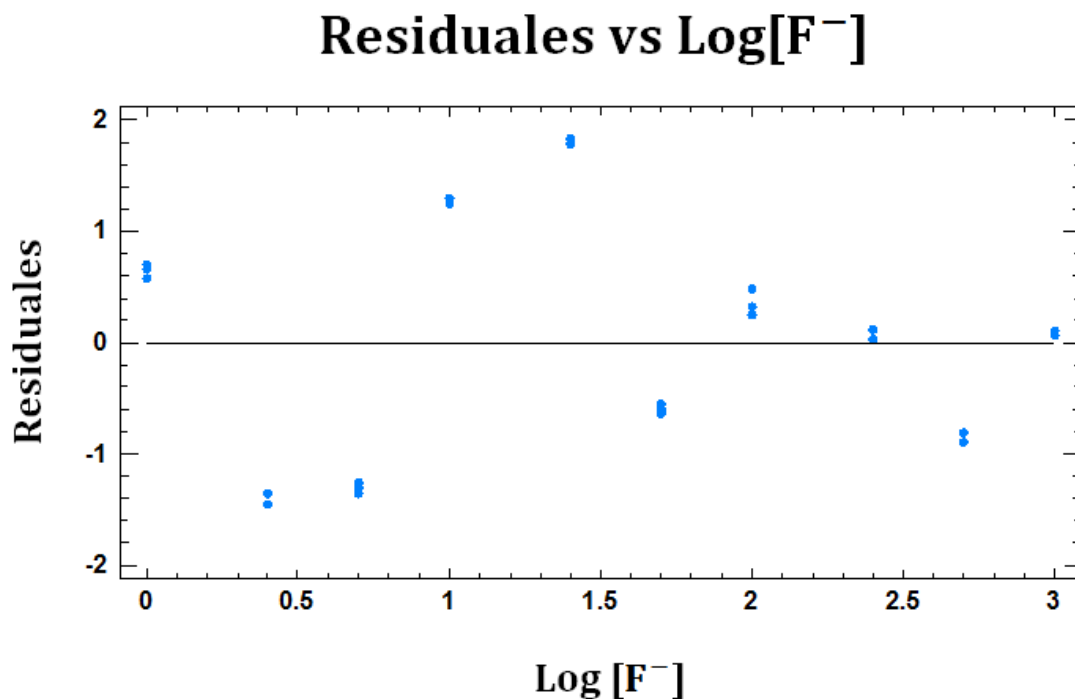


Fig. A2. Gráfica de Residuales contra Log [F⁻] para linealidad del método.

Residuales vs Cantidad adicionada

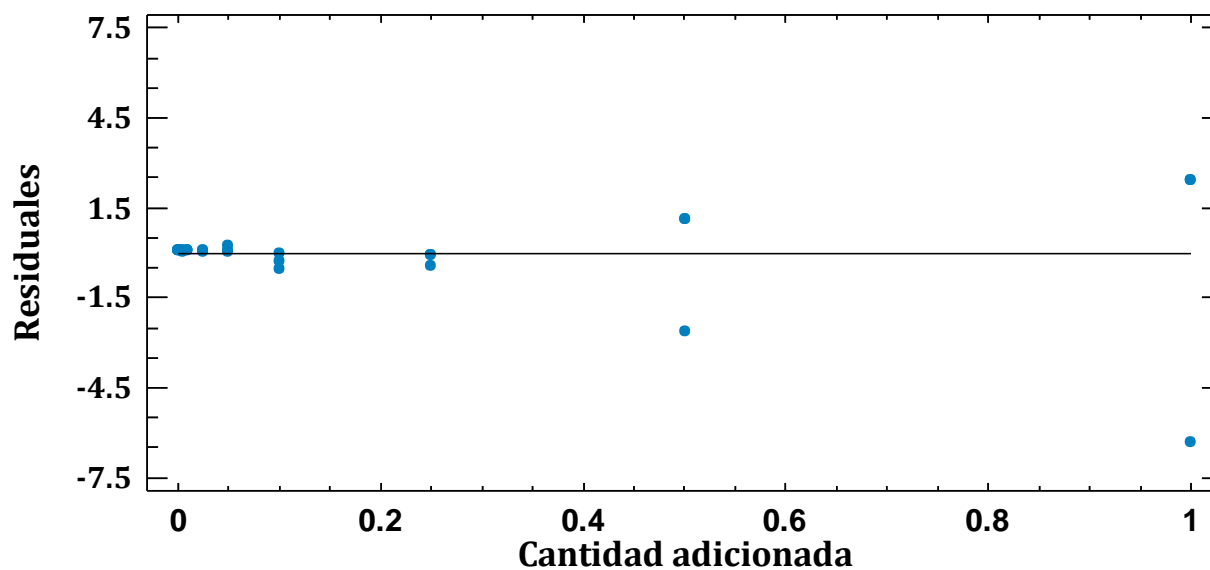


Fig. A3. Gráfica de Residuales contra cantidad adicionada.

8.4. Límite de Detección (LD).

Fórmulas de cálculo para LD (Guía de Validación de Métodos Analíticos, 2002).

$$LD = \frac{3.3 \times S_{y/x}}{b_1}$$

Los valores a utilizar son; $S_{y/x}$ (desviación estándar) y b_1 (pendiente) los mismos que ya se calcularon en linealidad del método.

$$S_{y/x} = 0.496451$$

8.5. Límite de Cuantificación (LC).

Fórmulas de cálculo para LC (Guía de Validación de Métodos Analíticos, 2002).

$$LC = \frac{10 \times S_{y/x}}{b_1}$$

Los valores a utilizar son; $S_{y/x}$ (desviación estándar) y b_1 (pendiente) los mismos que ya se calcularon en linealidad.

$$S_{y/x} = 0.496451$$

8.6. Precisión.

Fórmulas de cálculo para Precisión Intermedia (Guía de Validación de Métodos Analíticos, 2002).

Media aritmética.

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

Donde:

\bar{y} : Media aritmética de los resultados.

Desviación estándar.

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

$\sum y$: Sumatoria de las respuestas medidas.

$\sum y^2$: Suma de cuadrados de las respuestas medidas.

s: desviación estándar.

Coefficiente de variación.

$$CV = \frac{s}{\bar{y}} \times 100$$

CV: Coeficiente de Variación.

n: número total de mediciones realizadas.

8.7. Sensibilidad.

Fórmulas de cálculo para Precisión Intermedia (Guía de Validación de Métodos Analíticos, 2002).

Pendiente

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

Ordenada al origen

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

Coefficiente de determinación

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

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

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

$$(t_{0.975, (4-2)=2} = 2.447)$$

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

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - m \sum xy - b \sum y}{n-2}}$$

8.8. Robustez.

Fórmulas de cálculo para Precisión Intermedia (Guía de Validación de Métodos Analíticos, 2002).

Media aritmética de la condición normal de operación.

$$\bar{y}_0 = \frac{\sum y_0}{n_0}$$

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

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

$$\bar{y}_1 = \frac{\sum y_1}{n_1}$$

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

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

$$|d_i| = |\bar{y}_1 - \bar{y}_0|$$



Reagecon

Certificate of Analysis

Ion Selective Electrode Standards

Fluoride 1000ppm

Product No:	51344775
Lot No:	ISEF513A1
Expiry date:	28/01/2015

Mean measured value :	1002 ppm
Date of measurement:	31/01/2013

Specification:
995 - 1005 ppm

Method:
Standardised in accordance with an in-house method TPISE.

Traceability:
This standard is directly traceable to standard Reference Material of National Institute of Standards and Technology (USA), 2203, Potassium Fluoride.

Reference:
Vogels Textbook of quantitative Inorganic Analysis. Fifth Edition. Longman London and New York

Products are manufactured under an NSAI registered I.S EN ISO9001:2008 Quality System, registration no: 19.2769

Date of issue of the certificate: 31/01/2013

Derdre Madigan

QC Technician **Derdre Madigan**

Complementary information relative to this product is available at www.reagecon.com
Page 1 of 1. This Certificate must not be reproduced except in full. Rev-13A6

Reagecon Diagnostics Ltd.
Shannon Free Zone, Shannon, Co. Clare, Ireland.
Tel +353 61 472622, Fax: +353 61 472642
Email: sales@reagecon.ie, www.reagecon.com