

14.
Lej



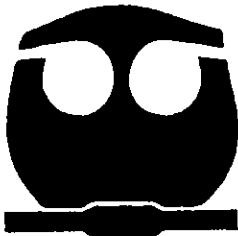
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

VALIDACION DE UN METODO
ESPECTROFOTOMETRICO DE UV/VIS PARA
DETERMINAR ACIDO BENZOICO EN BEBIDAS
DE FRUTAS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA DE ALIMENTOS
P R E S E N T A
VALENTINA DONAJI GONZALEZ MARTINEZ



MEXICO, D. F.,

1999

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

276116



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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


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

Jurado asignado según el tema:

Presidente Prof. Hugo Rubén Carreño Ortiz.
Vocal Profa. María de Lourdes Gómez Ríos.
Secretario Profa. Lilia Mercedes Palacios Lazcano.
1er. Suplente Profa. Ruth Villaseñor Gutiérrez.
2º Suplente Profa. Bertha Julieta Sandoval Guillén.

Sitio donde se desarrolló el tema:

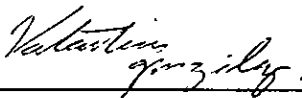
Laboratorio 4ª de la Facultad de Química
Universidad Nacional Autónoma de México.



Ing. Lilia Palacios Lazcano
Asesor del tema



QFB. Agustín Reyo Herrera
Supervisor técnico



Valentina Donají González Martínez
Sustentante

DEDICATORIA

Con todo mi amor y agradecimiento a mis padres Raymundo y Nancy por todo el amor y el apoyo.

A mi hermana Citlalic por su guía y comprensión.

A mi querido hermano Raymundo, por los momentos compartidos.

A mi abuelo José de quien nunca me olvido.

A mi abuela Esther por enseñarme a ser mas humana.

AGRADECIMIENTOS

- ◆ A Dios.
- ◆ A mis tías Juanita, Licha, Yoli y Lupe.
- ◆ A mis padrinos Homero y Rosy.
- ◆ A Tania y Ety Kupferman.
- ◆ A Lilia Palacios.
- ◆ A Agustín Reyó.
- ◆ A Don Arturo.
- ◆ A mi familia entera.
- ◆ A todos mis amigos y amigas de generación.
- ◆ A mis entrañables amigos.
- ◆ Al Instituto Nacional de Nutrición "Salvador Zubirán" .
- ◆ A el Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química.
- ◆ A mi querida Universidad Nacional Autónoma de México.

TESIS: VALIDACION DE UN METODO ESPECTROFOTOMETRICO DE UV/VIS PARA DETERMINAR ACIDO BENZOICO EN BEBIDAS DE FRUTAS.

INDICE

RESUMEN

OBJETIVOS

INTRODUCCION

GENERALIDADES

CAPÍTULO 1 GENERALIDADES DEL ÁCIDO BENZOICO.

1.1 Conservadores para bebidas

1.1.1 Importancia del pH en la acción de los conservadores.

1.2 Benzoatos (benzoato de sodio, benzoato de potasio)

1.2.1 Historia

1.2.2 Mecanismo de acción.

1.2.3 Fabricación.

1.2.4 Niveles de uso

1.2.5 Métodos de uso.

1.2.6 Aplicaciones.

1.2.7 Normatividad.

CAPITULO 2 GENERALIDADES DE ESPECTROFOTOMETRIA UVVIS.

2.1 Fundamentos

2.1.1 Espectro electromagnético.

2.1.2 Origen del espectro de absorción.

2.1.3 Análisis cualitativo.

2.1.4 Análisis cuantitativo y Ley de Lambert-Beer.

2.2 Instrumentación.

2.3 Manejo de muestras para la técnica ultravioleta visible.

2.3.1 Selección del disolvente.

2.3.1.1 Análisis de disolventes y determinación del máximo de absorción.

2.3.2 Celdas.

2.3.3 Buenas prácticas de laboratorio.

CAPITULO 3 GENERALIDADES DE LA CALIBRACIÓN DEL EQUIPO.

3.1 Calibración del equipo.

- 3.1 Rutinas de calibración del equipo.
- 3.1.1 Exactitud de la longitud de onda.
- 3.1.2 Linealidad fotométrica.
- 3.1.3 Ancho de banda espectral.
- 3.1.4 Nivel de ruido.

CAPITULO 4 GENERALIDADES SOBRE VALIDACION DE METODOS ANALITICOS.

4.1 Validación de métodos analíticos.

- 4.1.1 Parámetros de validación.
- 4.1.2 Definiciones de términos relacionados con validación.
- 4.1.3 Diagrama de validación de un método analítico.

4.2 Plan de validación.

- 4.2.1 Diagrama del plan de validación.
- 4.2.2 Evaluación de parámetros.
 - 4.2.2.1 Preparación de soluciones estándar.
 - 4.2.2.2 Límite de detección.
 - 4.2.2.3 Límite mínimo de cuantificación.
 - 4.2.2.4 Límite máximo de cuantificación.
 - 4.2.2.5 Intervalo de operación del equipo.
 - 4.2.2.6 Linealidad del intervalo de operación del equipo.
 - 4.2.2.7 Exactitud y precisión inicial.
 - 4.2.2.8 Linealidad del método.
 - 4.2.2.9 Exactitud inicial del método.
 - 4.2.2.10 Precisión inicial del método.

PARTE EXPERIMENTAL

CAPITULO 5. EXPERIMENTACIÓN.

5.1 Metodología de rutinas de diagnóstico. (diagramas)

- 5.1.1 Encendido del equipo y corrección de línea base.
- 5.1.2 Exactitud de longitud de onda con filtro de óxido de holmio.
- 5.1.3 Exactitud de longitud de onda con vapor de benceno.
- 5.1.4 Ancho de banda espectral.
- 5.1.5 Linealidad fotométrica.
- 5.1.6 Nivel de ruido.

5.2 Selección del disolvente.

- 5.2.1 Diagrama de análisis de éter etílico y determinación del máximo de absorción.

5.3 Preparación de curvas de calibración de ácido benzoico con éter etílico.

- 5.3.1 Preparación de soluciones estándar.

5.4 Estudio cinético de evaporación del éter etílico.

5.5 Cambio de disolvente.

5.5.1 Diagrama de análisis con metanol y determinación del máximo de absorción.

5.5.2 Preparación de curvas de calibración de ácido benzoico con metanol.

5.5.2.1 Preparación de soluciones estándar.

5.5.3 Exactitud y precisión inicial.

5.6 Población y muestreo.

5.7 Montaje de la técnica analítica. Técnica analítica por validar.

5.7.1 Método oficial 960.38 de AOAC. Acido benzoico en alimentos no sólidos y bebidas.

Método espectrofotométrico.

5.7.2 Preparación del placebo.

5.7.3 Linealidad del método.

RESULTADOS

CAPÍTULO 6.

6.1 Resultados de rutinas de diagnóstico.

6.2 Resultados de selección del disolvente. Espectros de absorción.

6.3 Resultados con éter etílico.

6.4 Cinética de evaporación.

6.5 Resultados de cambio de disolvente. Espectros de absorción.

6.6 Resultados con metanol.

6.7 Resultados de parámetros de validación.

6.7.1 Resultados con placebos cargados (exactitud y precisión inicial del método).

6.7.2 Resultados con bebidas (precisión del método).

6.7.3 Anova.

CAPITULO 7. ANALISIS DE RESULTADOS

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFIA

APENDICE

I Método Oficial No. 960.38 del AOAC.

II Análisis estadístico.

Errores.

Herramientas estadísticas.

III Espectro UVASOL de UV/vis del metanol.

RESUMEN

Antes de iniciar la validación del método 960.38 del AOAC se hicieron las pruebas de calibración de un espectrofotómetro de UV-vis. Se implementó el plan de validación donde se evaluaron los parámetros: coeficiente de variación del método, límite de detección, límite mínimo de cuantificación, límite máximo de cuantificación, intervalo de operación, intervalo lineal de operación. Se prepararon soluciones estándar de ácido benzoico en éter etílico de concentraciones 0.0002% a 1.0% incluyendo el intervalo comprendido de 0.002% a 0.008% de la curva estándar propuesta por el método a validar, se encontró baja reproducibilidad y repetibilidad de lecturas de los estándares, se hizo cambio de disolvente para la optimización del método. Se extrajeron muestras de bebidas de diferentes frutas y se concluye acerca de la validación de métodos de análisis de alimentos bajo criterios estadísticos que consideran las matrices complejas que generalmente presentan los alimentos, para diferenciarlas de las validaciones de productos farmacéuticos.

OBJETIVOS

- Validar un método espectrofotométrico de ultravioleta- visible para cuantificar ácido benzoico en jugos de frutas procesados.
- Dar a conocer los lineamientos para desarrollar un plan de validación que contemple las necesidades y limitaciones de la industria alimentaria.

I N T R O D U C C I Ó N

I N T R O D U C I Ó N

Los conservadores antimicrobianos en alimentos se conocían desde tiempos ancestrales, se sabe que los egipcios utilizaban a la mostaza para evitar la fermentación del vino, origen de su nombre ya que deriva del mosto. El primer antimicrobiano sintético que se conoció fue el ácido benzoico descubierto por Dr. H. Fleck, desde entonces se ha empleado en la conservación de alimentos.⁽¹³⁾⁽¹⁴⁾

Actualmente la facilidad de obtener productos alimenticios con una vida de anaquel amplia, requiere del uso de ciertos aditivos, como los conservadores o antimicrobianos entre otros. En México está aceptado como conservador por la Secretaría de Salud según el artículo 523 del capítulo II del Reglamento de Especificaciones para el uso de aditivos alimentarios permitiendo un máximo de 1000 mg/kg. El ácido benzoico es un aditivo General Recognized As Safe (GRAS) por la Food and Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos de América, se considera inocuo y se usa comúnmente en alimentos de alta acidez.

Debido a su amplio uso, recurrencia, altos volúmenes de consumo y variedad de aplicaciones debe existir un control más estricto en su normatividad, puesto que la salud pública puede estar en riesgo cuando hay un abuso de él y los amplios límites de uso lo hace susceptible de permitir malas prácticas de manufactura.

Afortunadamente en los últimos años la industria de los alimentos ha tendido a un control de calidad total, para tales fines deben de establecerse manuales o procedimientos que aseguren la viabilidad y confiabilidad de los procesos y/o métodos para obtener productos de calidad, cualquiera que sea la definición que de ella se tenga. La validación permite el aseguramiento de esta calidad puesto que es evidencia documentada de que el método o proceso está cumpliendo las funciones para las cuáles fue diseñado.

Existen guías para validar métodos, sin embargo, muchas veces esta información resulta complicada y repetitiva, además los criterios están establecidos principalmente para productos farmacéuticos y no para alimentos, por lo que se hace necesario dar los lineamientos para desarrollar un plan de validación que contemple las necesidades y limitaciones de la industria alimentaria con el fin de unir criterios y establecer una guía en el diseño de la experimentación cuando se va a aplicar y validar una técnica dirigida a productos alimenticios a la vez que se contemplan los puntos críticos de la aplicación del método.

Debido a que las matrices de los alimentos son mucho más complejas que las que existen en los productos farmacéuticos, la validación de este método de análisis permitirá la extrapolación de resultados a otros productos a los cuales se les necesite aplicar.

Capítulo 1

GENERALIDADES

GENERALIDADES DEL ÁCIDO BENZOICO

Desde tiempos ancestrales el hombre ha tratado de preservar los alimentos para almacenarlos para su posterior consumo protegiéndolos de microorganismos, en la búsqueda de mejores técnicas de preservación han aparecido sustancias químicas que han cumplido con la función de conservar a los alimentos según la composición y los tipos de microorganismos a los cuales son susceptibles.⁽¹⁵⁾

El presente trabajo considera a las bebidas como los principales productos alimenticios donde el ácido benzoico es utilizado como conservador.

1.1 Conservadores para bebidas

Factores que influyen en el crecimiento microbiano de bebidas.

- Composición de la bebida.
 - i) pH.
 - ii) Presencia de nutrientes (azúcares, minerales, aminoácidos).
 - iii) **Presencia de conservadores.**
- Nivel de contaminación microbiano inicial.
 - i) Condiciones sanitarias de los ingredientes y el equipo.
 - ii) Proceso de elaboración.
- Manejo y distribución de la bebida.
 - i) Tiempo de almacenamiento.
 - ii) Temperatura de almacenamiento.

De los factores mencionados anteriormente, la composición de la bebida tiene un efecto mayor en dicho crecimiento, el cual se lleva a cabo bajo condiciones específicas de humedad, pH y oxígeno disponible.

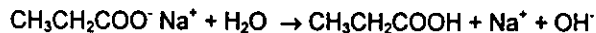
El nivel de contaminación microbiana inicial es un factor crítico en la descomposición microbiana de las bebidas, esto se relaciona con las condiciones sanitarias de los ingredientes y el equipo utilizados en su elaboración así como el mismo proceso, es importante recalcar que la acción de los conservadores no debe sustituir a las buenas prácticas de higiene ni tampoco debe enmascarar un mal proceso de elaboración.

Si consideramos que los conservadores no destruyen a los microorganismos y que solamente inhiben su crecimiento suponemos que si la carga microbiana inicial es baja, es de esperar que la descomposición microbiana se retrasará. En el caso de niveles altos de contaminación microbiana (cuenta total en placa mayor a 1 millón/gramo), la descomposición del producto debido a microorganismos se llevará a cabo tal como si no existiera conservador.

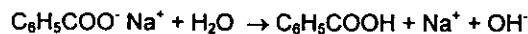
Por lo tanto el costo de inversión en conservadores bajo estas condiciones, sería inútil, por lo que no debe pensarse en un conservador como la solución a todos los problemas, sino como parte de un sistema total de calidad que incluya un programa completo de control de calidad así como buenas prácticas de elaboración y buenas prácticas de manejo y almacenamiento de los ingredientes y del producto terminado.⁽²⁹⁾

1.1.1 Importancia del pH en la acción de los conservadores.

La mayoría de los conservadores son ácidos débiles (ácido sórbico) o sales de ácidos débiles y bases fuertes (sorbato de potasio, benzoato de sodio, propionato de sodio). El uso de sales es más común porque tienen mejor solubilidad que los ácidos y son más fáciles de manejar. Los benzoatos, sorbatos y propionatos son sales alcalinas que en solución acuosa se transforman en el ácido del que provienen, como se muestra en la siguiente ecuación para el propionato de sodio:



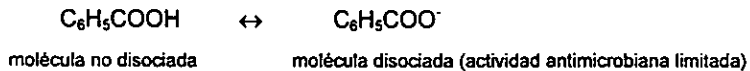
para el benzoato de sodio se presenta el equilibrio:



Debido a la aceptación del protón por la molécula de sal, el pH de una bebida con un contenido de conservador tiende a incrementarse ligeramente, así es como la aceptación del protón depende del pH y de la capacidad amortiguadora del producto.

Al ajustarse el pH de una bebida para asegurar la efectividad de un conservador, este valor del pH debe medirse con el conservador incluido.

La especie de ácido protonado que resulte de disolver el conservador en agua, puede presentarse como una molécula no disociada o como una molécula disociada, como se muestra para el ácido benzoico.



La molécula no disociada tiene una actividad antimicrobiana mucho mayor que la molécula disociada. La forma no disociada interfiere con la permeabilidad de la membrana de la célula microbiana y por lo tanto previene el crecimiento del microorganismo. La forma no disociada (protonada) es más soluble en lípidos que la forma disociada y por lo tanto se absorbe más por la membrana celular.

La relación porcentaje de molécula no disociada/ porcentaje de molécula disociada puede calcularse utilizando la ecuación de Henderson-Hasselbach:

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \frac{\text{nivel de molécula disociada}}{\text{nivel de molécula no disociada}}$$

nivel = concentración

La construcción de una gráfica del porcentaje de la molécula no disociada de un conservador contra pH es un buen indicador de la efectividad de un conservador a diferentes pHs. Sin embargo esta actividad antimicrobiana dependiente del pH, no se relaciona únicamente con el nivel de molécula no disociada resultando una actividad antimicrobiana limitada.

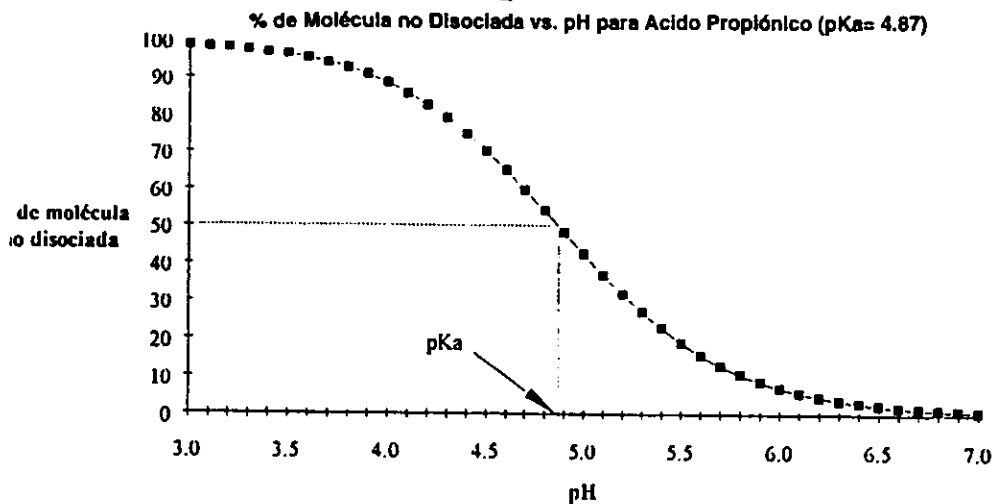


Figura 1.1^{ref.20}

Como se observa en la Figura 1.1, mientras menor es el pH mayor es la cantidad de molécula no disociada, esto significa que la fuerza de un conservador aumenta a medida que el pH disminuye, presentándose cambio más drástico cerca del valor de pKa del ácido.

En el caso del ácido propiónico, cuyo valor de pKa es 4.87, a pH=4.87 el 50% del ácido esta en forma disociada ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^-$) y el otro 50% no esta disociado ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$). Cuando el pH=6, solamente permanece un 7% de ácido propiónico no disociado, esto significa que si se usa un 0.2% de propionato de sodio en un producto alimenticio a pH=6.0, el nivel real de ácido propiónico no disociado presente es:

$$0.2\% * 7.0\% * \frac{\text{peso molecular del ácido propiónico}}{\text{peso molecular del propionato de sodio}} = 0.2\% * 7.0\% * 0.772 = 0.01$$

El resultado es 0.01% de ácido propiónico no disociado y por lo tanto sólo esta cantidad tiene actividad antimicrobiana.

Debido al bajo nivel de ácido propiónico no disociado presente, los propionatos tienen muy poca actividad antimicrobiana a pH=6.0. Los propionatos son efectivos como conservadores a pHs de 5.5 o menores. El valor más alto de pH para la efectividad de otros conservadores se muestra en la Tabla 1.1.

Tabla 1.1

Conservador	Máximo valor de pH para actividad del conservador
Benzoatos.	4.5
Propionatos	5.5
Acido sórbico, Sorbatos.	6.5

1.2 BENZOATOS (BENZOATO DE SODIO, BENZOATO DE POTASIO)

1.2.1 Historia

El primer antimicrobiano sintético que se conoció fue descubierto en 1875 por Dr. H. Fleck cuando intentaba sintetizar un sustituto del ácido acetilsalicílico. Anteriormente se habían utilizado algunos extractos de plantas como antimicrobianos, después se encontró que dichos extractos contenían ácido benzoico.

El hecho de poder obtenerlo sintéticamente en gran cantidad y a bajo costo hizo que se generalizara su uso (principalmente en los "polvos de enlatados"), lo cual trajo como consecuencia el abuso en su uso por las ventajas que presentaba junto a otros conservadores que se empleaban en la época.

En 1906 Harvey H. Wiley químico principal del Departamento de Agricultura de EU, ante la sospecha del efecto tóxico del ácido benzoico además de otros aditivos, promulgó la primer Pure Food and Drug Act donde se exige que aparezca en las etiquetas la relación de ingredientes. Sin embargo se siguió utilizando en diversos productos bajo límites permitidos y en 1981 fue aprobado como aditivo GRAS por la Food and Drug Administration (organismo integrado en 1931 cuyas siglas son FDA) y por Codex Alimentarius perteneciendo hasta la fecha a este mismo rubro.⁽²⁰⁾⁽¹⁵⁾⁽¹⁶⁾

1.2.2 Mecanismo de acción.

El mecanismo bactericida del ácido benzoico se basa en varias intervenciones en la estructura enzimática de la célula microbiana.

Se sabe que en varios hongos y bacterias inhibe a la enzimas que controlan el metabolismo del ácido acético y la fosforilación oxidativa ya que interviene en varios puntos de el ciclo de Krebs especialmente en la enzima α -cetoglutarato y la enzima succín deshidrogenasa, además también actúa a nivel de pared celular.

Para que exista una inhibición, el ácido benzoico debe penetrar a la célula a través de su pared, esto sólo es posible cuando el ácido está en forma no disociada.⁽²⁰⁾

Tanto el benzoato de sodio como el benzoato de potasio son sales del ácido benzoico que se encuentran presentes en forma natural en la canela, el clavo, las ciruelas pasas y algunas bayas. Ambas sales se transforman en ácido benzoico al disolverse en agua.

Los benzoatos son efectivos contra mohos, levaduras y bacterias a un pH de 4.5 o menor.

Tabla 1.2. Propiedades del ácido benzoico.⁽²⁰⁾

Actividad antimicrobiana:	Levaduras, mohos y bacterias.
Máximo valor de pH para lograr efectividad	4.5
Solubilidad en agua a 20°C	Benzoato de sodio 40% Benzoato de potasio 30%
Nivel de uso	0.02-0.3%*

Nivel de uso reportado hasta abril de 1995. Revisar en este mismo trabajo los niveles de uso actuales.

1.2.3 Fabricación.

Existen muchos procesos químicos para fabricar benzoato de sodio. Sin embargo, en Estados Unidos sólo uno; la neutralización del ácido benzoico, está aprobado por FDA para el benzoato de sodio presente en alimentos y bebidas para consumo en dicho país (21 CFR 184. 1733), esta ley incluye bebidas exportadas por México, por lo tanto es importante asegurar que el benzoato de sodio utilizado en bebidas de exportación cumpla con la ley de Estados Unidos de América.

La razón por la cual la FDA especifica el proceso de neutralización es porque éste genera menos impurezas. Según el proceso de FDA, para fabricar benzoato de sodio, se destila varias veces el ácido benzoico para remover impurezas que puedan causar sabores extraños. Este ácido benzoico destilado y puro se neutraliza con hidróxido de sodio para producir benzoato de sodio, posteriormente debe asegurarse que el producto esté libre de sabores extraños.

Se fabrican tres tipos de benzoato: en polvo, denso y EDF(extruded-dust-free) o extruido libre de polvo que es una forma especial del producto que no es polvoso pero se disuelve rápidamente. De las tres presentaciones la que requiere de más tiempo para disolverse es la forma densa; el EDF se disuelve dos veces más rápido que el denso.

1.2.4 Niveles de uso

La tabla 1.3 describe los niveles de uso típicos del ácido benzoico, ésta es sólo una guía puesto que el nivel de uso real que se requiere depende de varios factores y se determina típicamente al llevar a cabo las pruebas correspondientes.

En algunos casos, se utiliza acidulante para bajar el pH del producto al valor de efectividad del conservador. En otros casos, el conservador debe añadirse una vez que la maduración o fermentación hayan terminado.⁽²⁹⁾

Tabla 1.3.

Aplicaciones	Nivel de uso (%)
Bebidas carbonatadas	0.02 - 0.05
Bebidas de fruta	0.05
Jarabes	0.1 ¹
Vino	0.01 - 0.05

¹ Se utiliza un acidulante para bajar el pH al intervalo efectivo del conservador.

² El conservador se añade al producto después de que la fermentación o la maduración termine.

1.2.5 Métodos de uso.

En la fabricación de refrescos, se disuelven en agua grandes cantidades de benzoato de sodio en una estación de mezclado antes de bombearse a un tanque de jarabe. Siempre que se emplee este conservador debe ser el primero en añadirse al agua. Si se usa un ácido en la fórmula, deberá de agitarse el tanque al añadir el ácido para evitar la precipitación local del ácido benzoico, que tiene una solubilidad en agua de solamente 0.3% a 20°C.

Debido a que los benzoatos son sales y éstos aumentan el pH de algunos productos, el pH del producto debe medirse con el conservador incluido para determinar si éste es lo suficientemente bajo para permitir que el conservador sea efectivo.

Al desarrollar nuevos productos, si se piensa agregar un conservador al producto final, es importante incluirlo en las fórmulas prototipos. De esta manera no habrá cambios en el pH o en el perfil de sabor del producto cuando se elabore a gran escala.⁽²⁹⁾

1.2.6 Aplicaciones.

El benzoato de potasio se usa en aplicaciones en donde el nivel de sodio debe ser reducido y también en bebidas con aspartame para mejorar el sabor.

El campo de acción de los benzoatos es muy amplio, incluye emulsiones como mayonesas, delicatessen, productos marinos, productos vegetales pero principalmente en productos de frutas como; salsas, frutas en almibar, purés, jaleas, ates, mermeladas y jugos.

1.2.7 Normatividad

Según el Codex Alimentarius volumen 1 1992 en su sección 2 DEFINICIONES, se entiende por aditivo alimentario *cualquier sustancia que por sí misma no se consume normalmente como alimento, ni tampoco se usa como ingrediente básico en alimentos, tenga o no valor nutritivo, y cuya adición al alimento en sus fases de producción, fabricación, elaboración, preparación, tratamiento, envasado, empaquetado, transporte o almacenamiento, resulte (o puede esperarse que razonablemente resulte) directa o indirectamente por sí o sus subproductos, un componente del alimento o bien afecte a sus características.* Esta definición no incluye "contaminantes" o sustancias añadidas al alimento para mantener o mejorar las cualidades nutricionales.⁽⁸⁾

Según el Codex Alimentarius volumen 1 1992 sección 5 Nombres Genéricos y Sistema Internacional de Numeración (SIN) de Aditivos Alimentarios, agrupa a los conservadores con las siguientes notaciones:

Clases funcionales	Definiciones	Subclases <i>(funciones tecnológicas)</i>
Sustancias conservadoras.	Sustancias que protegen la vida de almacén de los alimentos protegiendo a éstos del deterioro ocasionado por microorganismos.	<ul style="list-style-type: none"> • Conservadores antimicrobianos. • Agentes antimicóticos. • Agentes de control de bacteriófagos. • Agentes quemoesterilantes. • Maduradores del vino. • Agentes de desinfección.

Según el SIN:

Número	Nombre del aditivo alimentario	Función tecnológica
210	Acido benzoico.	conservante
211	Benzoato de sodio	conservante
212	Benzoato de potasio	conservante

El Diario Oficial de la Federación publica el 21 de noviembre de 1997 la Norma Oficial Mexicana 130, que indica los requerimientos y niveles permitidos para aditivos en alimentos envasados en recipientes de cierre hermético. La NOM indica los grupos de sustancias permitidas junto con los productos donde se autoriza su utilización y los límites máximos establecidos para su uso.⁽¹⁾

Cabe señalar que según la norma, los productos objeto de la misma, se clasifican por su naturaleza en :

- Alimentos envasados en recipientes de cierre hermético con pH menor o igual a 4.6.
- Alimentos sometidos a tratamiento térmico envasados asépticamente.

- Alimentos ácidos y poco ácidos - acidificados, fermentados, encurtidos, alimentos elaborados a base de frutas (como jugos, néctares, mermeladas, jaleas, ates, etc.) y frutas envasadas en recipientes de cierre hermético y sometidas a tratamiento térmico.
- Alimentos envasados en recipientes de cierre hermético con pH mayor de 4.6.
- Vegetales, productos cárnicos, platillos preparados con carne, productos lácteos y mezclas, envasados en recipientes de cierre hermético y sometidos a tratamiento térmico que asegure su esterilidad comercial.
- Y otros productos con las mismas características y sujetos al mismo proceso.

Para el objetivo de este trabajo podemos asignarle a las muestras analizadas el grupo de alimentos ácidos elaborados a base de frutas y que según la NOM 130 rige para el benzoato de sodio lo siguiente:

CONSERVADORES

Aditivo	Productos	Límite máximo
Benzoato de sodio	Salsas, frutas en almíbar, purés, jaleas, ates, mermeladas y jugos	Solo o mezclado hasta un máximo de 1000 mg/kg. (0.1%)

Capítulo 2

GENERALIDADES ACERCA DE ESPECTROSCOPIA DE ULTRAVIOLETA VISIBLE.

2.1 Fundamentos.

Los métodos espectrofotométricos se basan en la interacción de la energía radiante con la materia.

A esta energía se le puede describir como una onda que viaja a la velocidad de la luz y tiene como características propias una frecuencia, una longitud (λ) y los efectos que producen sobre la materia. La radiación es una forma de energía que puede ser fácilmente descrita por dos modelos matemáticos que se unen en el *efecto dual* que indica que la radiación está compuesta de partículas discretas de energía llamadas fotones, es decir puede comportarse como partícula y como onda electromagnética.⁽³¹⁾

2.1.1 Espectro electromagnético.

En la naturaleza existen diferentes ondas electromagnéticas que en conjunto constituyen una enorme gama de energía radiante conocida como espectro electromagnético. Este incluye desde rayos cósmicos con longitudes de ondas tan pequeñas como 10^{-9} nanómetros (nm.) hasta las ondas de radio con longitudes superiores a los 1000 km.⁽¹⁷⁾

La radiación Ultravioleta-Visible (UV/vis) es una manifestación de una pequeña porción del espectro electromagnético cuyo intervalo de longitud de onda va de 10 a 780 nm. A la vez esta porción se divide en el lejano ultravioleta (10-200nm.), ultravioleta cercano (200-300nm.) y visible (300-780).⁽¹⁰⁾

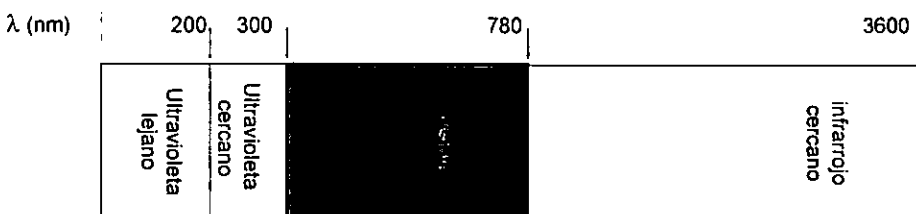


FIGURA 2.1

2.1.2 Origen del espectro de absorción.

La energía electrónica asociada con la radiación electromagnética de un fotón se expresa en la ecuación:

$$E = h\nu = h \frac{c}{\lambda}$$

donde: E= energía [ergios]

h = constante de Planck [6.62 * 10⁻²⁷ ergios/seg.]

ν = frecuencia [ciclos/seg]

c = velocidad de la luz [3 * 10¹⁰ cm/seg]

λ = longitud de onda [cm]

Cuando la radiación pasa a través de una sustancia semitransparente, la radiación se transmite parcialmente. La resultante es reflejada o absorbida, esto dependerá del tipo de sustancia y de la longitud de onda. En esta técnica la radiación absorbida es la de mayor interés. Desafortunadamente no existe un método de medición directa de la radiación absorbida, por lo que se recurre a métodos indirectos, como la medición de la radiación transmitida. Por lo que la absorbancia resulta ser la diferencia entre la luz que incide y la luz que se transmite. Si la intensidad de la luz transmitida se graficara como una función de la longitud de onda, se obtendría el espectro de absorción de la sustancia. Esta absorción selectiva es la base de aplicación de la espectroscopía para el análisis cualitativo y cuantitativo.

2.1.3 Análisis cualitativo.

La absorción de un fotón por una molécula da como resultado un incremento en su energía. Este incremento es exactamente igual a la energía del fotón $\Delta E = h\nu$

Cuando un electrón de una molécula que inicialmente se encuentra en estado basal E_0 , al interactuar con la luz (Figura 2.1), hace que se eleve el contenido de energía a estados superiores o excitados E_1 , al regresar a su estado basal libera un *quantum* que según experimentos demuestran que los cambios de energía producidos por la absorción de luz no son continuos si no que suceden en paquetes de energía discretos llamados quantum. El quantum es característico de cada especie absorbente.

E_1

$$\Delta E = h\nu \text{ (quantum) = diferencia de energía fotónica}$$

E_0

Figura 2.2

Así la energía de un fotón corresponde precisamente a la diferencia entre dos estados de energía característicos de la molécula. Es decir, se requiere una cantidad de energía específica para subir o bajar de nivel, por lo tanto la longitud de onda de máxima absorción (aquella donde ocurre la transición electrónica) se puede correlacionar con los tipos de enlace de la especie absorbente en estudio, en el caso de radiaciones del Ultravioleta Visible, pues son los electrones de enlace los que absorben este tipo de energía.

Con base en lo anterior, los métodos espectroscópicos que utilizan la radiación ultravioleta-visible como energía excitante, proporcionan datos que predicen instauraciones, sistemas conjugados o grupos funcionales lo que los hace selectivos para el análisis cualitativo de compuestos cuyos enlaces producen absorción. Estos enlaces pertenecen a los compuestos con heteroátomos que tienen electrones antienlace como O, N, S y P, metales de transición y grupos funcionales con enlaces π conjugados denominados "grupos cromóforos"⁽²³⁾ como es el caso del ácido benzoico.

2.1.4 Análisis cuantitativo y Ley de Lambert-Beer.

La radiación incidente puede ser absorbida por la muestra; puede igualmente reflejarse en la superficie del contenedor de la muestra (celda) o espacirse si hay partículas dispersas en la muestra o rayaduras en las paredes de la celda. La cantidad de radiación transmitida por la muestra es aquella que no absorbe, refleja o dispersa. De tal forma que si por las características de la celda, no se presentan los fenómenos de dispersión ni de refracción de la radiación, la cantidad de energía transmitida es función únicamente de la cantidad de energía absorbida por las moléculas de interés.

El análisis cuantitativo en la espectroscopía, se basa en las leyes de la absorción de la energía radiante.⁽²³⁾

*Grupo funcional responsable de la absorción en el UV-vis.

Ley de Lambert-Beer.

La ley de Lambert-Beer-Bouguer señala que una onda (radiación) proveniente de un haz de luz monocromática va a ser absorbida por una muestra que esté a concentración constante, la potencia que tenga esta onda al salir de la muestra dependerá de la cantidad de moléculas que encuentre a su paso y que sean capaces de absorberla. Lo anterior se cumple siempre y cuando la longitud de onda de esta radiación incidente sea constante al igual que la distancia que atravesase (espesor de la celda). A la relación que existe entre la potencia con la que entra la radiación (P_0) y la potencia con la que sale (P), se le conoce como Transmitancia⁽³¹⁾

$$T = \frac{P}{P_0}$$

La combinación del espesor de la celda y la concentración se representa matemáticamente en la Ley de Beer-Boughner. Esta ley describe que la absorbancia es directamente proporcional a la concentración y al espesor de la celda:

$$A = a * b * c \text{ Ley de Beer}$$

La absorptividad a (coeficiente de absorptividad) es una característica propia de cada molécula que depende de ciertas condiciones definidas de longitud de onda, disolvente, temperatura y otros parámetros. En esencia, la absorptividad es una medida de la fuerza de absorción de una sustancia dada a una longitud de onda específica. Si el espesor de la celda se expresa en centímetros y la concentración en gramos por litro, las unidades de la absorptividad serán litros por gramos sobre centímetros.

$$T = \frac{P}{P_0} = 10^{-a * b * c} \therefore \text{Absorbancia} = \log T - 1 = -\log T = -\log \frac{P}{P_0} = \log \frac{P_0}{P} = a * b * c$$

donde a = absorptividad

b = espesor de la celda

c = concentración

P_0 = luz incidente

P = luz transmitida

De la ecuación de Lambert y Beer se puede concluir que conociendo el trayecto óptico, el coeficiente de absorción molecular y midiendo la absorbancia y el % de transmitancia de la muestra se puede conocer la concentración.

2.2. Instrumentación

Esencialmente un espectrofotómetro provee una banda estrecha de radiación espectral, llamada luz monocromática y que mide el grado de interacción entre esta radiación y una muestra.

Entre los componentes principales de un espectrofotómetro se incluyen; una fuente de radiación, monocromador, compartimento de celdas, detector, amplificador y lector. Los últimos tres integran el sistema fotométrico.⁽²²⁾

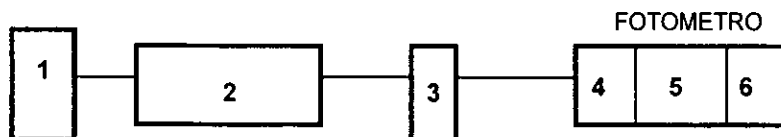


Figura 2.3. Componentes de un espectrofotómetro uv/vis

1 Fuente

2 Monocromador

3 Compartimiento para celdas

4 Detector

5 Amplificador

6 Lector

La luz que proviene de la fuente entra al monocromador aislando una banda espectral para continuar hacia la muestra. Dependiendo del grado de interacción - proceso de absorción; parte de la radiación es transmitida al detector donde se genera una señal eléctrica proporcional al nivel óptico. Esta señal será amplificada y registrada por un lector apropiado.

Las tres fuentes de radiación más utilizadas son la lámpara de tungsteno (su radiación es útil en la región visible y cercano infrarrojo), la de deuterio (para la región de ultravioleta (200-300 nm.) y la de arco de xenón (provee una radiación continua de alta intensidad en toda la región uv/vis). Desafortunadamente ésta última tiende a ser inestable y por lo tanto es menos confiable.

La parte fundamental de la que depende la calidad de un espectrofotómetro es el monocromador. El monocromador acepta la luz proveniente de la fuente, la dispersa de acuerdo a la longitud de onda con ayuda de rejillas de difracción y selectivamente la deja pasar a través de una abertura estrecha (slit), este haz de luz de longitud de onda específica es el que llega a la muestra. Puesto que a las rejillas de difracción se les

considera el corazón del monocromador se describen a continuación: una rejilla se asemeja a un espejo rayado con líneas finas paralelas, cuando un haz de luz choca con la superficie sucede la flexión, para cada longitud de onda hay un ángulo de refracción, dependiendo del número de líneas por milímetro de superficie de la rejilla será la resolución del aparato así que, a mayor número de líneas por milímetro se obtendrá mejor resolución pues el aparato tendrá mayor capacidad de seleccionar longitud de onda (1000-300 ranuras por mm.).

Con respecto al detector, éste debe convertir el poder óptico en una señal eléctrica y con un mínimo de nivel de ruido; esto debe hacerse uniformemente sobre un amplio intervalo espectral con una respuesta lineal. El detector más común es el fotomultiplicador.

Existen dos tipos de espectrofotómetros de UV/vis; de un sólo haz y de doble haz. Este último se caracteriza por dividir el haz de luz en dos, uno dirigido a la muestra y el otro dirigido a la referencia lo que lo hace un instrumento mas confiable pues compensa los cambios en la fuente y el detector. Por razones de disponibilidad, en el presente trabajo se utilizó un espectrofotómetro de un sólo haz.⁽²³⁾

2.3. Manejo de muestras para la técnica ultravioleta visible.

Para realizar un análisis en forma eficiente se requiere un buen manejo de la muestra. En las regiones ultravioleta y visible generalmente se manejan muestras en solución o en fase vapor, aunque últimamente se están trabajando muestras sólidas con accesorios de esferas de integración.

2.3.1 Selección del disolvente

En estudios espectrofotométricos los disolventes deben:

- Disolver o diluir la muestra.
- No transmitir en la región de longitudes de onda en estudio, esto es; que el pico de máxima de absorción del disolvente no aparezca en la zona donde se presenta el pico de máxima absorción del analito, si esto sucede la señal del disolvente enmascara a la señal del analito y se tiene una mala cuantificación.

Para la región ultravioleta se ha visto que existen muchos compuestos que no absorben arriba de 200-220 nm, por lo que, no se hace difícil encontrar disolventes. Algunos disolventes que presentan absorción hasta 220 nm o aún menos. En la Tabla 2.1 se muestran algunos disolventes útiles en estudios espectrofotométricos de ultravioleta-visible con sus correspondientes longitudes de onda (λ) de máxima absorción.⁽²³⁾

Tabla 2.1^(18,19)

Disolvente	λ máxima
Agua	206.0 nm.
Etanol al 95%	209.0 nm.
Eter etílico	227.0 nm.
Acetonitrilo	210.0 nm.
Hexano	210.0 nm
Metanol	210.0 nm
Eter	220.0 nm.
Benceno	280.0 nm.
Tolueno	285.0 nm.
Acetona	330.0 nm.

Tabla 2.2. Propiedades de solventes ácido-base⁽¹⁸⁾

	Potencial (mV)	$-\log K_s$	Cte. dieléctrica 25°C	λ máxima
metanol	800	16.7	32.7	210.0 nm.
agua	800	14.0	78.3	
éter			4.335	218.0 nm.

El método a validar propone éter etílico como disolvente del ácido benzoico, para su extracción y posterior cuantificación, esto es viable siempre y cuando se asegure que el éter etílico es lo suficientemente puro como para que no contenga contaminantes que absorban a la longitud de onda de estudio y alteren la señal del ácido benzoico por cuantificar. Es por esto que se hace un espectro de absorción o "barrido" del disolvente.

2.3.1.1 Análisis de disolventes y determinación del máximo de absorción.

Como se ha explicado anteriormente, un método espectrofotométrico consiste en hacer incidir sobre una muestra un haz de luz de longitud de onda específica, determinada por las características estructurales del compuesto a analizar; debido a que el compuesto está disuelto en una matriz de composición conocida y se ha asegurado la no intervención de otras señales ajenas a las del compuesto a analizar podemos obtener resultados confiables. Sin embargo, previo al trabajo experimental hay que asegurar la pureza de los reactivos que se van a utilizar como disolventes, ya sea en la extracción del analito (éter etílico) o en la lectura del analito en la curva patrón y en la muestra extraída (metanol). Si no se han tenido las precauciones necesarias para almacenar el éter etílico (en contenedores de vidrio ámbar, temperatura de refrigeración y protegido de la luz solar) éste es susceptible de formar peróxidos que no se eliminan en la evaporación y afectan la lectura del ácido benzoico, por lo que constituyen una fuente de error en la determinación.

Para determinar la pureza de los reactivos se debe obtener un espectro de absorción de los disolventes, en este caso el disolvente es éter etílico y según la bibliografía éste debe de absorber a 227.0 nm, de esta manera nos aseguramos que no interferirá en la lectura (además de conocer la pureza del reactivo). También debe hacerse un barrido de una solución del disolvente y analito para conocer el máximo de absorción del analito. Una vez obtenido el espectro experimental debe compararse con el de la bibliografía. Para el metanol se presenta al final de este trabajo (Apéndice III), su espectro teórico.⁽³³⁾

2.3.2 Celdas.

No importa qué tipo de celda se requiera; rectangulares, cilíndricas, espesor largo, corto o estándar, micro, semimicro o celdas de flujo; siempre es importante que la celda sea fabricada con la mas alta calidad y precisión para asegurar la exactitud y sensibilidad cada vez que se utilice.

Las ventanas de las celdas deben fabricarse con materiales que eviten se deformación asegurando que el espesor y dimensiones se mantengan constantes.

Existen cuatro tipos de materiales básicos; vidrio óptico, especia sílica fundida, cuarzo UV lejano y metacrilato.

Espesores de las celdas.

Las más comunes son celdas de 1.0 cm.

Para muestras diluidas se emplean celdas de 10 cm. que mejoran la señal ruido.

En muestras concentradas que se encuentran en el límite superior de absorbancia, se utilizan celdas de espesor menor a 1 cm que equivale a diluir la muestra.

Recomendaciones para el uso de las celdas.

- Emplear la celda correcta para su aplicación.
- Conservar las celdas limpias y libres de rayaduras, marcas y otros defectos físicos.
- Sostener las celdas por la superficie no óptica (pulida) es decir la parte esmerilada.
- Limpiar la celda con una porción de la muestra a analizar por lo menos una vez.
- Evitar soluciones fuertemente básicas.
- Si el análisis lo requiere utilizar sustancias corrosivas mantenerla el menor tiempo posible dentro de la celda.

Limpieza y cuidado de las celdas.

- Lavar las celdas con detergente grado óptico cuando requiera un lavado
- Un limpiado más vigoroso es hervir con ácido nítrico, agua destilada y secarlas con etanol.
- Cuando así lo requiera se pueden secar las celdas con aspiración al vacío.
- Evitar ácido crómico y álcalis.

Métodos de limpieza según el grado de impurezas.

1º grado. Lavar con agua destilada o solventes orgánicos.

2º grado. Utilizar detergentes no alcalinos en la concentración especificada por el fabricante.

3º grado. Con ácido nítrico fúmico frío.

4º grado. Con ácido nítrico concentrado caliente.

5º grado. Sumergir la celda diez minutos en solución al 10% de ortofosfato trisódico a 90°C.

2.3.3 Buenas prácticas de laboratorio.

RECOMENDACIONES PARA PREVENIR FALLAS

1. Operar el instrumento en un ambiente limpio.
2. Evitar lugares con alto grado de humedad y temperatura.
3. Línea de voltaje regulada.
4. No bloquear el flujo de aire con que cuenta el instrumento.
5. El instrumento debe estar colocado en un lugar donde no se exponga a los rayos de sol, solventes y humo.
6. No tocar las superficies ópticas y lámparas con los dedos, utilizar guantes.
7. No tocar las superficies de las celdas con los dedos. Es recomendable manejarlas por la parte esmerilada, el reactivo debe caer por las paredes internas de la celda. Limpiarlas por la parte pulida antes de colocarlas en el portaceldas.
8. Cambiar las lámparas cuando empiecen a desgastarse y no esperar a que se consuman totalmente. Recordar que las lámparas de tungsteno recubiertas de vidrio se van oscureciendo con el uso resultando una pérdida de energía continua por lo que sufren degradación con el tiempo.
9. La vida media de una lámpara se incrementa apagándola cuando no está en uso, manteniendo prendido el instrumento.
10. Referirse siempre al manual de operación para un mejor uso del instrumento.

Capítulo 3

GENERALIDADES DE LA CALIBRACIÓN DEL EQUIPO.

3.1 Rutinas de calibración del equipo.

Para llevar a cabo una validación se debe asegurar la obtención de los mejores resultados, por eso es necesario que el equipo de laboratorio sea capaz de cubrir todas las aplicaciones y tareas además de proporcionar resultados exactos y reproducibles. El equipo que se utilizó es un espectrofotómetro de UV/vis marca GBC modelo 911 A, de un sólo haz, que debe cumplir ciertas especificaciones para asegurar su buen funcionamiento, estas especificaciones son parámetros medibles que evidencian las condiciones y funcionamiento del aparato. La medición de estos parámetros se hace llevando a cabo las rutinas de diagnóstico que son pruebas de inspección. Como mínimas pruebas de inspección se recomiendan:

- Revisión de la exactitud de la longitud de onda.
- Exactitud fotométrica.
- Linealidad fotométrica
- Ancho de banda espectral.
- Nivel de ruido.

3.1.1. Exactitud de la longitud de onda.

Normalmente, la absorbancia de un cromóforo se mide a la longitud de onda de máxima absorbividad, de manera que si la longitud de onda es inexacta, la absorbancia también lo será.

Con base en lo anterior se define a la *exactitud de la longitud de onda* como el valor que se puede establecer con el sistema óptico del aparato, que tenga una desviación $\pm(0.5)$ del valor real. Existen tres métodos para revisar la exactitud de longitud de onda.

- i) Los que involucran fuentes de energía radiante que tienen líneas de emisión a longitudes de onda bien definidas, como la lámpara de deuterio que contiene el aparato.

- ii) Por medio del uso de filtros de vidrio que contienen tierras raras como el cloruro de holmio o didimio. El óxido de holmio exhibe un espectro característico en la región uv/visible con varias bandas de absorción muy definidas, esto lo hace una sustancia de prueba ideal para llevar a cabo juicios o pruebas iniciales a un nuevo espectrofotómetro o asegurar la exactitud de longitud de onda del aparato en uso.
- iii) Los que involucran el uso de soluciones como el óxido de samario y el vapor de benceno son métodos rápidos donde se observan bandas muy estrechas y bien definidas.⁽²²⁾

La importancia de la revisión de la exactitud de la longitud de onda es que no basta que la longitud de onda sea exacta, sino reproducible.

Efectos.

- Fallas en la precisión de longitud de onda derivan en la disminución de la sensibilidad de la prueba.
- La no reproducibilidad de métodos y sus resultados.

3.1.2 Linealidad fotométrica.

Linealidad fotométrica significa que hay relación directa entre lo que lee el detector y la concentración real de la muestra.

Esto se comprueba con un material que siga la Ley de Beer, como es el $K_2Cr_2O_4$, la obtención de una curva con $r = 0.998$ y linealidad hasta 3.0 unidades de absorbancia (después de este valor se satura el detector y la curva se vuelve logarítmica), asegura el cumplimiento de la ley de Beer y linealidad fotométrica.

Las principales razones para que no exista linealidad fotométrica son la presencia de luz extraña y baja sensibilidad del detector, de manera que el instrumento reportará concentraciones inexactas.⁽²²⁾

3.1.2.1 Aseguramiento de la saturación del detector.

Esta rutina es complementaria de la anterior se busca ver hasta dónde se inclina la curva, pues el detector se ha saturado y a concentraciones muy altas de estándar éste lee la misma absorbancia en todas las concentraciones.

3.1.3 Ancho de banda espectral.

Comúnmente se le llama *luz monocromática* a la radiación que sale del monocromador, siendo la longitud de onda seleccionada por el usuario. Esta banda se define en términos de su *ancho de banda espectral* que es la óptima separación entre dos picos adyacentes. Este es un criterio para la resolución en la obtención de un espectro. Depende principalmente de la calidad del elemento dispersor y del ancho de la apertura física de la rendija que selecciona la longitud de onda del haz de luz deseado.

Entre más pequeña sea esta apertura mayor será la resolución que se pueda obtener en las bandas del espectro. Todos los espectrofotómetros poseen un apertura de un valor fijo y por lo tanto está limitado a este valor que es lo suficientemente amplio para la mayoría de las muestras que se analizan rutinariamente el cual se puede optimizar en la mayoría de los instrumentos.⁽²³⁾

Efectos.

El paso de banda debe ser de 1/5 a 1/10 de la anchura total de la banda. Valores altos causan pérdida de exactitud fotométrica y resolución.

La energía disminuye al cuadrado de la apertura. A mayor resolución, mayor ruido por lo tanto mayor posibilidad de error.

3.1.4 Nivel de ruido.

Se define al ruido como fluctuaciones aleatorias de la señal. Pueden ser debidas:

- Energía del haz de referencia.- son variaciones debidas a la longitud de onda, el ancho de banda, disminución de energía, solventes que absorben luz, celdas sucias y/o rayadas.
- Se ha observado que a bajos valores de absorbancias el ruido es independiente, mientras que a altas absorbancias varía como 10° .
- Tiempo de respuesta. El ruido disminuye conforme se incrementa el tiempo de respuesta que es el tiempo que se lleva para medir la señal, ésta es promediada para reducir el ruido.
- Señal-ruido.- es la señal de absorbancia dividida entre la señal del ruido.

Capítulo 4

GENERALIDADES SOBRE VALIDACION DE METODOS ANALITICOS

4.1 Validación de métodos analíticos.

En el quehacer diario de la industria alimentaria y la investigación científica, es de uso común emplear métodos de análisis tanto del producto terminado como de la materia prima que se va a procesar, en ocasiones surge la pregunta:

¿En realidad el método será efectivo y confiable?

Para contar con esta información se debe tener una evidencia documentada que demuestre que el método está cumpliendo la función para la que fue diseñado, además que asegure que el comportamiento de dicho método es consistente.

El mecanismo mediante el cual queda establecida la capacidad y confiabilidad de las técnicas analíticas se llama "Validación de métodos analíticos" que puede definirse como *el proceso mediante el cual queda establecido, después del tratamiento estadístico de una serie de experiencias de laboratorio, que el método analítico es confiable para cuantificar, identificar y/o caracterizar una sustancia, cuando es llevado a cabo por cualquier profesional capacitado en cualquier tiempo.* ⁽⁴⁾

El tratamiento estadístico de los datos experimentales tiene como fin la obtención de parámetros estadísticos que representan la medida del error del método analítico.

Los valores de estos parámetros estadísticos experimentales deben ser comparados con criterios teóricos que aparecen en las especificaciones de las guías de validación. Se ha establecido que el método está validado si los valores obtenidos experimentalmente son menores que los valores teóricos de las especificaciones.

El criterio de aceptación de los valores teóricos dependerá de la complejidad del método y de la matriz del producto alimenticio, debido a que éstos contienen diversos compuestos que podrían interferir en la cuantificación del analito.

Durante la validación inicialmente se trabaja con el analito a cuantificar, en este caso ácido benzoico, para evaluar si el equipo lo detecta adecuadamente y conocer las cantidades máxima y mínima de detección que representan los límites del intervalo de operación, a partir de este intervalo se obtiene el intervalo lineal que es la curva de

calibración o curva estándar de trabajo. En seguida se cuantifica el analito en placebos adicionados para evaluar la interferencia de la matriz del producto además de la exactitud y precisión del método, esta prueba también se le conoce como estándar interno. Finalmente el método se aplica a las bebidas y se concluye sobre el comportamiento del método en diferentes matrices de producto.

4.1.1 Parámetros de validación.

En resumen, para validación del método es necesario determinar el valor de los siguientes parámetros:

- Coeficiente de variación del equipo.
- Límite de detección.
- Límite mínimo de cuantificación.
- Límite máximo de cuantificación.
- Intervalo de operación
- Intervalo lineal de operación, linealidad del equipo y del método.
- Exactitud y precisión inicial.

4.1.2 Definiciones de términos relacionados con validación.⁽⁴⁾⁽³²⁾

Linealidad: La linealidad de un sistema o un método analítico es su habilidad para asegurar que los resultados analíticos, los cuales pueden ser obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, son proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un intervalo determinado.

Intervalo: Concentraciones comprendidas entre los niveles superior en inferior de la sustancia (incluyendo estos niveles), en el cual se ha demostrado que el método descrito es preciso, exacto y lineal.

Exactitud: Concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Se expresa como el porcentaje de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas de sustancia.

Precisión: Grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una muestra homogénea de producto. Usualmente se expresa en términos de desviación estándar o coeficiente de variación. La precisión es una medida del grado de reproducibilidad y/o repetibilidad del método analítico bajo las condiciones de operación.

Repetibilidad: Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones (analista, tiempo, aparato, laboratorio, etc.)

Reproducibilidad: Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo condiciones diferentes (diferentes analistas, en diferentes días en el mismo y/o en diferentes laboratorios, utilizando el mismo y/o diferentes equipos).

Límite de detección: Es la mínima concentración de la sustancia en una muestra la cual puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas.

Límite mínimo de cuantificación: Es la menor concentración de la sustancia en una muestra que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables bajo las condiciones de operación establecidas.

Límite máximo de cuantificación: Es la mayor concentración de la sustancia en una muestra que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables bajo las condiciones de operación establecidas.

Especificidad: Es la habilidad del método analítico para obtener una respuesta debida únicamente a la sustancia de interés y no a otros componentes de la muestra.

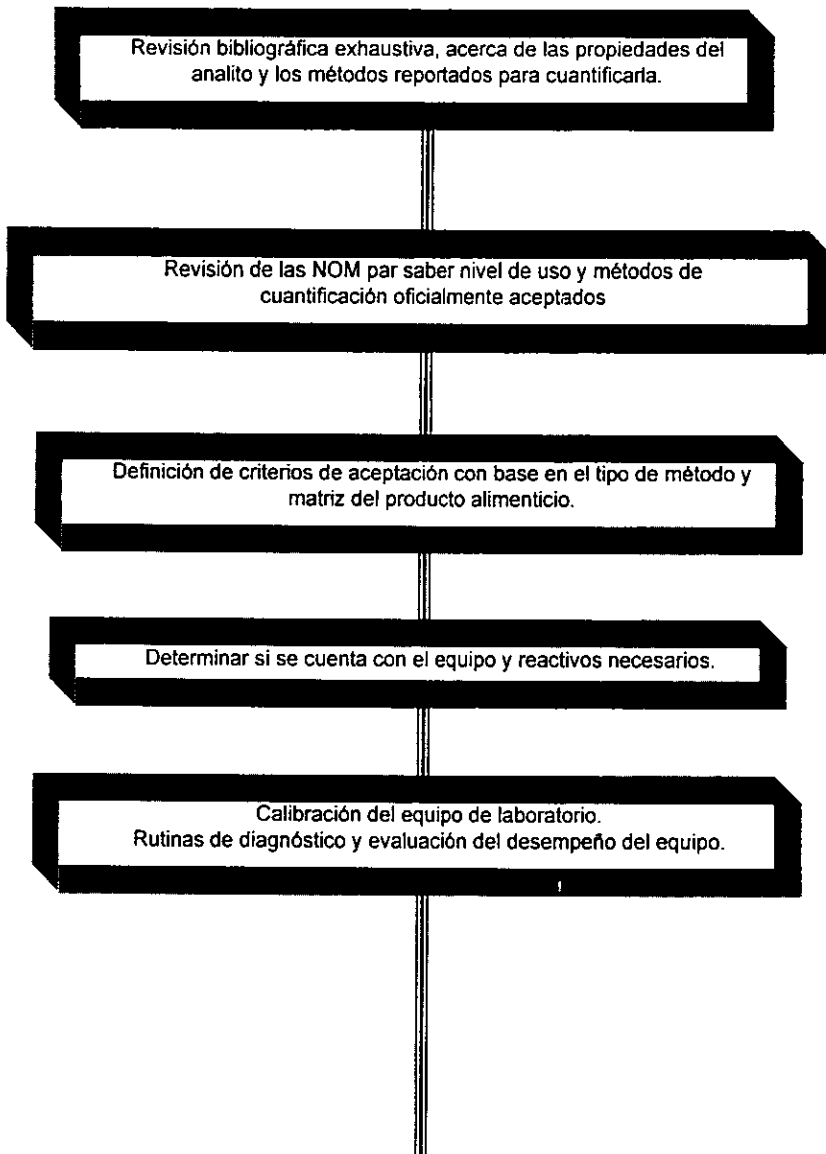
Tolerancia: Es el grado de reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos por el análisis de la misma muestra bajo modificaciones de las condiciones normales de operación, tales como diferentes temperaturas, lotes de reactivos, modificación de las diluciones, condiciones ambientales, cambio de marca de equipo, optimización en la instrumentación del espectrofotómetro, cambio de partes del equipo.

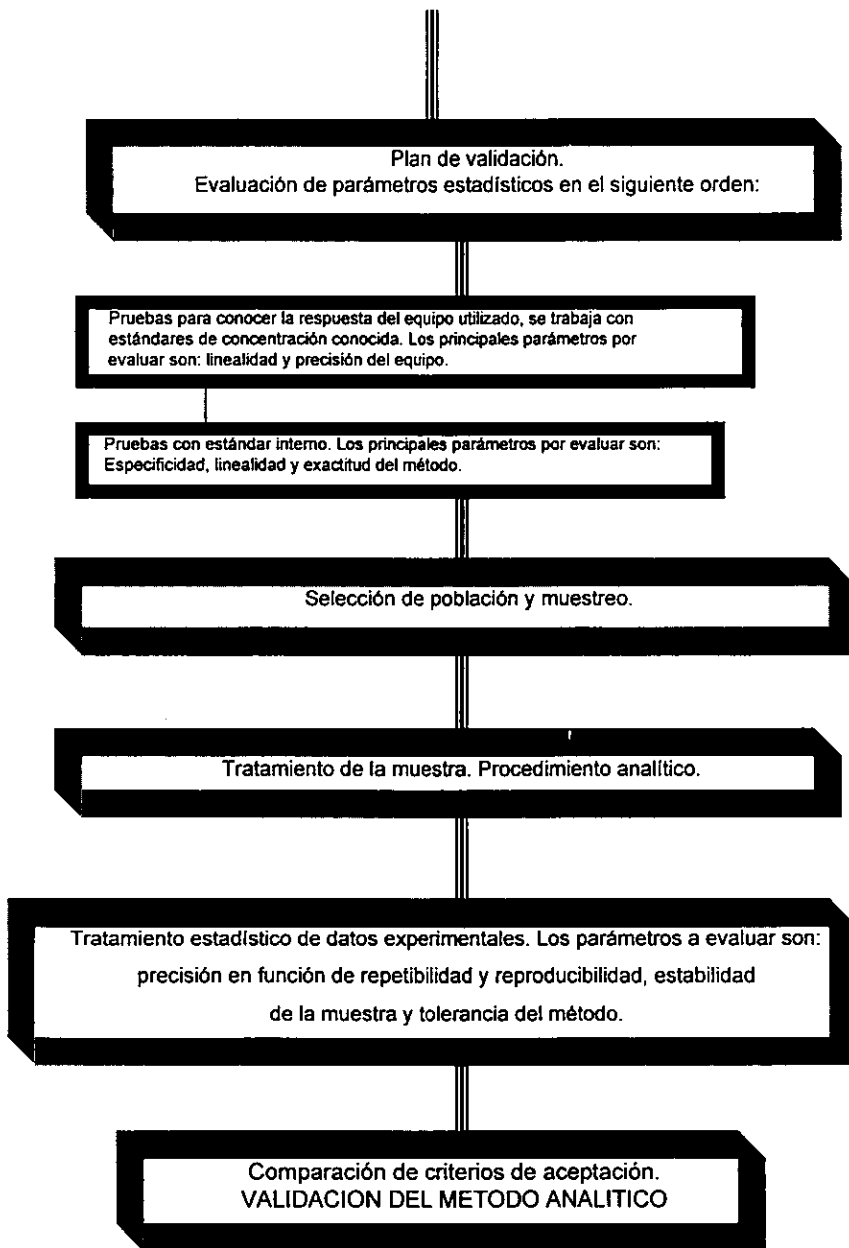
Estabilidad de la muestra: Es la propiedad de una muestra preparada para su cuantificación, de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración de la sustancia de interés, después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas.

NOM: Norma Oficial Mexicana.

Analito: Especie química de interés en el análisis.

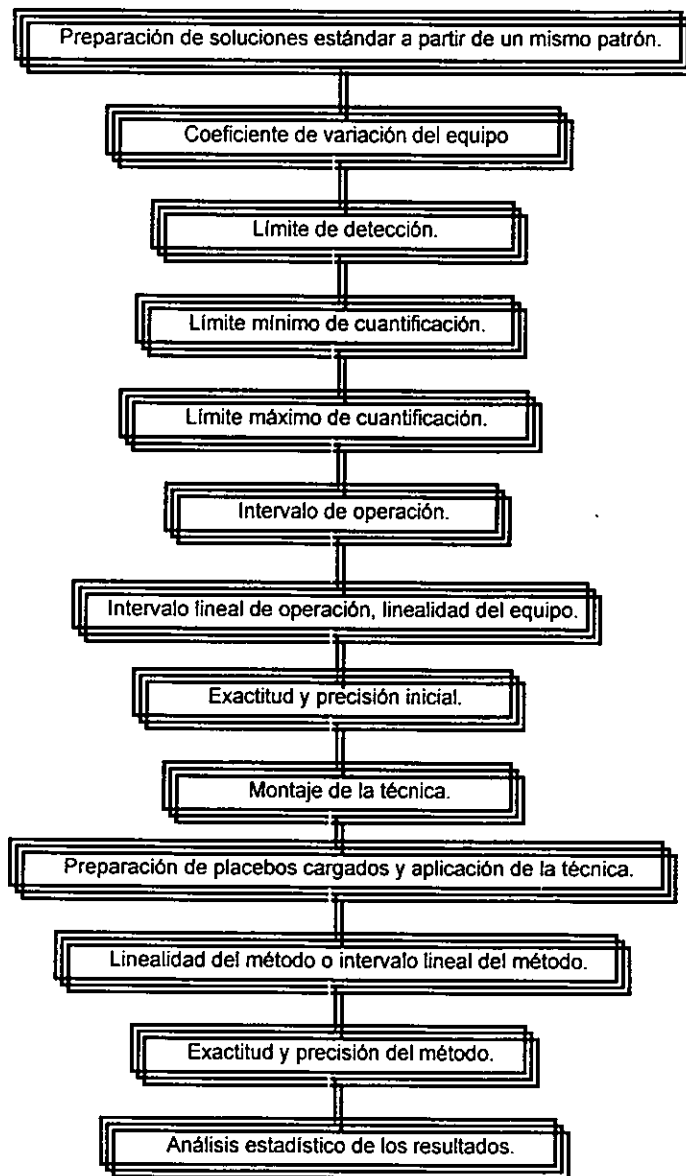
4.1.3 Diagrama de validación de un método analítico.





4.2 Plan de validación.

4.2.1 Diagrama del plan de validación.



4.2.2 Evaluación de parámetros.⁽⁴⁾⁽⁵⁾

4.2.2.1 Preparación de soluciones estándar.

Se prepararan soluciones estándar de ácido benzoico en metanol a partir de una misma solución patrón al 1.0% (se observó previamente que esta solución al 1% era muy saturada). El intervalo de concentraciones es de 0.0002% a 1% de ácido benzoico (este intervalo considera las concentraciones del orden de 10^{-3} que se incluyen en la curva patrón propuesta por el método a validar además de concentraciones muy diluidas para determinar el límite mínimo de detección y concentraciones saturadas para determinar el límite máximo de detección). Las soluciones estándar de concentraciones mínimas se hacen por dilución para evitar errores en la medición de bajas cantidades de solución patrón.

4.2.2.2 Límite de detección.

Para un método espectrofotométrico de UV/VIS el límite de detección lo constituye el mínimo valor de absorbancia que proporciona el detector, sin embargo este mínimo valor puede confundirse con el ruido del aparato por lo que no es confiable para la cuantificación del analito.

Para la mayoría de los espectrofotómetros se encuentra el valor del "ruido" y se le multiplica por 2 y al valor obtenido se le considera como la cantidad mínima detectada.

4.2.2.3 Límite mínimo de cuantificación.

Este valor es la mínima concentración del analito que se encuentra dentro del intervalo de operación y que cumple con el criterio de coeficiente de variación $\leq 3\%$, un coeficiente de correlación ≥ 0.995 y mantiene un pendiente de valor constante a los puntos sucesivos.

4.2.2.4 Límite máximo de cuantificación.

Este valor es la máxima concentración del analito que se encuentra dentro del intervalo de operación y que cumple con el criterio de coeficiente de variación $\leq 3\%$, un coeficiente de correlación ≥ 0.995 y mantiene una pendiente de valor constante a los puntos sucesivos, para un método espectrofotométrico este valor representa el punto donde el detector se satura y las lecturas hechas por el aparato no son confiables, debido a que, para valores de concentración mayores del límite máximo de cuantificación la absorbancia es constante. Gráficamente se representa como el punto donde la pendiente empieza a tener un valor de cero.

4.2.2.5 Intervalo de operación del equipo.

El intervalo de operación lo constituye el conjunto de valores de concentración del analito, que se encuentran comprendidos entre los límites mínimo y máximo de cuantificación cuya absorbancia cumpla con el criterio de coeficiente de variación $\leq 3\%$ y que exista una relación biunívoca entre el valor del estándar y la respuesta correspondiente que represente una pendiente de valor constante.

4.2.2.6 Linealidad del intervalo de operación del equipo.

Es la relación que se establece mediante una recta, entre una propiedad medida con la cantidad del analito, en el caso de un método analítico es la relación entre la concentración del analito a cuantificar y la respuesta del equipo.

Para un método espectrofotométrico de UV/vis se obtiene construyendo un gráfica con los valores de absorbancia o respuesta del espectrofotómetro en el eje de las "y" contra la concentración de las soluciones estándar en el eje de las "X" obteniéndose una relación biunívoca entre el valor de concentración de la solución estándar y la respuesta correspondiente. Se elige en ésta el intervalo al cual se le pueda asignar una relación lineal, ésta debe contener al menos 5 puntos experimentales. Para elegir el intervalo lineal hay que calcular; la pendiente, ordenada al origen y el coeficiente de correlación por el método de mínimos cuadrados y comparar los valores con los establecidos; para el coeficiente de correlación debe ser mayor o igual a 0.995 para poder aceptar la recta elegida. De no ser así, se debe elegir otro intervalo al cual se le pueda asignar una relación lineal, hay que recordar que debe contener al menos cinco puntos experimentales.

4.2.2.7 Exactitud y precisión inicial.

Preparar a partir de una solución patrón, diez soluciones estándar de concentración conocida con valor nominal dentro del intervalo lineal del método, leer cada estándar en el espectrofotómetro, obteniendo al menos cinco lecturas de cada solución.

Para cada solución leída calcular: promedio, desviación estándar, coeficiente de variación y error porcentual. Verificar que el coeficiente de variación sea menor o igual a 3% de ser así, continuar, en caso contrario detectar el error y corregirlo, puede ser que el equipo no esté lo suficientemente bien calibrado o hubo error en la preparación de las soluciones. Calcular el porcentaje de error (%E) para cada una de las muestras según la ecuación:

$$\%Error = \frac{conc. calculada - conc. nominal}{conc. nominal} * 100$$

donde la concentración calculada es la concentración obtenida a partir de la curva de calibración y la concentración nominal es la preparada.

La exactitud inicial del método es el promedio de los diez valores de porcentaje de error.

Calcular el promedio de los diez valores de desviación estándar de la experiencia anterior, el promedio obtenido representa el valor de precisión inicial del equipo.

4.2.2.8 Linealidad del método.

Se determina a partir de placebos adicionados con la sustancia de interés, cada uno de manera independiente, utilizando un mínimo de tres concentraciones incluyendo el 100% (en este caso 0.03% de benzoato de sodio) haciendo el análisis por triplicado para cada muestra.

El objetivo de esta determinación es conocer el intervalo de concentraciones en el cual la respuesta es lineal, en este intervalo la matriz de alimento no debe presentar ninguna interferencia para la cuantificación del analito o en su defecto esta interferencia estará atenuada al mínimo. Se construye la gráfica de cantidad adicionada contra cantidad recuperada (recobro).

El intervalo lineal del método se obtiene aplicando la técnica a los placebos cargados y a partir de los resultados obtenidos calcular el recobro, éste se obtiene al calcular para cada valor de absorbancia, la concentración que le correspondería en la curva de calibración hecha con las soluciones estándar y que cumpla los criterios señalados. Esta concentración obtenida de la curva de calibración se le denomina "concentración calculada" para diferenciarla de la "concentración nominal" obtenida de cada estándar.

El recobro es el cociente entre la "concentración calculada" y la "concentración nominal" multiplicado por cien, el resultado se expresa en porciento (%).

$$\% \text{ recobro} = \frac{\text{concentracion calculada}}{\text{concentracion nominal}} * 100$$

Recobros del 100% significan que no existe diferencia entre la concentración calculada y la concentración nominal.

Con al menos 5 datos obtenidos de la experiencia anterior se construye una gráfica de concentración calculada (en el eje de las " y ") contra concentración nominal (en el eje de las " x "), para la recta obtenida calcular por el método de mínimos cuadrados la pendiente, la ordenada al origen y el coeficiente de correlación.

El intervalo de operación del método, será el conjunto de valores de concentración del analito cuya recta cumpla con lo siguiente:

Pendiente de la recta:	$m = (1 \pm 0.03)$
Ordenada al origen:	$b = (0 \pm 0.03)$
Coefficiente de correlación:	$r \geq 0.995$
Porciento de recobro	$\%R = (100 \pm 10)\% \text{ }^{(4)}$

4.2.2.9 Exactitud inicial del método.

Preparar a partir de un estándar, diez muestras con valores nominales dentro del intervalo lineal del método, realizar la determinación para cada muestra, en las mismas condiciones de operación y por el mismo analista, obteniendo al menos 5 lecturas de cada muestra.

Para cada muestra determinada calcular promedio, desviación estándar, coeficiente de variación y error porcentual. Verificar que el coeficiente de variación sea menor o igual a diez porciento, de ser así continuar, en caso contrario detectar el error y corregirlo, puede ser que el intervalo lineal no sea el correcto o que la aplicación de la técnica se salió de control. Calcular el porciento de error (%E) para cada una de las muestras según la ecuación:

$$\% \text{Error} = \frac{\text{conc. calculada} - \text{conc. nominal}}{\text{conc. nominal}} * 100$$

La exactitud inicial del método es el promedio de los diez valores del porciento de error.

4.2.2.10 *Precisión inicial del método.*

Calcular el promedio de los diez valores de desviación estándar de la experiencia anterior, el promedio obtenido representa el valor de precisión inicial del método.

PARTE EXPERIMENTAL

Capítulo 5

EXPERIMENTACIÓN

En este capítulo se presentan todas las técnicas llevadas a cabo en el trabajo experimental, desde las rutinas de calibración del equipo hasta la aplicación del método 960.38 del AOAC a las bebidas de frutas. Algunas de ellas aparecen en forma de diagramas de flujo y otras de manera más detallada según el grado de dificultad de cada una, sin embargo cada paso sigue el orden establecido en el diagrama 4.1.3 al igual que cada experiencia del plan de validación según el diagrama 4.2.1, ambos se encuentran en el capítulo 4.

Los resultados obtenidos de cada experiencia aparecen en el capítulo siguiente siguiendo el mismo orden de este capítulo.

5.1 Metodología de rutinas de diagnóstico.^(21,22) (diagramas)

5.1.1 Encendido del equipo.

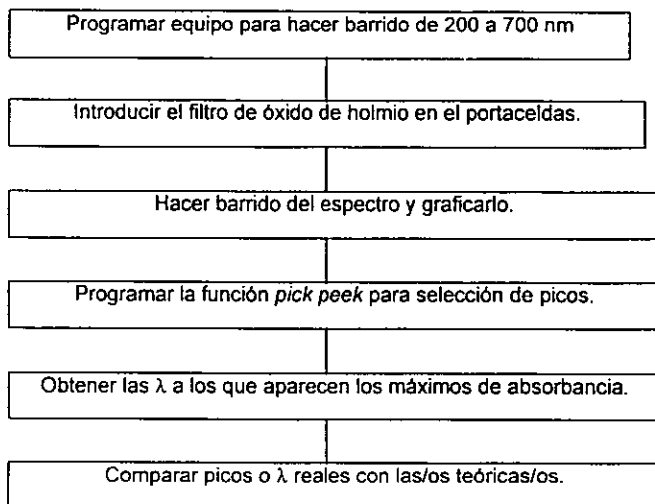
Antes de empezar a preparar las soluciones se debe encender el equipo y la lámpara de deuterio y/o tungsteno. Se lleva a cabo la función *línea base* con:

- aire en la zona de 1000 a 190 nm
- agua destilada en la zona de 400 a 190 nm.
- éter etílico o metanol en la zona de 400 a 250 nm.

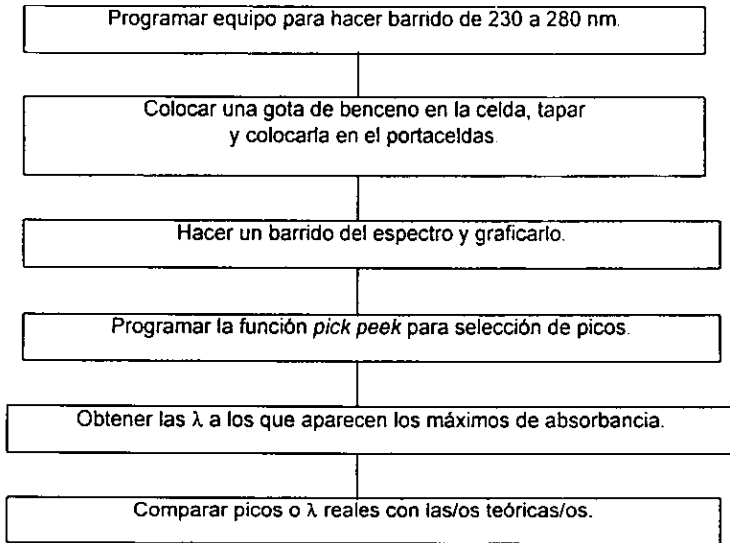
Se debe trabajar con la celda de referencia y la cara seleccionada.

Una vez hecho lo anterior el equipo está listo para trabajar con él.

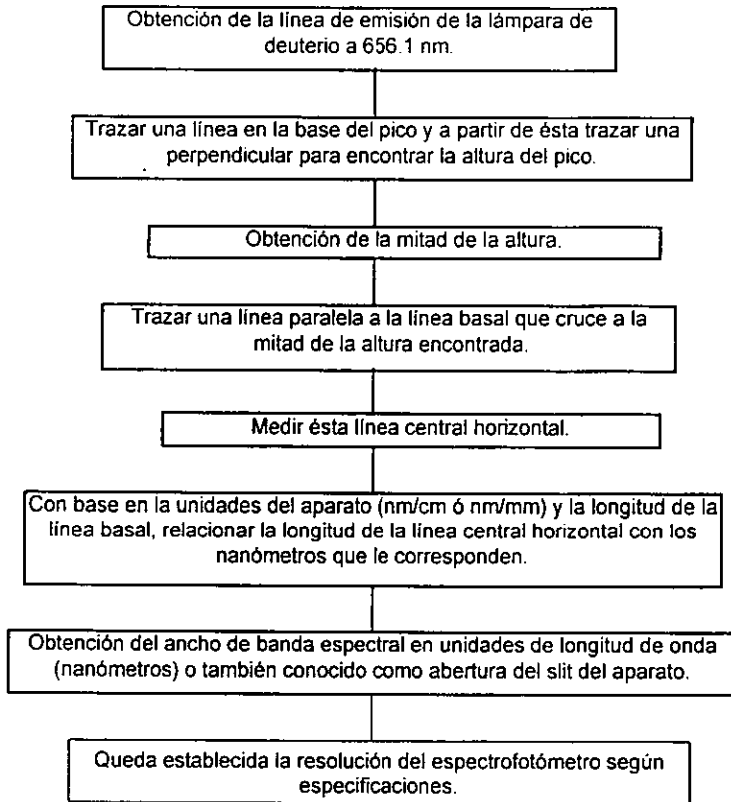
5.1.2 Exactitud de longitud de onda con filtro de óxido de holmio.



5.1.3 Exactitud de longitud de onda con vapor de benceno.



5.1.4 Ancho de banda espectral.



5.1.5 Linealidad fotométrica.

Aseguramiento de la saturación del detector.

Preparación de curva de calibración con $K_2Cr_2O_4$

Material

Espátula de acero inoxidable.
Pipeta volumétrica de 5 mL
Pipetas volumétricas de 10 mL
Pipeta volumétrica de 2 mL
Pipetas volumétricas de 1 mL.
Propipeta
Pipeta Gilson 1000 y puntas para pipeta.
Matraz aforado de 500 mL
Matraz aforado de 250 mL
Matraces aforados de 50 mL
Vasos de precipitados de 250 mL

Reactivos

Agua destilada
 H_2SO_4 0.1N normalizado
Sales de $K_2Cr_2O_4$.

Metodología

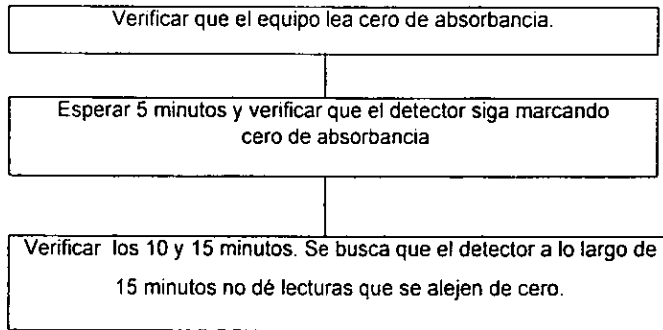
Preparación de solución patrón $K_2Cr_2O_4$ de concentración 1.0 g/L en solución 0.01N de H_2SO_4 .

- Preparación de solución 0.01N de H_2SO_4 .
 - Medir 5 mL de H_2SO_4 0.1N con pipeta volumétrica.
 - Transferir a un matraz aforado de 500 mL
 - Aforar con agua destilada.
- Preparación de solución patrón de $K_2Cr_2O_4$.
 - Pesar 0.2520 gramos de $K_2Cr_2O_4$ en un matraz aforado de 250 mL .
 - Disolver y aforar con solución de H_2SO_4 al 0.01N.
- Preparación de soluciones estándar.
 - Rotular del 1 al 14 cada uno de los matraces aforados de 50 mL.
 - Con ayuda de las pipetas volumétricas de capacidad correspondiente y de la micropipeta, medir la cantidad necesaria de solución patrón de 1.0g/L de $K_2Cr_2O_4$ para preparar cada uno de los estándares según la tabla siguiente.

Matraz	Concentración g/L	mL solución patrón
1	0.8	40.0
2	0.4	20.0
3	0.2	10.0
4	0.18	9.0
5	0.16	8.0
6	0.14	7.0
7	0.12	6.0
8	0.10	5.0
9	0.08	4.0
10	0.06	3.0
11	0.04	2.0
12	0.02	1.0
13	0.004	0.2
14	0.002	0.1

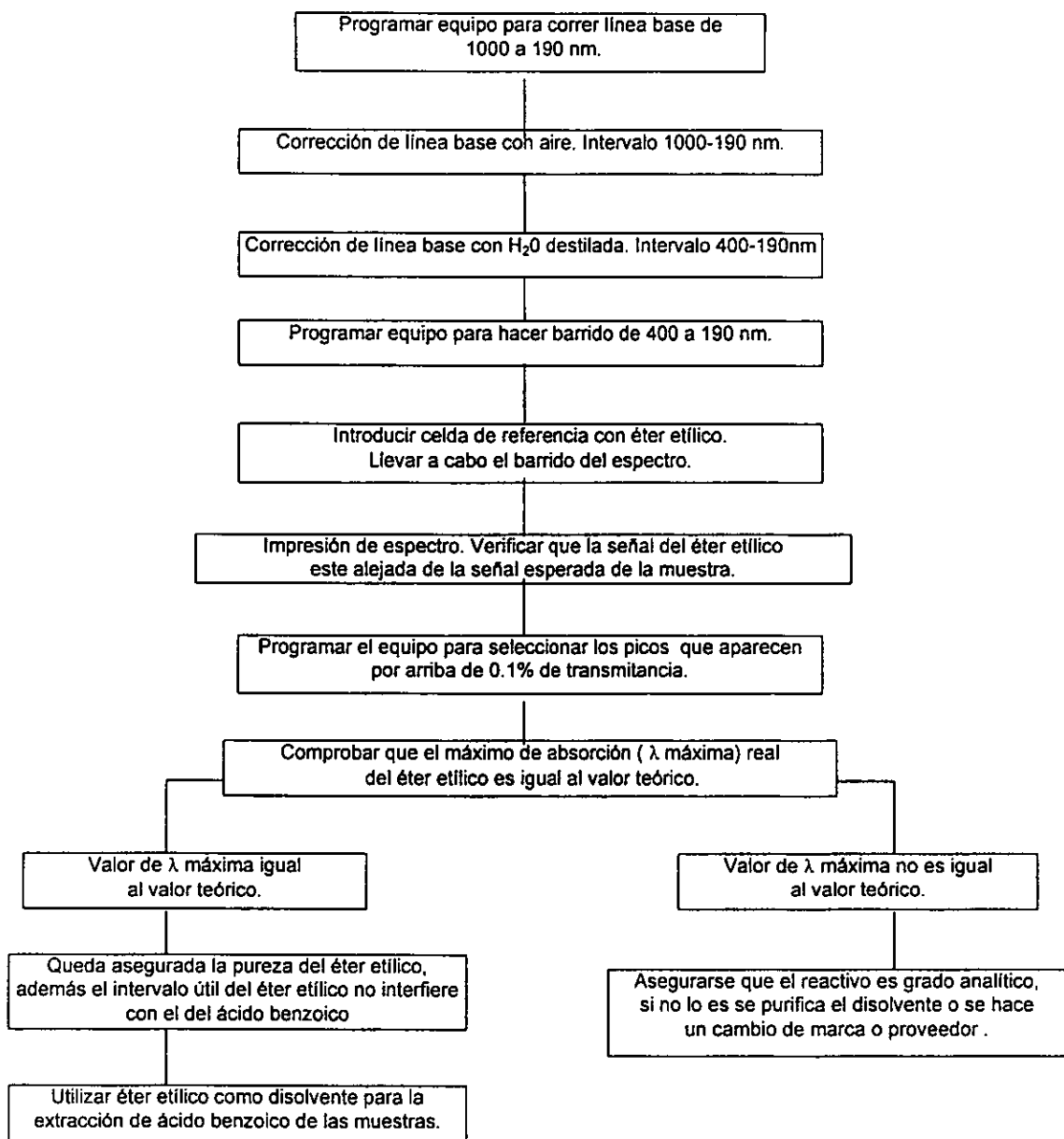
- Aforar con solución de H_2SO_4 0.01N.
- Obtención de los valores de absorbancia para elaborar la curva de calibración.
 - Encender equipo.
 - Programar equipo para correr línea base de 400 a 190 nm con aire.
 - Programar equipo para correr línea base de 400 a 190 nm con blanco de reactivos. esto es con solución de H_2SO_4 0.01N en la celda de referencia con la cara A hacia el detector.
 - Programar equipo para hacer curva de calibración.
 - Leer cada solución estándar a 257.0 nm (según especificaciones del fabricante), utilizar celda de muestra con la cara A hacia el detector.
 - Obtener gráfico de curva de calibración y tabla de calibración.

5.1.6 Nivel de ruido.



5.2 Selección del disolvente.

5.2.1 Diagrama de análisis de éter etílico y determinación del máximo de absorción.



5.3 Curvas de calibración de ácido benzoico con éter etílico.

1ª CURVA (intervalo 1.0% a 0.0002%)

5.3.1 Preparación de soluciones estándar.

Material

Espátula de acero inoxidable.
Pipetas volumétricas de 5 mL
Pipetas volumétrica de 2 mL
Pipetas volumétricas de 1 mL
Pipeta volumétrica de 0.1 mL.
Propipeta
Matraz aforado de 50 mL
Matraces aforados de 10 mL
Vasos de precipitados de 150 mL
Vaso de precipitados de 100 mL

Reactivos

Agua destilada
Éter etílico
Cristales de ácido benzoico RA.

Metodología

- Rotular 11 matraces aforados de 10 mL del 1 al 11 excepto el matraz aforado número 3 que será de 50 mL a partir del cual se prepararán las soluciones estándar de menores concentraciones.
- Pesar 0.5 gramos de ácido benzoico en matraz de 50 mL, disolver cristales con éter etílico y llevar al aforo con el mismo disolvente.
- Preparar las soluciones patrón de acuerdo con la siguiente tabla, utilizar pipetas volumétricas de capacidad según sea el caso. Aforar con éter etílico.

Matraz	concentración (%)	mL solución patrón
1	0.1	1.0
2	0.03	0.3
3	0.01	5.0

- Preparar soluciones estándar a partir del matraz número 3 de concentración 0.01% de ácido benzoico de acuerdo con la siguiente tabla. Utilizar pipetas volumétricas limpias. Aforar con éter etílico.

Matraz	concentración (%)	mL solución 0.1%
4	0.008	8.0
5	0.006	6.0
6	0.004	4.0
7	0.002	2.0

- Preparar soluciones estándar por dilución a partir de los matraces 4, 5, 6 y 7 según la siguiente tabla, en cada caso utilizar una pipeta volumétrica de 1 mL diferente. Aforar con éter etílico.

Matraz	concentración (%)	mL solución
8	0.0008	1 mL solución 0.008%
9	0.0006	1 mL solución 0.006%
10	0.0004	1 mL solución 0.004%
11	0.0002	1 mL solución 0.002%

- Leer cada estándar en un espectrofotómetro a 271.5 nm, utilizar celda de muestra con la cara seleccionada hacia el detector.

2ª CURVA (intervalo 0.01% a 0.0001%) con control de temperatura y control de aforo.

5.3.1 Preparación de soluciones estándar.

Material

Espátula de acero inoxidable.
 Pipeta volumétrica de 5 mL
 Pipeta volumétrica de 2 mL
 Pipetas volumétricas de 1 mL
 Propipeta
 Matraz aforado de 50 mL
 Matraces aforados de 10 mL
 Vasos de precipitados de 150 mL
 Vaso de precipitado de 100 mL
 Charola de plástico o baño de hielo.

Reactivos

Agua destilada
 Éter etílico
 Cristales de ácido benzoico RA.
 Hielo.

Antes de empezar a preparar las soluciones se debe encender el equipo y la lámpara de deuterio. Se lleva a cabo la función línea base con:

- aire en la zona de 400 a 190 nm
- agua destilada en la zona de 400 a 190 nm.
- éter etílico en la zona de 400 a 250 nm.

Se debe trabajar con la celda de referencia y la cara seleccionada.

Metodología

- Rotular 13 matraces aforados de 10 mL del 1 al 13.
- Pesar 0.5 gramos de ácido benzoico en matraz de 50 mL, disolver cristales con éter etílico y llevar al aforo con el mismo disolvente. Introducir matraz en hielo.
- Transferir a cada matraz la cantidad de solución patrón según la tabla siguiente utilizando pipetas volumétricas previamente enfriadas de 1, 2 ó 5 mL según sea el caso.

Matraz	concentración %	mL solución patrón
1	0.008	8.0
2	0.007	7.0
3	0.006	6.0
4	0.005	5.0
5	0.004	4.0
6	0.003	3.0
7	0.002	2.0
8	0.001	1.0

- Aforar el matraz número 1 con éter etílico, medir temperatura de la solución (ésta temperatura inicial debe ser igual en todos los matraces), inmediatamente leer en el espectrofotómetro a 271.5 nm., utilizando la celda de la muestra y la cara seleccionada, una vez leída la solución se introduce el matraz en hielo. De esta misma forma se trabaja con el resto de los matraces procurando que el tiempo entre el aforo y la lectura sea mínimo para evitar errores por evaporación del disolvente.
- Sacar del hielo los matraces 4, 5, 6, 7 y 8, esperar a que lleguen a la temperatura inicial.
- A partir de las soluciones de los matraces 4, 5, 6, 7 y 8 preparar las soluciones estándar por dilución de acuerdo con la tabla siguiente, en cada caso utilizar una pipeta volumétrica de 1 mL diferente.

Matraz	concentración %	mL solución
9	0.0005	1 mL solución 0.005%
10	0.0004	1 mL solución 0.004%
11	0.0003	1 mL solución 0.003%
12	0.0002	1 mL solución 0.002%
13	0.0001	1 mL solución 0.001%

- Aforar el matraz número 9 con éter etílico, medir temperatura de la solución (ésta temperatura inicial debe ser igual en todos los matraces), inmediatamente leer en el espectrofotómetro a 271.5 nm., utilizando la celda de la muestra y la cara seleccionada, una vez leída la solución se introduce el matraz en hielo. De esta misma forma se trabaja con el resto de los matraces procurando que el tiempo entre el aforo y la lectura sea mínimo para evitar errores por evaporación del disolvente.

3ª CURVA intervalo 1.0% - 0.01% de ácido benzoico con control de temperatura y control de aforo.

5.3.1 Preparación de soluciones estándar.

Material

Espátula de acero inoxidable.
Pipeta volumétrica de 5 mL
Pipeta volumétrica de 1 mL
Pipeta volumétrica de 0.1 mL
Propipeta
Matraz aforado de 50 mL
Matraces aforados de 10 mL
Vaso de precipitados de 100 mL
Charola de plástico o baño de hielo.

Reactivos

Agua destilada.
Eter etílico.
Cristales de ácido benzoico RA.
Hielo.

Realizar el trabajo previo al igual que en los experimentos anteriores.

Metodología

- Rotular 6 matraces aforados de 10 mL del 1 al 6.
- Pesar 5.0 gramos de ácido benzoico en matraz de 50 mL, disolver cristales con éter etílico y llevar al aforo con el mismo disolvente.
- Preparar soluciones estándar a partir de la solución patrón anterior; utilizar pipetas volumétricas de 0.1, 1 y 5 mL según sea el caso.
- Transferir a cada matraz la cantidad de solución patrón según la tabla siguiente utilizando pipetas volumétricas previamente enfriadas de 0.1, 1, ó 5 mL según sea el caso.

Matraz	concentración (%)	mL solución patrón
1	0.5	5.0
2	0.1	1.0
3	0.09	0.9
4	0.07	0.7
5	0.03	0.3
6	0.01	0.1

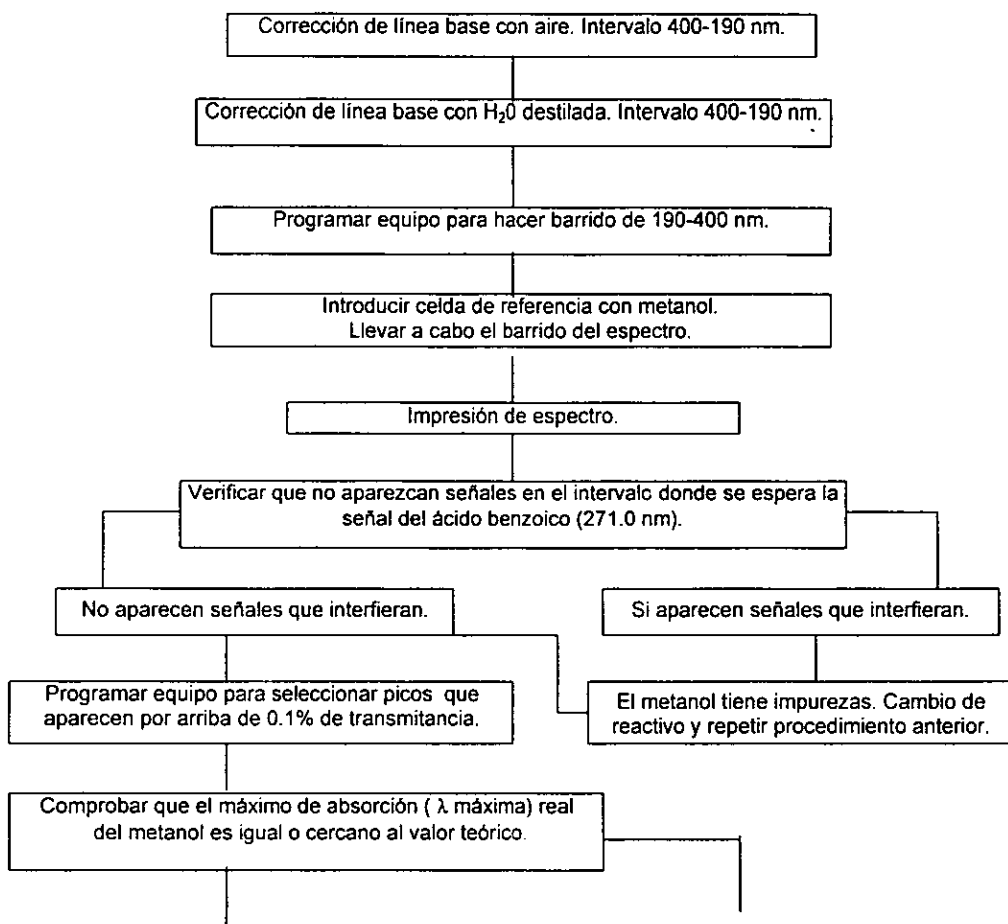
- Aforar el matraz número 1 con éter etílico, medir temperatura de la solución (ésta temperatura inicial debe ser igual en todos los matraces), inmediatamente leer en el espectrofotómetro a 271.5 nm., utilizando la celda de la muestra y la cara seleccionada, una vez leída la solución se mete el matraz en hielo. De esta misma forma se trabaja con el resto de los matraces procurando que el tiempo entre el aforo y la lectura sea mínimo para evitar errores por evaporación del disolvente.

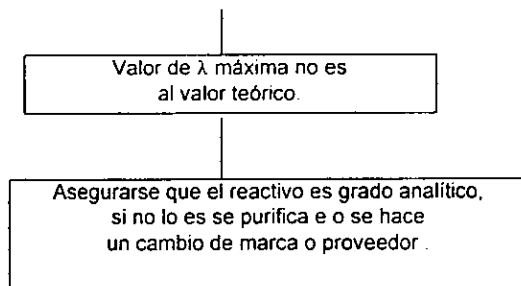
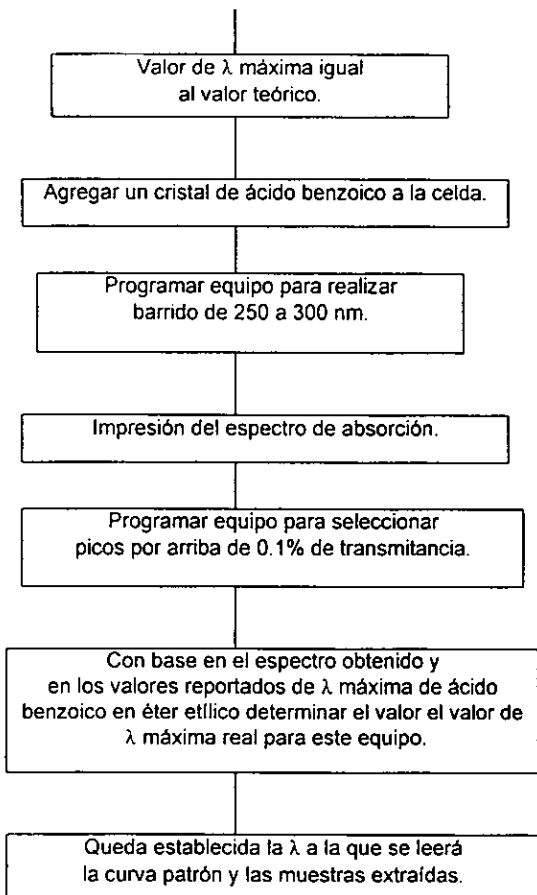
5.4 Estudio cinético de evaporación de éter etílico.

- A partir de la solución patrón de concentración 0.01% de ácido benzoico, preparar por dilución (en un matraz aforado de 10 mL.) una solución de concentración 0.003% de ácido benzoico en éter etílico.
- Sin control de temperatura ni control de aforo, leer en el espectrofotómetro la solución estándar de 0.003% a 271.0 nm. Este será el valor de absorbancia al tiempo cero.
- Leer la solución estándar de 0.003% primero cada minuto y después cada 3 minutos.
- Construir una gráfica de absorbancia contra tiempo en minutos.

5.5 Cambio de disolvente.

5.5.1 Diagrama de bloques del procedimiento de cómo se analizó el metanol y se determinó el máximo de absorción.





5.5.2 Preparación de curvas de calibración de ácido benzoico con metanol.

5.5.2.1 Preparación de soluciones estándar.

Material

Espátula de acero inoxidable.
Pipetas volumétrica de 5 mL
Pipetas volumétrica de 1 mL
Pipetas volumétricas de 1 mL
Pipetas volumétricas de 2 mL
Propipeta
Matraz aforado de 50 mL
Matraces aforados de 10 mL
Vasos de precipitados de 250 mL
Vaso de precipitados de 100 mL.

Reactivos

Agua destilada
Metanol.
Ácido benzoico RA.

Metodología

Preparación de solución patrón de ácido benzoico al 1.0%.

- Rotular los matraces aforados de 10 mL con números del 1 al 14, asignando el número 3 al matraz aforado de 50 mL.
- Pesar por diferencia 0.1016 g de ácido benzoico en matraz 1.
- Disolver cristales con metanol y llevar al aforo con el mismo reactivo.
- Leer en espectrofotómetro a 271.5 nm. Introducir matraz en hielo.
- Tomar 1 mL de esta solución con ayuda de una pipeta volumétrica de 1 mL y transferir a al matraz 2, llevar al aforo con metanol. Esta es la solución estándar al 0.1%.
- Leer en espectrofotómetro a 271.5 nm. Introducir matraz en hielo.
- Tomar 5 mL de la solución del matraz 2, con ayuda de una pipeta volumétrica de 5 mL y transferirlos al matraz 3.
- Tomar 3 mL de solución del matraz 2 con ayuda de pipetas volumétricas de 2mL y 1 mL, transferir a matraz 4.
- Llevar al aforo al matraz 3 con metanol y leer en el espectrofotómetro. Esta es la solución estándar al 0.01%. Introducir matraz en hielo.
- Llevar al aforo al matraz 4 con metanol y leer en espectrofotómetro. Esta es la solución estándar al 0.03%. Introducir matraz en hielo.
- Sacar el matraz 3 del hielo, comprobar que la temperatura de la solución sea 26°C. A partir de esta solución se preparan las soluciones estándar al 0.0002%, 0.0004%, 0.0006% y 0.0008% de ácido benzoico, según la tabla siguiente:

Matraz	% ácido benzoico	mL solución al 0.01%
5	0.002	2.0
6	0.004	4.0
7	0.006	6.0
8	0.008	8.0

Nota: utilizar pipeta volumétrica de 2mL para medir volúmenes requeridos.

- Llevar al aforo al matraz 5 y leer en espectrofotómetro, introducir matraz en hielo.
- Hacer lo mismo con los matraces 6, 7 y 8, procurando introducir el matraz en hielo tan pronto como se afore.
- A partir de los matraces 5, 6, 7 y 8 a 26 °C, preparar las soluciones estándar según la tabla siguiente:

Matraz	% ácido benzoico	agregar:
9	0.0002%	1 mL de solución del matraz 5.
10	0.0004%	1 mL de solución del matraz 6
11	0.0006%	1 mL de solución del matraz 7
12	0.0008%	mL de solución del matraz 8

- Llevar al aforo al matraz 9 y leer en espectrofotómetro, introducir matraz en hielo.
- Hacer lo mismo con los matraces 10, 11 y 12., procurando introducir el matraz en hielo tan pronto como se afore.
- A partir de los matraces 9 y 12 a 26°C, preparar las soluciones estándar según la tabla siguiente:

Matraz	% ácido benzoico	Agregar:
13	0.00002%	1 mL de solución del matraz 9
14	0.00008%	1 mL de solución del matraz 12

- Llevar al aforo al matraz 13 y 14 y leer en espectrofotómetro, introducir matraz en hielo.
- Una vez obtenidas las absorbancias de cada solución se hace el tratamiento de datos y la construcción de gráficas bajo los criterios de aceptación del plan de validación.

5.5.3 Exactitud y precisión inicial. Preparación de 10 soluciones estándar al 0.004%.

Material

Espátula de acero inoxidable.
 Pipeta volumétrica de 5 mL
 Pipetas volumétricas de 1 mL
 Pipeta volumétrica de 2 mL
 Propipeta
 Matraz aforado de 50 mL
 Matraces aforados de 10 mL

Reactivos

Agua destilada
 Metanol grado analítico.
 Ácido benzoico RA.

Metodología

- Rotular 10 matraces aforados de 10 mL con números del 1 al 10.
- Pesar por diferencia 0.1016 g de ácido benzoico en un matraz de 10 mL.
- Disolver cristales con metanol y llevar al aforo con el mismo reactivo.
- Tomar 1 mL de esta solución con ayuda de una pipeta volumétrica de 1 mL y transferir a otro matraz aforado de 10 mL, llevar al aforo con metanol. Esta es la solución estándar al 0.1%.
- Tomar 5 mL de la solución al 0.1% con ayuda de una pipeta volumétrica de 5 mL y transferirlos al matraz aforado de 50 mL, llevar al aforo con metanol. Esta es la solución estándar al 0.01%.
- Transferir 4 mL de solución al 0.01% a cada uno de los matraces previamente rotulados.
- Llevar al aforo al primer matraz con metanol y leer 10 veces esta dilución a 271.5 nm. en espectrofotómetro, hacer lo mismo para cada matraz llevando un control de tiempo entre cada aforo y lectura.

5.6 Población y muestreo.

La selección de la población se hizo con base en el criterio que el método a validar debe ser valuado con un mismo producto alimenticio pero diferentes matrices.

La población fué bebidas de frutas con contenido de jugo o pulpa natural especificado en la etiqueta de la misma forma que el contenido de ácido benzoico como conservador.

El muestreo se hizo de una misma marca de bebida, previamente escogida al azar, diferentes sabores y misma presentación.

La colecta de muestras se hizo en el mismo supermercado, mismo anaquel y mismo día.

El volumen de muestra inicial fue de 2 L. Para cada sabor, que se reunió a partir de diferentes botes de un mismo sabor.

Se encontró que las bebidas de frutas seleccionadas tienen diferentes contenidos de pulpa o jugo según el sabor.

5.7 Montaje de la técnica analítica. Técnica analítica por validar.

A continuación se presenta el método validado según se llevo a cabo en el laboratorio, esto es; con cambio de disolvente y utilizando un espectrofotómetro de un haz a diferencia del método originalmente propuesto por AOAC que está diseñado para utilizar un espectrofotómetro Beckman DU que es un modelo bastante antiguo. Este método original aparece en el apéndice al final este trabajo.

El método se aplicó en 12 muestras de bebidas de frutas de diferentes sabores y misma presentación. El análisis se hizo por triplicado para cada muestra.

5.7.1 Método oficial 960.38 de AOAC. Acido benzoico en alimentos no sólidos y bebidas.

Método espectrofotométrico.

Aplicable a catsup, otros productos de jitomate, jaleas, gelatinas, bebidas con bajo contenido de alcohol, bebidas ligeras y jugos de frutas. No aplica para sólidos.

PREPARACION DE LA CURVA ESTÁNDAR.

1. Preparar soluciones estándar de 0.002 a 1.0% de ácido benzoico en metanol según la sección 5.5.2 del capítulo 5. Este amplio intervalo de concentraciones incluye a las originalmente propuestas (20-100 mg/L).
2. Leer cada solución a 271.0 nm según lo establecido en el diagrama de flujo que aparece en la sección 5.5.1 del capítulo 5.
3. Graficar los valores de absorbancia obtenidos contra la concentración correspondiente.

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.

1. Mezclar la muestra perfectamente.
2. Transferir 10g o 10 mL a un embudo de extracción y diluir a 200 mL con solución saturada de NaCl.
3. Acidificar la muestra a pH 2 con 2 gotas de HCl concentrado, verificar con papel pH.
4. Agitar bien.

DETERMINACIÓN.

1. Extraer la muestra acidificada con porciones de 70, 50, 40 y 30 mL de éter etílico, agitar bien para asegurar la completa extracción, la fase acuosa quedará abajo por lo que se recolectará en un vaso de precipitados limpio y debidamente rotulado volviendo a llenar el embudo de extracción para continuar extrayéndola. Si hay formación de una emulsión se debe romper ya sea por centrifugación o por precipitación.
2. Juntar las fases orgánicas en un vaso de precipitados limpio debidamente rotulado. Una vez echas las 4 extracciones desechar la fase acuosa.
3. Lavar extracto etéreo con porciones de 50, 40 y 30 mL de HCl al 0.001% y desechar los lavados.
4. Extraer el extracto etéreo con porciones de 50, 40, 30 y 20 mL de NH_4OH al 0.1% y una vez echas las 4 extracciones desechar la fase etérea. Juntar los lavados en un vaso de precipitados limpio y debidamente rotulado.
5. Neutralizar en un potenciómetro (previamente calibrado con solución buffer pH=7), los lavados de NH_4OH con HCl concentrado. Acidificar solución a pH 2.
6. Extraer la solución acidificada con porciones de 70, 50, 40 y 30 mL de éter etílico.
7. Juntar las fases orgánicas en un vaso de precipitados limpio debidamente rotulado.
8. Transferir el extracto etéreo a un matraz bola limpio y debidamente rotulado.

9. Conectar el matraz al rotavapor, poner en contacto el matraz con el baño de agua a 35°C y evaporar completamente el disolvente.
10. Diluir el contenido del matraz con 100 mL de metanol, agitar moderadamente.
11. Leer la muestra a 271.5 nm. en el espectrofotómetro previamente encendido y hechas las rutinas de línea base con aire, agua destilada y metanol en el intervalo correspondiente.
12. Determinar la concentración de ácido benzoico de la muestra a partir de la curva estándar considerando la dilución de la muestra inicial.
13. Reportar los datos obtenidos considerando que:

$$\% \text{benzoato de sodio} = \% \text{ácido benzoico} * 1.18$$

14. Hacer tratamiento estadístico tomando en cuenta los criterios de aceptación.

5.7.2 Preparación del placebo

Formulación del concentrado

Pulpa de fresa	35.9%
Azúcar	34.6%
Sorbato de potasio	0.042%
Acido cítrico	0.53%
Acido ascórbico	0.053%
Goma indica F	0.42%
Sabor fresa	0.051%
Color fresa	0.021%
Agua	38.4%

Se prepararon 500 g de concentrado de fresa y a partir de éste se hizo por dilución una bebida de fresa con 12% de pulpa como el producto comercial que se analizó.

$$V_1 = (12\%) (1000 \text{ mL}) / 35.9\% = 334.7 \text{ mL de concentrado de fresa para 1 L de bebida al 12\%}$$

Se prepararon 5 placebos cargados de 100 mL cada uno, adicionados con 0, 0.01, 0.03, 0.06 y 0.09 gramos de benzoato de sodio grado alimenticio.

5.7.3 Linealidad del método.

Una vez preparados los cinco placebos cargados que se les determinó ácido benzoico según el método 960.38 del AOAC descrito en la sección 5.7.1.

Material

Embudos de separación de 250 mL.
 Probeta de 250 mL
 Probetas de 100 mL.
 Propipeta
 Pipetas volumétricas de 10 mL
 Pipetas graduadas de 10 mL
 Matraces boía de 250 mL.
 Termómetro.
 Vasos de precipitado de 250 mL
 Vaso de precipitado de 100 mL.

Reactivos

Agua destilada
 Solución de HCl al 0.001%
 Solución de NH₄OH al 0.1%.
 Solución saturada de NaCl.
 Metanol.
 Eter etílico.

Vasos de precipitados de 50 mL.
Vaso de precipitados de 1000 mL.
Soportes universal con aro.
Recipiente de acero inoxidable.

Equipo

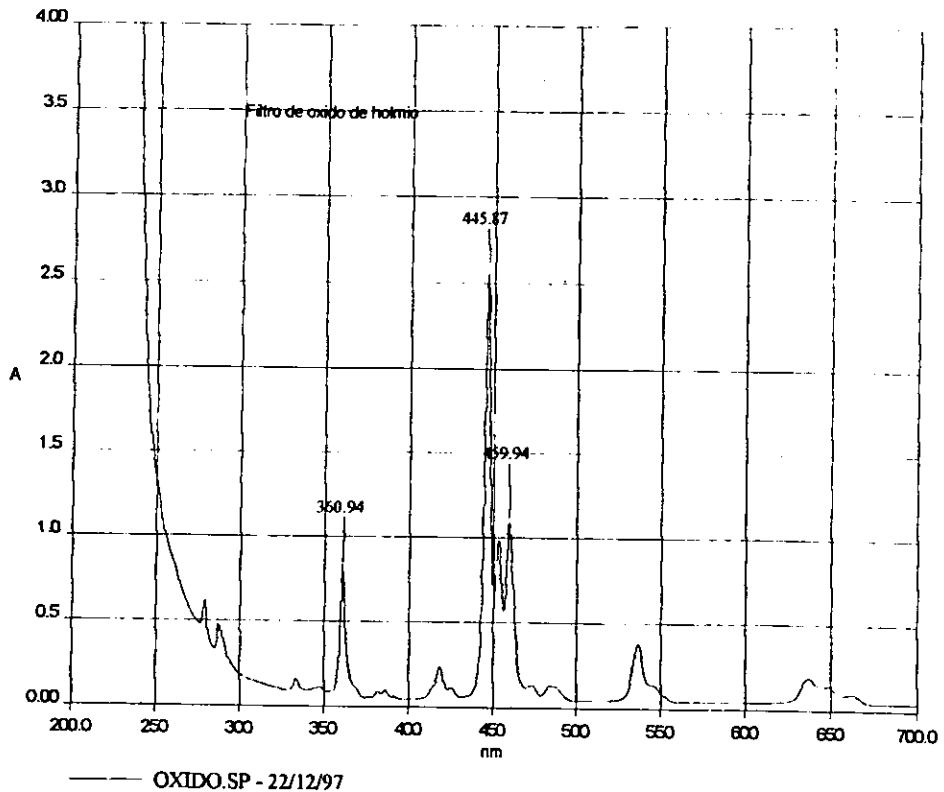
Espectrofotómetro de UV visible, un solo haz marca GBC.
Potenciómetro marca Cole Pálmer.
Rotavapor Yamato con accesorios y baño de agua.
Parrilla.

R E S U L T A D O S

Capítulo 6

6.1 RESULTADOS DE RUTINAS DE DIAGNOSTICO.

6.1.1 Exactitud de longitud de onda con filtro de óxido de holmio.

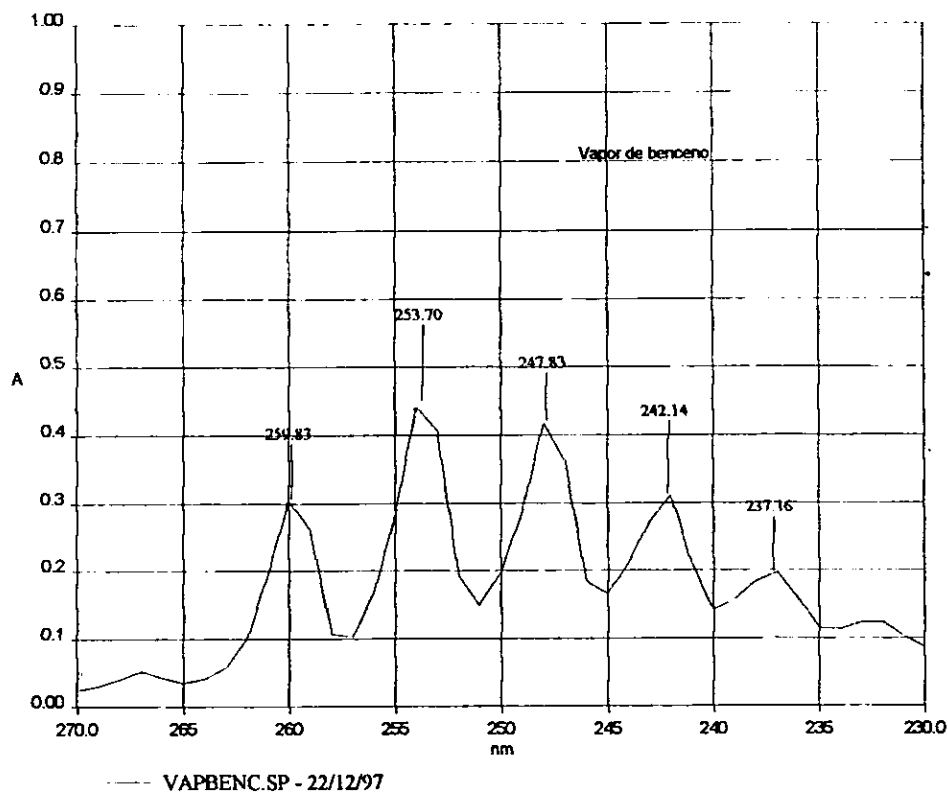


Espectro de absorción del filtro de óxido de holmio, barrido 700-200 nm. Velocidad de barrido 15nm/min.

Banda	Picos teóricos (nm)	Picos obtenidos (nm)
1	360.5	360.94
2	445.0	445.87
3	459.5	459.94

Se observan que los picos obtenidos del espectro de óxido de holmio son semejantes a los reportados en las especificaciones. Ref. (22)

6.1.2 Exactitud de longitud de onda con vapor de benceno.

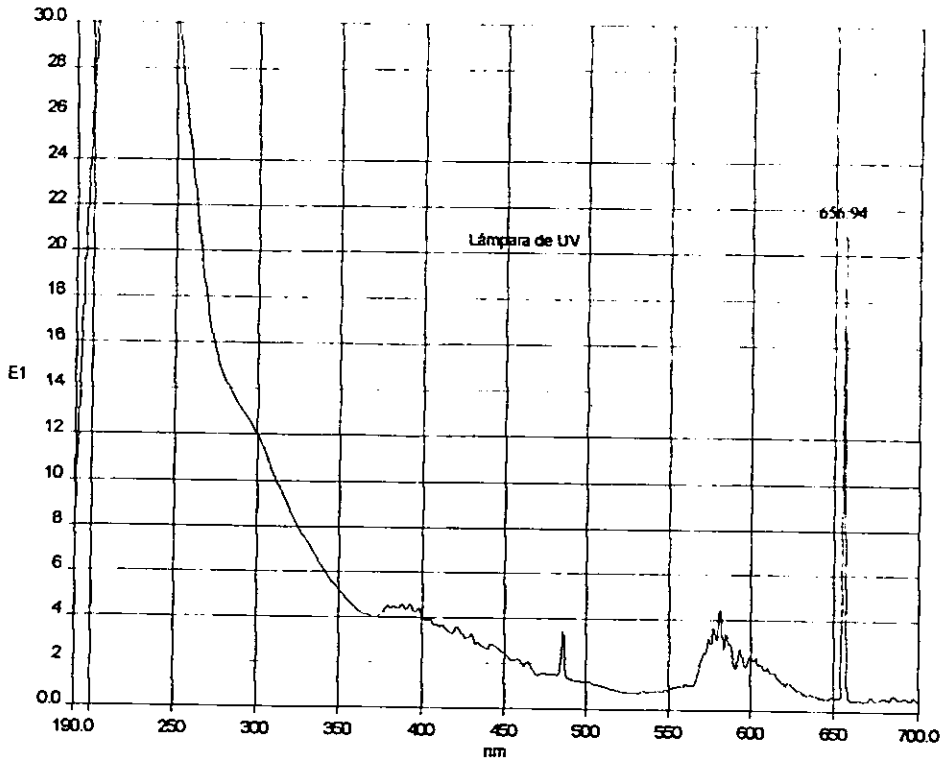


Espectro de absorción de vapor de benceno, barrido 270-230 nm. Velocidad de barrido 15nm/min.

Banda	Picos teóricos (nm)	Picos obtenidos (nm)
1	236.4	237.16
2	247.1	242.14
3	248.1	247.83
4	258.9	253.7
5	260.0	259.83

En el espectro de absorción del vapor de benceno se presentan picos en longitudes de onda muy cercanos a los reportados en las especificaciones Ref. (22). Las variaciones que existen entre los picos teóricos y los obtenidos van de 2 a 5 nm que se considera una diferencia aceptable.

1.3 Ancho de banda espectral.



-- LAMPUV.SP - 22/12/97

Espectro de energía de la lámpara de deuterio, Velocidad de barrido 15 nm/min. Intervalo de longitud de onda 190 a 700 nm.

Banda	Pico teórico (nm)	Pico obtenido (nm)	Ancho de banda
1	486.1	486.1	2.85 nm

Cálculos del ancho de banda:

Altura de la banda (h)	$h/2$	Ancho de la banda en mm.	Ancho de la banda en nm. 1 nm. = 0.28 mm.	Especificación (670/5) = 134 (670/10) = 67
670 mm	335 mm	0.8 mm	2.85 nm	c_s

Según la especificación el paso de banda debe ser de 1/5 a 1/10 de la altura total de la banda, lo que nos indica que el valor obtenido está por debajo de la especificación. Esto significa que la abertura mecánica del slit es de 0.8 mm que hace que los pasos de luz sean estrechos y agudos teniendo como resultados exactitud en las longitudes de onda deseadas y una excelente resolución. Sin embargo el ruido del aparato podría interferir en nuestros resultados.

6.1.4 Linealidad fotométrica.

Tabla de absorbancias teóricas y experimentales de la curva de calibración con $K_2Cr_2O_7$

solución estándar	concentración [g/L]	absorbancia experimental	absorbancia teórica
1	0.0	0.0	0.0
2	0.002	0.038	no reportado
3	0.004	0.063	no reportado
4	0.02	0.316	0.3102
5	0.04	0.621	0.6204
6	0.06	0.939	0.9307
7	0.08	1.198	1.2409
8	0.10	1.581	1.5511
9	0.12	1.875	1.8613
10	0.14	2.213	2.1715
11	0.16	2.501	2.4817
12	0.18	2.816	2.7920
13	0.2	3.055	3.1022
14	0.4	3.5	no reportado
15	0.8	3.5	no reportado
16	1.0	3.5	no reportado

Las soluciones estándar se leyeron a 257 nm según el manual de procedimiento.⁽²²⁾

Se observa que los valores de absorbancia de las soluciones preparadas son semejantes a los reportados en las especificaciones del equipo⁽²²⁾, solamente existen variaciones no significativas en la tercera cifra decimal.

Con los valores obtenidos se construyó la gráfica que se presenta en la Figura 6.1.4.1

Linealidad fotométrica
curva con dicromato de potasio

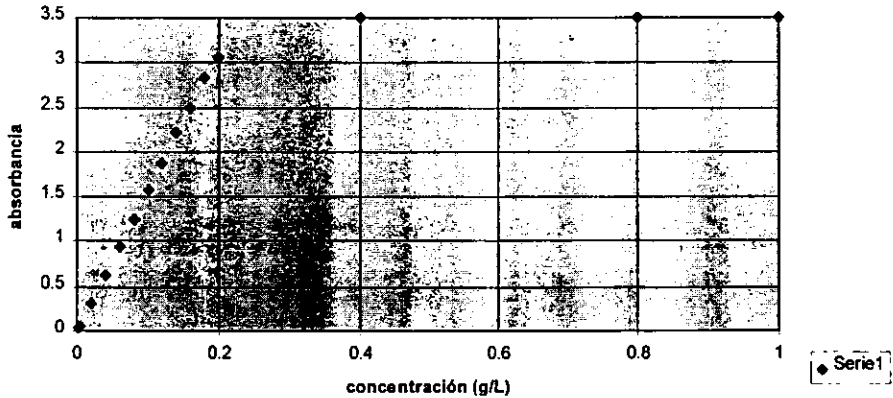


Figura 6.1.4.1

La curva anterior es lineal hasta la concentración 0.2 g/L, después de este punto las soluciones mas concentradas presentaron el mismo valor de absorbancia, lo que indica que el detector se saturó y sus lecturas son erróneas.

Según la regresión lineal hecha hasta la solución de 0.2g/L: $m = 14.51$

$$b = 0.00404$$

$$r = 0.9997$$

Según la regresión lineal teórica: $m = 14.64$

$$b = 0.0029$$

$$r = 1.000$$

El valor de la pendiente obtenida es similar al valor teórico, sin embargo el coeficiente de correlación esta por debajo del teórico, esto podría deberse al ruido del equipo pero no afecta la sensibilidad del detector. Se observa que la ley de Beer se cumple en el intervalo de concentraciones de cero a 2 g/l de concentración.

6.2 ESPECTROS OBTENIDOS DEL ÉTER ETÍLICO Y DETERMINACIÓN DEL MÁXIMO DE ABSORCIÓN DEL ÁCIDO BENZOICO.

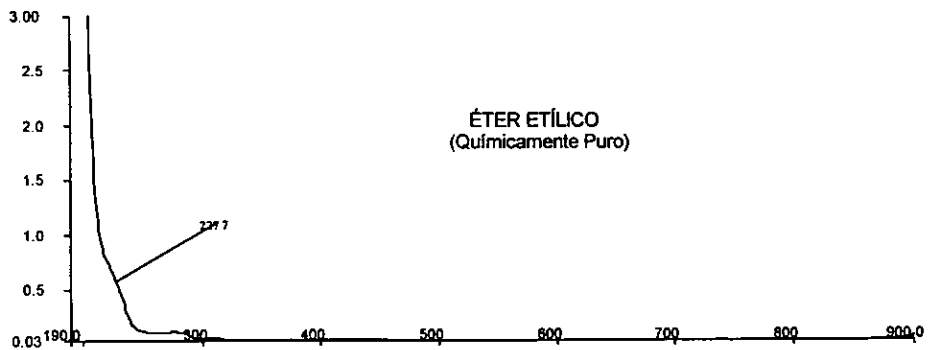


Figura 6.2.1

Espectro de absorción de éter etílico químicamente puro con una $\lambda_{\text{máxima experimental}} = 227.7$ nm. Según la bibliografía consultada la $\lambda_{\text{teórica}}$ del éter etílico es de 220.0nm por lo que existe una diferencia de 8 nm. aceptable para considerar a este reactivo como puro.

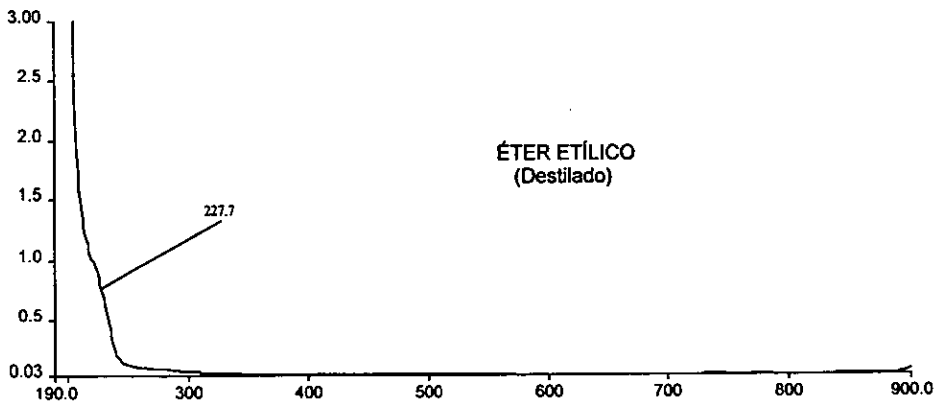


Figura 6.2.2

Espectro de absorción de éter etílico destilado con una $\lambda_{\text{máxima experimental}} = 227.7$ nm. y una $\lambda_{\text{teórica}} = 220$ nm por lo que el éter destilado sigue cumpliendo con el requisito básico para ser un buen disolvente: no absorbe en la región donde se espera encontrar la señal característica del ácido benzoico. No se observa presencia de contaminantes.

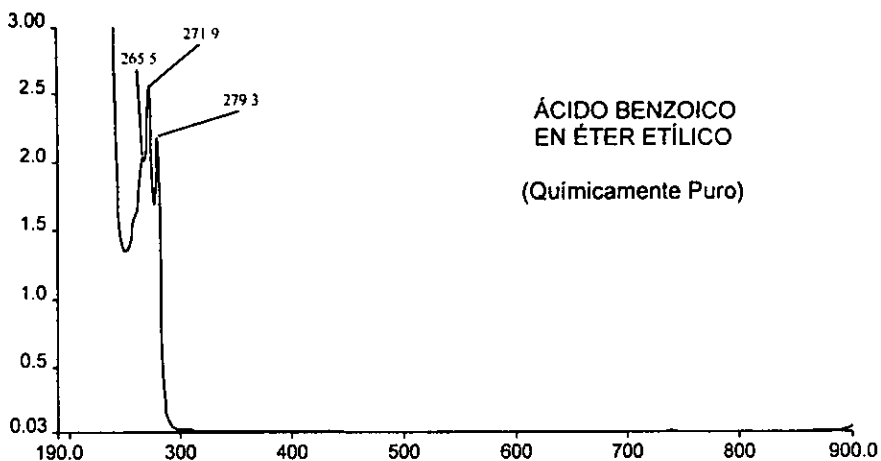


Figura 6.2.3

Espectro de absorción del ácido benzoico R.A. en éter etílico Q.P. Se observan los máximos de absorción del ácido benzoico a 265.5 nm., 271.9 nm. y 279.3 nm., siendo el característico el obtenido a 271.9 nm, este valor es muy cercano al valor de $\lambda_{teórica}=275.0\text{nm}$.

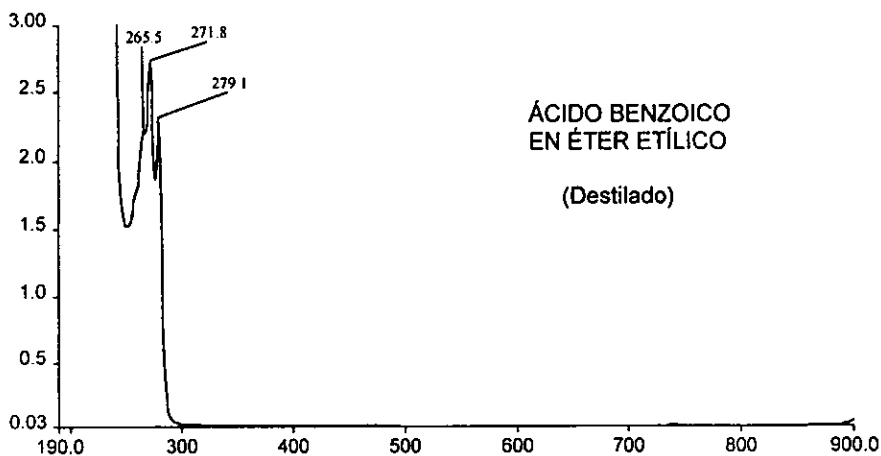


Figura 6.2.4

Espectro de absorción ácido benzoico R.A. en éter etílico destilado. Se observan los máximos de absorción del ácido benzoico a 265.5 nm., 271.8 nm. y 279.1 nm., siendo el característico el obtenido a 271.8 nm., este valor es cercano al valor de $\lambda_{teórica}=275.0\text{nm}$.

La señal característica del ácido benzoico en el reactivo puro y destilado no se ve alterada.

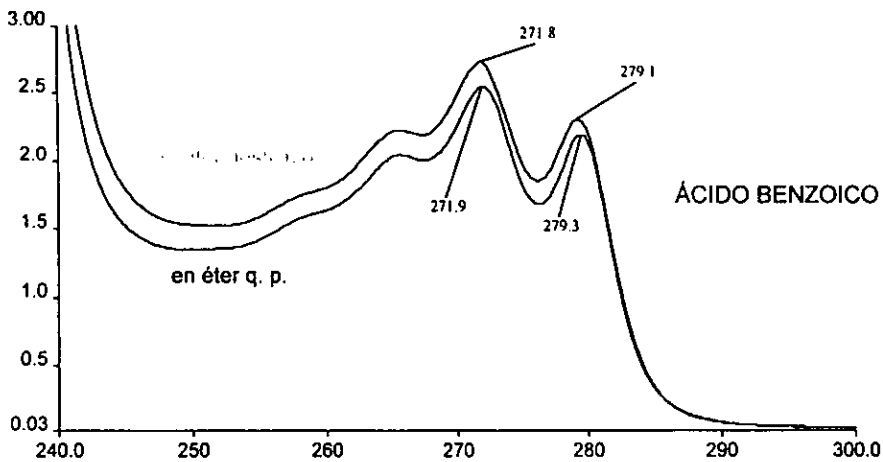


Figura 6.2.5

Espectro de absorción del ácido benzoico en éter etílico Q.P. y éter etílico destilado.

Con base en los máximos de máxima absorción del ácido benzoico obtenidos en cada uno de los disolventes se concluye que el uso de éter etílico destilado es confiable para la validación y el reuso del reactivo puro no afecta en la cuantificación del ácido benzoico.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

6.3 RESULTADOS CON ÉTER ETILICO.

1ª curva de ácido benzoico en éter intervalo 1.0% - 0.0002%

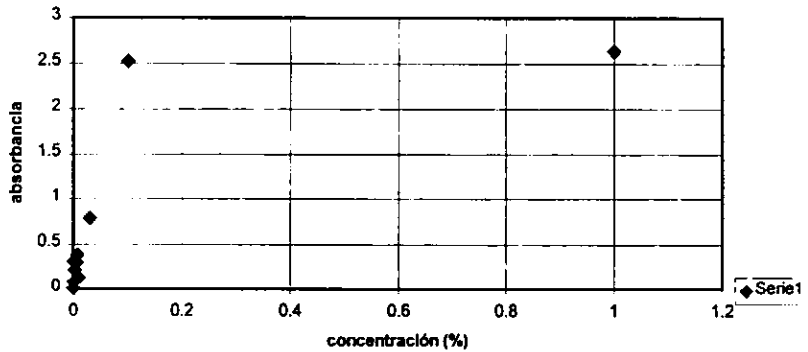


Figura 6.3.1

En esta experiencia (sección 5.3) se prepararon soluciones estándar de 1.0% a 0.0002% con el fin de tener un amplio intervalo para observar el comportamiento de esta curva de calibración, sin embargo después de la solución estándar de 0.03% no existen mas puntos que nos indiquen la tendencia de la curva.

1ª curva de ácido benzoico en éter intervalo 0.03% - 0.0002%

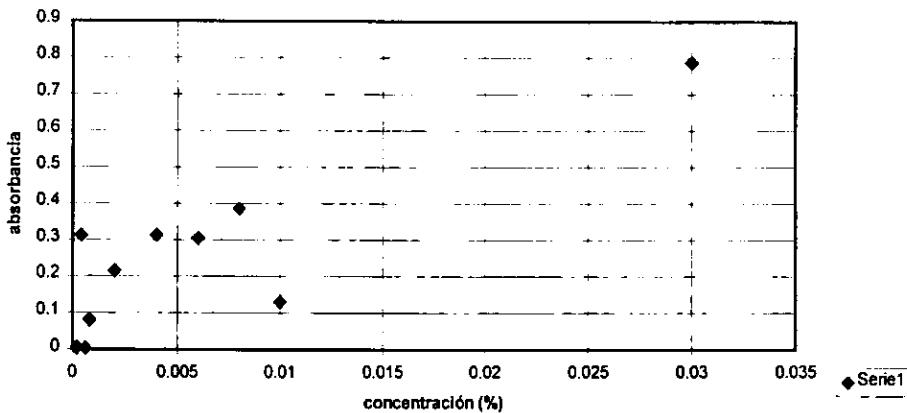


Figura 6.3.2

Gráfica con los puntos precedentes a la concentración de 3% con el fin de conocer su comportamiento debido a que en la Figura 6.3.1 se encontraban muy juntos, se observa un comportamiento aleatorio y no existe linealidad debido a la evaporación del disolvente. Se prosigió a trabajar con control de aforo y temperatura.

2ª curva de ácido benzoico en éter intervalo 0.01% - 0.0001%

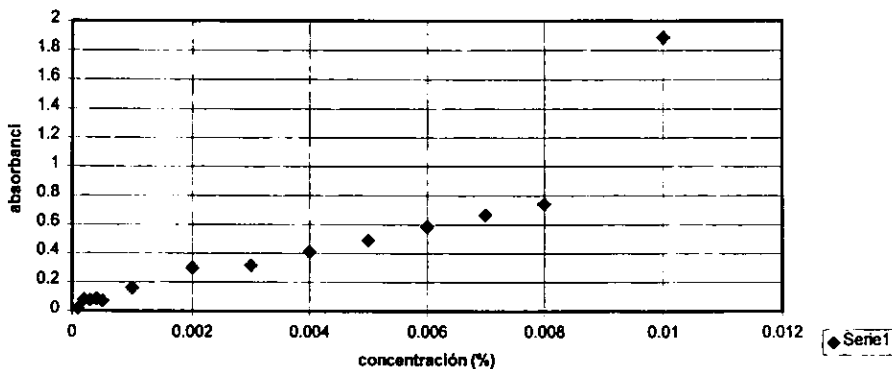


Figura 6.3.3

2ª. curva de ácido benzoico en eter etílico con control de aforo y temperatura, se observan mas puntos y un comportamiento mas consistente.

2ª curva de ácido benzoico en éter intervalo 0.001%-0.0001%

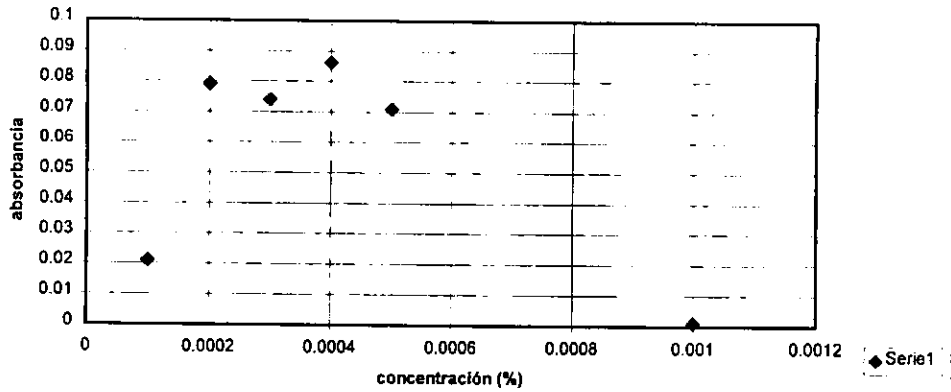


Figura 6.3.4

Gráfica de los puntos precedentes a la concentración 0.002%, son soluciones muy diluidas y no existe linealidad en este intervalo.

3ª curva de ácido benzoico en éter rango 1.0% - 0.01%

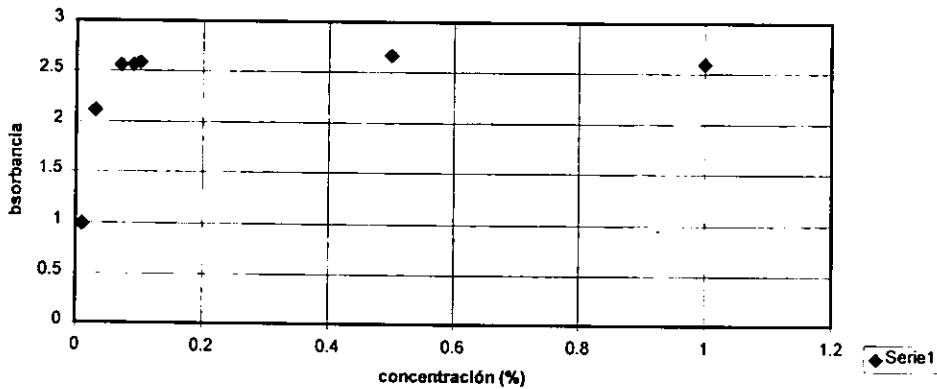


Figura 6.3.5

3ª. curva de ácido benzoico en éter etílico con control de aforo y temperatura, se hizo para comprobar la reproducibilidad de los datos. Se encontró que no existe reproducibilidad y no hay control sobre la evaporación del éter etílico.

6.4 CINÉTICA DE EVAPORACION.

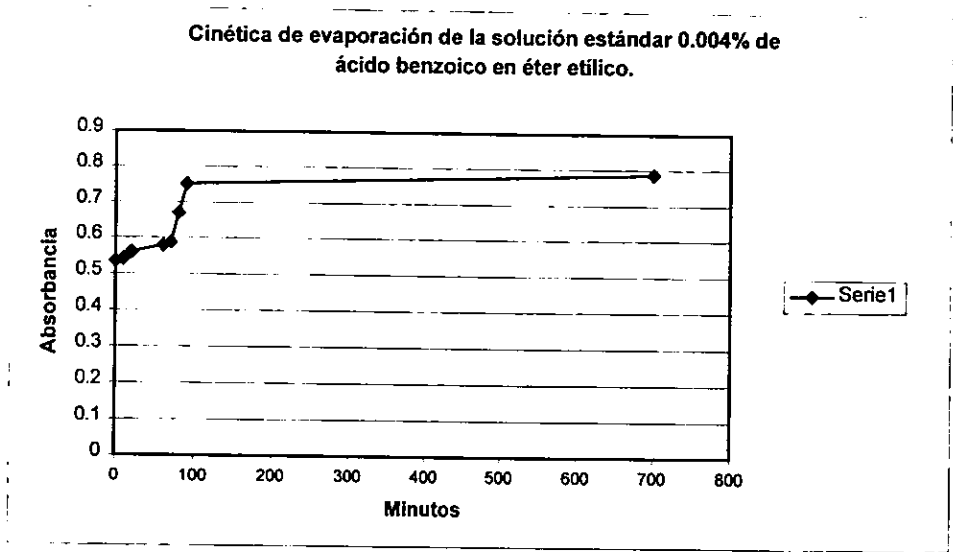


Figura 6.4.1

Cinética de evaporación de una solución de ácido benzoico en éter etílico Q.P. Se observan cambios de absorbancia del orden de 0.2 unidades en períodos cortos de tiempo.

6.5 ESPECTROS OBTENIDOS DEL METANOL Y DETERMINACIÓN DEL MÁXIMO DE ABSORCIÓN DEL ACIDO BENZOICO.

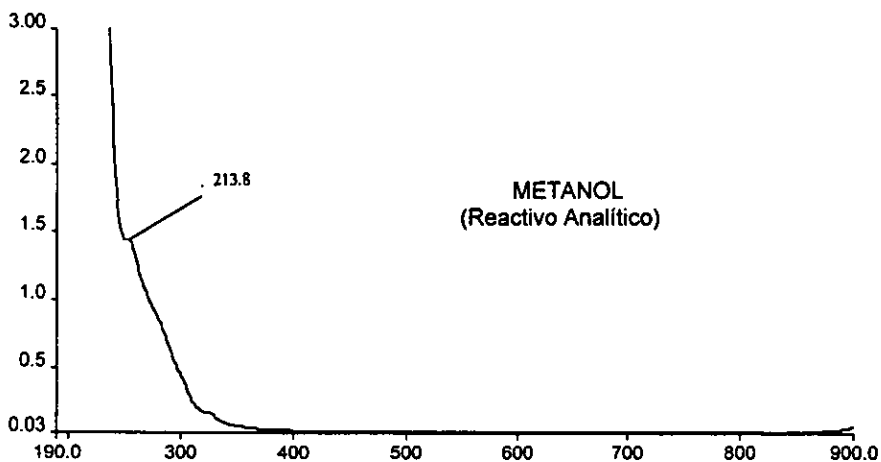


Figura 6.5.1

Espectro de absorción del metanol Reactivo Analítico (R.A.), se obtuvo un máximo de absorción a 213.8 nm que tiene una diferencia de solamente 3.8 nm. con respecto a la $\lambda_{teórica}=210.0$ nm, este diferencia no es significativa y el reactivo se considera puro.

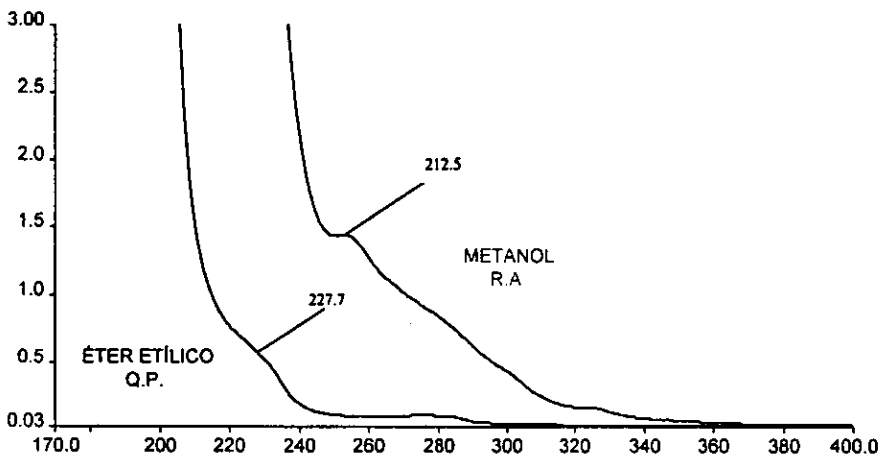


Figura 6.5.2

Comparación de los disolventes utilizados. Ambos absorben a longitudes de ondas cercanas a las teóricas por lo que se consideran a ambos aptos para utilizarse en la extracción y cuantificación del ácido benzoico.

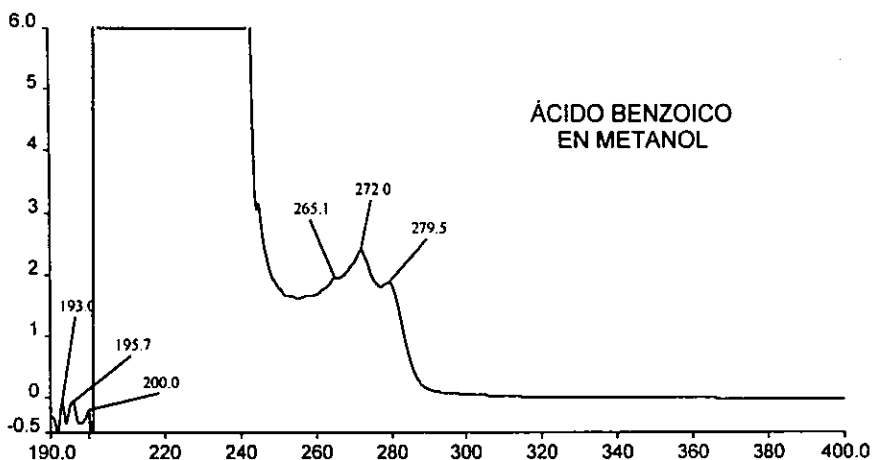


Figura 6.5.3

Espectro de absorción del ácido benzoico en metanol R.A., se obtuvo un máximo de máxima absorción a 272.0 nm muy cercano al teórico de 275 nm. En la región que corresponde al lejano U/V (200-190 nm.) se presentan señales que es el ruido del aparato.

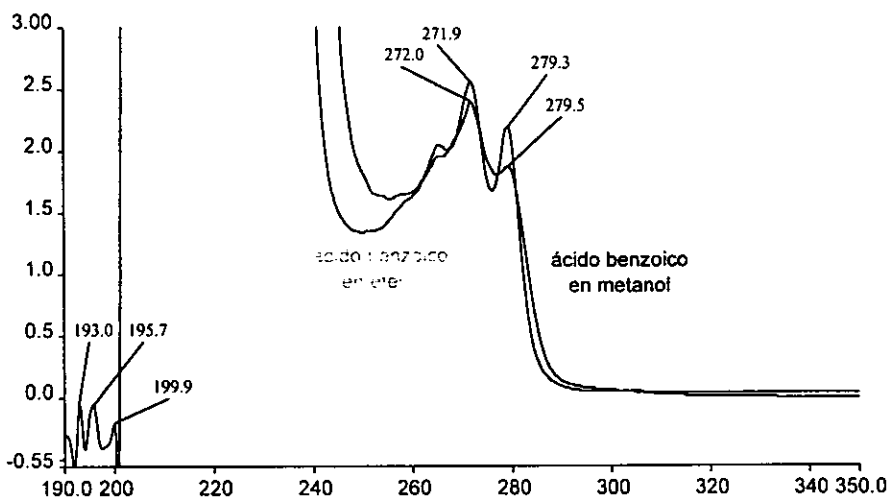


Figura 6.5.4

Superposición de los espectros de absorción del ácido benzoico en éter etílico Q.P. y en metanol R.A. Ambos disolventes permiten ver la señal correspondiente al ácido benzoico, sin embargo el éter etílico es muy volátil pero extrae al ácido benzoico por lo que el metanol es la mejor opción para cuantificarlo una vez extraído con éter.

6.6 RESULTADOS CON METANOL

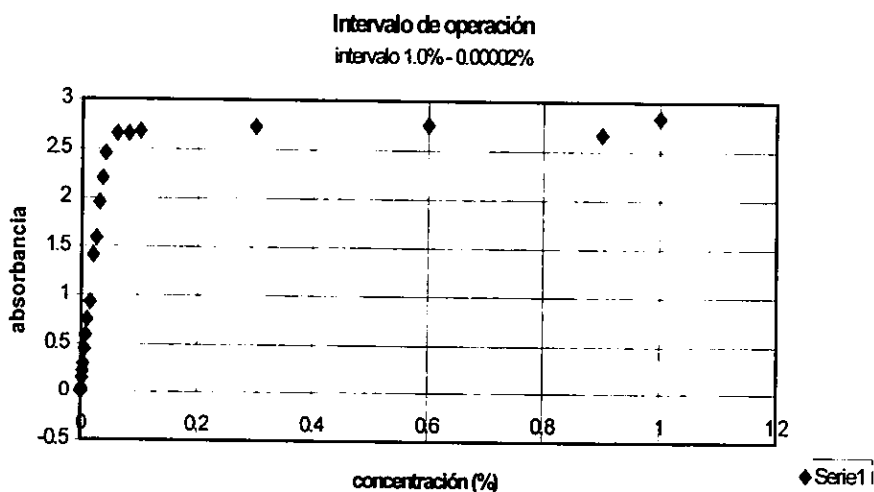


Figura 6.6.1

Curva de ácido benzoico en metanol cuyo amplio intervalo va de 1.0% a $2 \times 10^{-5}\%$; se obtuvieron varios puntos que demostraron desde donde se empieza detectar espectrofotométricamente el ácido benzoico hasta donde se ha saturado el detector. A partir de esta curva se determinó el intervalo lineal de operación del equipo y los límites máximo y mínimo de detección.

Intervalo lineal de operación del equipo

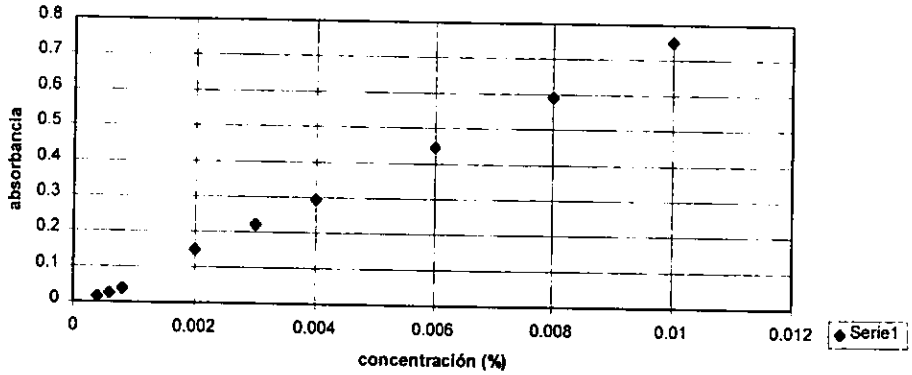


Figura 6.6.2

El intervalo de operación del equipo va de la concentración 0.004% a 0.01% de ácido benzoico en metanol, a este conjunto de puntos también se le puede nombrar la curva de calibración o curva patrón del método validado pues a partir de ella se determinó (en forma de ácido benzoico) el contenido de benzoato de sodio en los jugos analizados.

LIMITE MAXIMO DE DETECCION Intervalo 1.0% - 0.015%

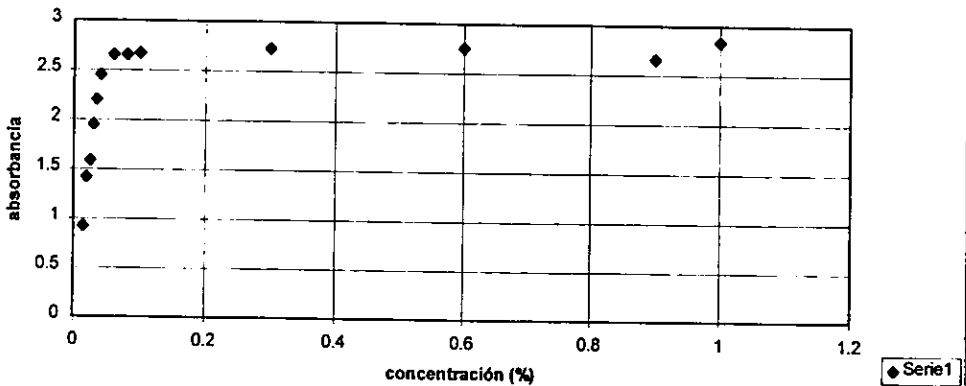


Figura 6.6.3

Esta gráfica demuestra a partir de qué concentración (0.015% de ácido benzoico en metanol), la curva dejó de ser lineal y el detector tendió a leer la misma absorbancia en soluciones de ácido benzoico. Por lo tanto soluciones de ácido benzoico mayores de 0.015% con las que se quiera trabajar van a tener errores en su lectura.

LIMITE MAXIMO DE DETECCION
intervalo 1.0% - 0.04%

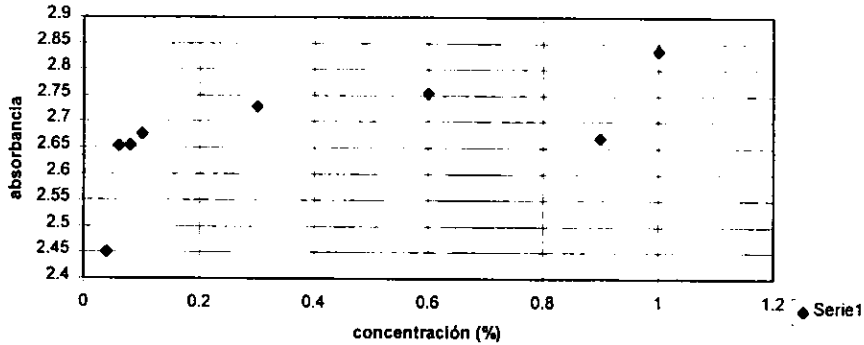


Figura 6.6.4

Según esta gráfica, a partir de la concentración 0.04% el detector fluctuó en valores de absorbancias muy cercanos de soluciones cada vez mas concentradas, por lo tanto el detector empezó a saturarse.

PRESATURACION DEL DETECTOR
intervalo 0.04% - 0.015%

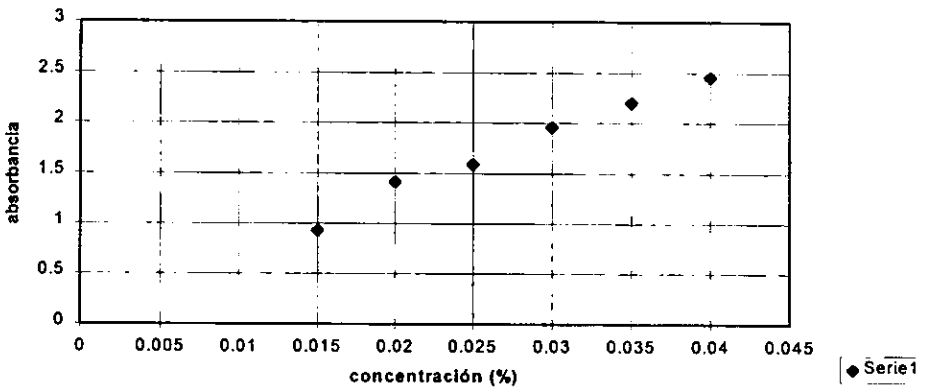


Figura 6.6.5

Antes de la saturación del detector se presentaron puntos que se comportaron de manera lineal, sin embargo este intervalo no es confiable pues está en el límite donde el detector empieza a hacer lecturas erróneas lo que es una fuente de error.

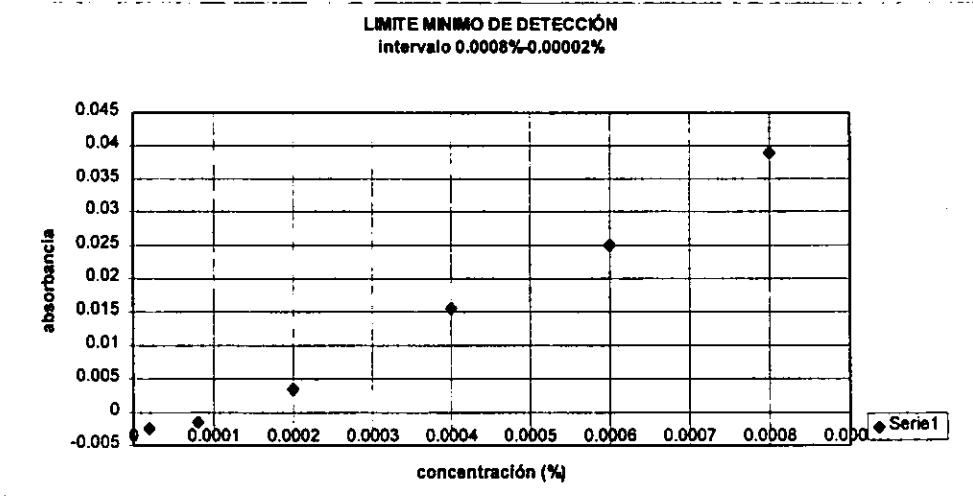


Figura 6.6.6

Gráfica donde se observan lecturas negativas lo que indica que el detector empezó a verse afectado por el ruido del aparato y ya no fue posible detectar correctamente el contenido de ácido benzoico de soluciones muy diluidas. Al igual que en la figura 6.6.5 los puntos precedentes a las lecturas negativas tienen un comportamiento lineal, pero podría llevar a errores trabajar en este intervalo.

6.7 RESULTADOS DE PARAMETROS DE VALIDACIÓN

6.7.1 Resultados con placebos cargados (exactitud y precisión inicial del método).

Precisión inicial

Placebo	1	2	3	4	5
Absorbancia (promedio)	0.018	0.054	0.205	0.341	0.61
Promedio desviación estándar	0.024				
Promedio coeficiente de variación	8.33				

Exactitud del método

Placebo	1	2	3	4	5
Benzoato agregado	0	0.001	0.003	0.006	0.009
% recobro	0.03	109.02	91.02	110.33	93.02
%error	0.03	8.27	9.86	9.36	7.51
Promedio del % error	7.0072				

Los porcentos de recobro son menores al establecido que es del 10% (ver sección 4.2.2.8) y la exactitud del método queda establecida por el valor del promedio del porcentaje de error.

Linealidad del método

Concentración nominal	0	0.00085	0.00254	0.00508	0.00763
Concentración calculada	0.0003	0.0008	0.0028	0.0046	0.0082

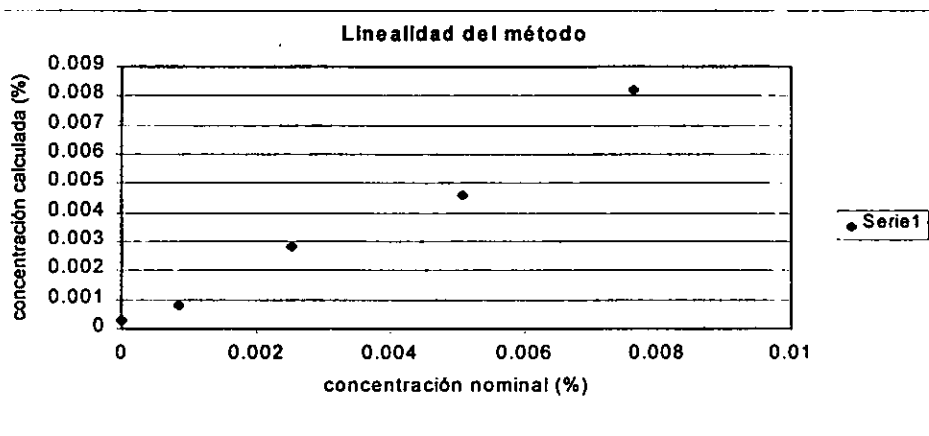


Figura 6.7.1 $m=1.01$
 $b=7.11 \times 10^{-5}$
 $r=0.998$

El método es lineal (según los parámetros establecidos en la sección 4.2.2.8) en el intervalo de concentraciones deseado, ya que las bebidas comerciales contienen cantidades de ácido benzoico del orden que se manejaron en esta determinación por lo que queda asegurada la linealidad del método cuando se trabaje con bebidas comerciales.

6.7.2 Resultados con bebidas (Presición del método).

BEBIDAS CON JUGO Absorbancias

	naranja	uva	mandarina	manzana	piña
%jugo	30	15	15	15	15
1ª muestra	0.244	0.1857	0.16	0.2192	0.107
2ª muestra	0.267	0.1937	0.1886	0.2114	0.105
3ª muestra	0.271	0.167	0.179	0.23	0.12
promedio	0.2575	0.17635	0.1695	0.2246	0.1135

BEBIDAS CON PULPA Absorbancias

	tamarindo	fresa	guayaba	mango	guanábana
% pulpa	12	12	17	15	15
1ª muestra	0.192	0.151	0.2474	0.163	0.18
2ª muestra	0.166	0.131	0.2518	0.1621	0.1621
3ª muestra	0.181	0.132	0.2214	0.18	0.166
promedio	0.1865	0.1415	0.2344	0.1715	0.173

Parámetros estadísticos

Muestra	Desviación estándar	Coefficiente de variación(%)	% ácido benzoico	%benzoato
tamarindo	0.0078	4%	0.0025	0.0030
fresa	0.0134	9%	0.0019	0.0023
guayaba	0.0184	8%	0.0032	0.0038
mango	0.0120	7%	0.0023	0.0028
guanábana	0.0099	6%	0.0024	0.0028
naranja	0.0191	7%	0.0035	0.0041
uva	0.0132	7%	0.0024	0.0028
mandarina	0.0134	8%	0.0023	0.0027
manzana	0.0076	3%	0.0031	0.0036
piña	0.0092	8%	0.0016	0.0019
Promedio	0.0124	7%		

La precisión del método es de ± 0.0124 (repetibilidad) y un 7% de variación (reproducibilidad). Ambos valores son menores que los obtenidos en el tratamiento de placebos cargados con los que calculó la precisión inicial del método.

6.7.3 Análisis de varianza.

Diseño aleatorio.

FUENTE DE VARIACION	G.L.	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	F calculada
Bebidas	8	0.02570679	0.00321335	1.5891
Error	18	0.03639644	0.00202202	
Total	26	0.06210323		

Para:

$$\alpha = 0.01 \quad F_{\text{tablas (G.L.error,G.L.tratamientos)}} = F_{\text{tablas (18,8)}} = 2.51$$

$$\alpha = 0.05 \quad F_{\text{tablas (G.L.error,G.L.tratamientos)}} = F_{\text{tablas (18,8)}} = 3.71$$

Conclusión: $F_{\text{calculada}} < F_{\alpha=0.05}$ entonces no existe diferencia significativa entre las bebidas.

Diseño de bloques

FUENTE DE VARIACION	G.L.	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	F calculada
Bebidas	8	0.02570679	0.00321335	1.6935
Repeticiones	2	0.0060382	0.0030191	1.5911
Error	16	0.03035894	0.00189743	
Total	26	0.06210323		

Para bebidas:

$$\alpha = 0.01 \quad F_{\text{tablas (G.L.error,G.L.tratamientos)}} = F_{\text{tablas (16,8)}} = 3.89$$

$$\alpha = 0.05 \quad F_{\text{tablas (G.L.error,G.L.tratamientos)}} = F_{\text{tablas (16,8)}} = 2.59$$

Conclusión: $F_{\text{calculada para bebidas}} < F_{\alpha=0.05}$ entonces no existe diferencia significativa entre las bebidas.

Para repeticiones:

$$\alpha = 0.01 \quad F_{\text{tablas (G.L.error,G.L.repeticiones)}} = F_{\text{tablas (16,2)}} = 6.23$$

$$\alpha = 0.05 \quad F_{\text{tablas (G.L.error,G.L.repeticiones)}} = F_{\text{tablas (16,2)}} = 3.63$$

Conclusión: $F_{\text{calculada para repeticiones}} < F_{\alpha=0.05}$ entonces no existe diferencia significativa entre las repeticiones.

Capítulo 7

ANÁLISIS DE RESULTADOS

En sección 6.1 se observa que los valores obtenidos de cada una de las rutinas de calibración están dentro de los límites que marca el fabricante por lo tanto cumplen con lo establecido en las especificaciones, por lo que se asegura el buen funcionamiento del espectrofotómetro utilizado en la validación.

El método validado propone éter etílico como disolvente del ácido benzoico durante la extracción y la posterior lectura, el análisis espectrofotométrico de este disolvente (Ref. Fig. 6.2.1 a 6.2.5) aseguró la no intervención de otros analitos en la determinación de ácido benzoico tanto en la utilización del éter puro como en el destilado, ya que este reactivo tuvo que reusarse debido a las cantidades tan grandes que se requirieron y la poca cantidad de reactivo grado analítico del que se dispuso.

Cabe mencionar que el éter etílico grado industrial utilizado al principio de trabajo experimental tenía un alto contenido de peróxidos que interferían en la lectura del ácido benzoico, a falta de reactivo puro grado analítico se prosiguió a purificar el reactivo con lavados de sulfato ferroso y un secado posterior con sulfato de potasio anhidro, al final de este procedimiento el reactivo seguía presentando peróxidos y grandes cantidades de agua por lo que se decidió a utilizar éter etílico grado analítico.

Durante la preparación de la primera curva de calibración con éter etílico grado analítico (Ref. Fig. 6.3.1-2) se observó que hay baja reproducibilidad de los datos por el manejo del disolvente que es muy volátil, se construyeron dos curvas de calibración con control de aforo y de temperatura para evitar el error por evaporación del disolvente, sin embargo las curvas obtenidas tampoco aseguran la reproducibilidad de la curva y eso conlleva a un error inicial importante en la validación del método (Ref. Fig. 6.3.3-5).

Se hizo un cinética de evaporación del disolvente y se observó un cambio notable en la absorbancia a intervalos de tiempo cortos (Fig. 6.4.1).

Se decidió trabajar con éter etílico como disolvente en la extracción del ácido benzoico y con metanol como disolvente posterior del ácido benzoico para su cuantificación por espectrofotometría con base en que los espectros de absorción de las figuras 6.5.1 y 6.5.2, este disolvente cumple con lo especificado en la sección 2.2.1, los espectros de absorción del metanol utilizado aseguraron la lectura del ácido benzoico a 272.0 nm que es la longitud de onda teórica donde absorbe específicamente este compuesto.

La figura 6.5.4 demuestra que el uso de metanol en vez de éter etílico en la cuantificación del ácido benzoico llevó a resultados confiables puesto que en ambos disolventes el ácido benzoico absorbió a la misma longitud de onda.

La curva de calibración de ácido benzoico en metanol de la figura 6.6.1, aseguró la reproducibilidad en la lectura de las soluciones estándar, a partir de esta curva se obtuvo el intervalo de operación del equipo que fue de 0.004% de ácido benzoico a 0.01% de ácido benzoico que es un intervalo amplio que incluye las concentraciones propuestas por el método 960.38 y permite la cuantificación de ácido benzoico a concentraciones menores del orden de 10^{-3} %.

La figura 6.6.3 muestra que después de la concentración 0.015% de ácido benzoico existe incertidumbre en la cuantificación de este analito ya que se tiende a una saturación del detector que es más evidente después de la concentración de 0.04% de ácido benzoico cuando la pendiente de la curva es igual a cero, la figura 7.6.4 muestra que antes de la saturación del detector los puntos empiezan a perder la linealidad y el intervalo 0.015% - 0.04% no es confiable para la cuantificación del analito.

La concentración máxima de detección es de 0.01% de ácido benzoico en metanol.

La figura 6.6.6 muestra el límite mínimo de detección, concentraciones menores de 0.0008% de ácido benzoico dan valores de absorbancia inciertos ya que el detector lee absorbancias negativas.

La concentración mínima de detección es de 0.0008% de ácido benzoico en metanol.

La figura 6.7.1 demuestra que el método es lineal en el intervalo 0.0008% a 0.00763% de ácido benzoico cuando se determina ácido benzoico en placebos a los cuales se les ha agregado benzoato de sodio. El intervalo lineal del método demuestra que es posible trabajar con las bebidas comerciales, que según la etiqueta contienen 0.003% de benzoato de sodio, y obtener resultados confiables.

El promedio de error es menor que el reportado en la bibliografía según la sección 4.2.2.8.

En la sección 6.7.2 los resultados obtenidos después de tratar las muestras de bebidas de frutas de diferentes sabores, demuestran que el método es repetible y reproducible, el valor promedio del coeficiente de variación y de la desviación estándar es menor que el obtenido en el tratamiento de placebos y esto se debe a que con el tiempo se tuvo un control de la técnica.

El valor de error no se calcula debido a que no se sabe con exactitud la cantidad agregada de benzoato de sodio.

Se hizo un análisis de varianza para saber el efecto que se tiene entre las diferentes bebidas y entre las repeticiones. Los valores calculados son menores que los reportados en tablas y no existe diferencia significativa ni entre las bebidas ni entre las repeticiones por lo que un tratamiento cualquiera, escogido al azar, daría los mismos resultados.

C O N C L U S I O N E S

1. La calibración del espectrofotómetro utilizado es esencial para el aseguramiento de resultados confiables, repetibles y reproducibles, al igual que el conocimiento de las pruebas de calibración y su fundamento, ya que ello explica el funcionamiento del equipo y facilita la comprensión de los espectros obtenidos para su interpretación.
2. El método 960.38 del AOAC no contempla las innovaciones tecnológicas que en esta tesis fueron útiles, pues los equipos con los que ya se cuenta a nivel masivo permiten la determinación del ácido benzoico sin necesidad de emplear ecuaciones matemáticas ni obtener los espectros de absorción de manera manual ya que el equipo cuenta con estas funciones integradas.
3. Se encontró que presencia de peróxidos formados por la oxidación del éter etílico en malas condiciones de almacenamiento interfiere en la determinación del ácido benzoico, por lo que el análisis de pureza de los reactivos utilizados en una validación es esencial para asegurar la especificidad del método.
4. El análisis espectrofotométrico del éter etílico grado industrial que se purificó fue una herramienta importante para decidir trabajar con reactivos grado analítico.
5. Se encontró que la extracción con éter y la posterior determinación del ácido benzoico en metanol disminuyen el error por evaporación del disolvente propuesto originalmente, lo que elimina una fuente de error importante en la repetibilidad y reproducibilidad del método.
6. El método es confiable ya que cumple con los requisitos de linealidad, exactitud y precisión en los intervalos de concentración máxima de detección de 0.01% de ácido benzoico en metanol y concentración mínima de detección de 0.0008% de ácido benzoico en metanol.
7. El comportamiento del método es lineal y homogéneo en el intervalo 0.0008% - 0.00763%, este intervalo incluye la concentración de ácido benzoico que contienen las bebidas de fruta comerciales, sin embargo hace falta estudiar el comportamiento del método en diferentes matrices de jugos.

8. En el presente trabajo quedan establecidos los lineamientos para la validación de un método analítico aplicado a alimentos, esta es una guía de procedimiento que se puede aplicar en el control de calidad de materias primas, en el cambio de formulaciones, en etapas del proceso donde se requiere asegurar que lo que ha sido implementado se esté cumpliendo o en el desarrollo de un proceso o método para asegurar que el paso previo satisfaga los criterios de aceptación para continuar con el paso siguiente.
9. El criterio de aceptación en la validación de un método analítico depende de la complejidad de la técnica y la matriz del producto alimenticio.
10. La validación de métodos es indispensable para demostrar la confiabilidad de un método, durante la validación se corrigen errores del método y se logra su optimización.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. **Aditivos en conservas.** Tecnología Alimentaria vol. 33, No.04 Abril 1998.
2. AOAC. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists.** 14ª edición 1984, Capítulo 20 p.p. 376-377.
3. AOAC. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists.** 15ª edición 1990, Vol.2 Capítulo 37 p.1142.
4. Asociación Farmacéutica Mexicana. **Manual de Validación.** Secretaría de Salubridad y Asistencia. México 1992.
5. Asociación Farmacéutica Mexicana. **Memorias de seminario de Validación.** Noviembre 1997.
6. Arroyo Cervantes E. **Estadística descriptiva e inferencial I.** Colegio de México.
7. Charambous George & Inglett G. **Instrumental Analysis of Foods. Recent progress.** Volume 2. Academic press USA 1983.
8. **Codex Alimentarius Volumen 2.** Food and Agriculture Organization & Organización Mundial de la Salud. Roma 1992.
9. Daniels Farrington. **Curso de Fisicoquímica Experimental.** 7ª. Edición. Centro regional de ayuda técnica. Argentina 1973.
10. Douglas, Skoog & West. **Análisis Instrumental.** 8ª edición. Nueva Editorial Mexicana. México 1985.
11. Furia E. Thomas. **Regulatory status of direct food additives.** CRC press USA 1975.
12. Furia e. Thomas. **Handbook of food additives.** Vol 1. 2ª edición CRC press USA 1975.
13. García-Galiano Enrique. **Seguridad de los aditivos en los alimentos, evolución o revolución 1ª. parte.** Tecnología Alimentaria. vol. 33, No.04 Abril 1998.

14. García-Galiano Enrique. **Seguridad de los aditivos en los alimentos, evolución o revolución 2ª. parte.** Tecnología Alimentaria. vol. 33, No.05 Mayo 1998.
15. García-Galiano Enrique. **Seguridad de los aditivos en los alimentos, evolución o revolución 3ª. parte.** Tecnología Alimentaria. vol. 33, No.06 Junio 1998.
16. García-Galiano Enrique. **Seguridad de los aditivos en los alimentos, evolución o revolución 4ª. parte.** Tecnología Alimentaria. vol. 33, No.07 Julio 1998.
17. Guerra, Johnny. **Validation of analytical methods in the pharmaceutical industry by FDA laboratories.** Pharm. Tech. 74-84 March 1986.
18. **Lange's Handbook of Chemistry.** 40ª edición. 1996 Mc. Graw Hill.
19. Lide, David R. **Handbook of Chemistry & Physics.** 74ª edición 1993-1994 CRC Press.
20. Lueck Erick. **Antimicrobial food additives, characteristics, uses, effects.** Academic Press Alemania 1979.
21. Miller & Miller. **Estadística para Química Analítica.** Limusa. México 1990.
22. **Manual de aspectos técnicos de un espectrofotómetro de UV / VIS.** Perkin Elmer.
23. **Memorias de curso teórico-práctico de espectroscopía de UV / VIS.** Perkin- Elmer. Octubre 1997.
24. Norma Oficial Mexicana "Aditivos Alimentarios-Conservadores-Benzoato de Sodio"
NOM-F-337-S-1979
25. Norma Oficial Mexicana "Alimentos-Frutas y Derivados-Jugo de manzana"
NOM-F-45-1982
26. Norma Oficial Mexicana "Alimentos-Bebidas no alcohólicas-Jugo de naranja envasado"
NOM-F-118-1984
27. Norma Oficial Mexicana "Requerimientos y niveles permitidos para los aditivos en alimentos envasados en recipientes de cierre hermético"
NOM 130-SSA1-1995.
Diario Oficial de la Federación noviembre1997.

28. Scheaffer R., Ott L. **Elementos de muestreo**. 2ª edición. Grupo Editorial Iberoamérica México 1987.
29. Sortell D. **Conservadores para bebidas**. Tecnología Alimentaria vol.30, No.4 Abril 1995.
30. R.L. Smith, P. Newberne, T.B. Adams, R.A. Ford, J.B. Hallagan, and the FEMA Expert Panel. **GRAS flavoring Substances 17**. Food Technology. February 1998.
31. Willard, Merrit & Settle. **Métodos Instrumentales de Análisis**. 9ª edición. Grupo Editorial Iberoamérica. México 1985.
32. Valadéz E.P. Tesis: **Desarrollo y validación de un método por titulación en medio no acuoso para la determinación de nitrato de miconazol en crema**. Facultad de Química UNAM 1982.
33. Reactivos Merck. **UVASOL. Disolventes y sustancias para espectroscopía**. P.p.79

A p é n d i c e

I 5.7.1 Método oficial 960.38 de AOAC.

Ácido benzoico en alimentos no sólidos y bebidas. Método espectrofotométrico.

Aplicable a catsup, otros productos de jitomate, jaleas, gelatinas, bebidas con bajo contenido de alcohol, bebidas ligeras y jugos de frutas. No aplica para sólidos.

A. Preparación de la curva estándar.

Preparar solución de ácido benzoico en éter de concentración 50 mg/L.

Determinar la absorbancia de esta solución en una celda fuertemente tapada de un espectrofotómetro Beckman DU y registrando la señal del espectrofotómetro entre 265 y 280 nm en intervalos de 1 nm. Hacer gráfica de absorbancia contra longitud de onda, tomando como mínimo 267.5 nm como el punto B, otro mínimo a 276.5 nm como el punto D y el mayor máximo a 272.0 nm como punto C.

Preparar soluciones de ácido benzoico en éter de concentración 10, 20, 40, 60, 80 y 100 mg/L. Determinar las absorbancia de estas soluciones en los puntos B, C y D. Para cada concentración calcular el promedio de absorbancias en los puntos B y D y a este valor restarle el valor de absorbancia del punto C. Hacer la gráfica de esta diferencia contra concentración.

B. Preparación de la muestra.

Mezclar la muestra perfectamente. Transferir 10g o 10 mL a un embudo de extracción y diluir a 200 mL con solución saturada de NaCl. Acidificar la muestra a pH 2 con 2 gotas de HCl concentrado, verificar con papel pH. Agitar bien.

C. Determinación.

Extraer agitar bien para asegurar la completa extracción. (Romper emulsiones por precipitación, agitación o centrifugación). Drenar y descartar la fase acuosa. Lavar la combinación de los extractos orgánicos con porciones de 50, 40 y 30 mL de HCl (1+100) y desechar los lavados con HCl. (Si los extractos no requieren de una purificación, proceder con el próximo párrafo).

Extraer la fase orgánica con porciones de 50, 40, 30 y 20 mL de NH_4OH al 0.1% y desechar la fase etérea. Neutralizar la combinación de los extractos de NH_4OH con HCl concentrado y agregar 1 mL de exceso. Extraer la solución acidificada con porciones de 70, 50, 40 y 30 mL. de éter etílico.

Diluir la combinación de los extractos etéreos a 200 mL con éter etílico y determinar la Absorbancia en una celda de espectrofotómetro fuertemente tapada a las longitudes de onda de los puntos B, C y D, diluyendo con éter si es necesario para obtener una concentración óptima dentro del intervalo 20-100 mg/L. Hacer el promedio de absorbancias en los puntos B y D y a este valor restarle el valor de absorbancia del punto C. Determinar la concentración de ácido benzoico a partir de la curva estándar, corrigiendo las diluciones.

Acido benzoico x 1.18 = benzoato de sodio.

Llevar a cabo un procedimiento similar a una muestra libre de benzoato y determinar su absorbancia en la región 265-280 nm en intervalos de 1 nm. Si la curva es una línea recta en esta región, el método es aplicable para este producto.

I I. Análisis Estadístico.

Errores

Estrictamente hablando, nunca se puede medir el valor real o verdadero de cualquier cantidad sino solamente una aproximación de ella, estas aproximaciones se conocen por primeras experiencias o por predicciones teóricas. El error de una medición es la diferencia entre el valor observado y el valor verdadero de la cantidad del analito sometida al estudio.⁽⁸⁾

Para una mejor comprensión de cómo y porqué se originan los errores y como evitarlos o minimizarlos, éstos se clasifican en errores crasos, errores aleatorios y errores sistemáticos.

Los errores crasos son aquellos que son graves y evidentes, como la ruptura del matraz en ebullición, el confundir un reactivo con otro, lo que provoca el reinicio del experimento procurando no volver a repetirlos, por lo que estos errores son controlables y el diseño de experimentos debe contemplarlos.

Los errores aleatorios afectan la precisión del método, dan resultados que caen alrededor del valor medio. Estos errores nunca se pueden eliminar, pues se derivan de condiciones que no siempre está al alcance del analista controlarlas como la variación de temperatura dentro de un laboratorio de análisis, sin embargo éstos errores se pueden atenuar por medio de técnicas de calibración de equipo o medidas repetidas para estimar qué tanto afecta al análisis determinada condición no controlable. Existen dos parámetros que estiman la precisión de un método, la reproducibilidad y la repetibilidad, deficiones que se explicaron en el capítulo 4 sección 4.1.2.

Los errores sistemáticos son eliminables y esto se realiza controlando el procedimiento experimental como las condiciones del equipo. Un analista puede protegerse de los errores sistemáticos calibrando los equipos, diseñando el experimento en cada etapa, elaborando una curva patrón, utilizando materiales de referencia y métodos estándar.⁽²⁰⁾

Herramientas estadísticas⁽⁵⁾

En una validación se emplean ecuaciones matemáticas estos son parámetros estadísticos, el valor de estos parámetros tiene un significado que representa el comportamiento de una población, en este caso, la población son todos los datos experimentales que arroja la validación del método, para interpretar de manera correcta estos valores es indispensable saber la definición de cada uno, y así, tomar decisiones y determinar la confiabilidad de los datos.

Las **medidas de tendencia central**, son valores típicos con los que se intenta resumir o describir un conjunto de datos, correspondientes a toda una población, se emplean para localizar el centro de un conjunto de datos.

Media o promedio es una medida de tendencia central, es el valor central sobre el cual fluctúan todos los datos, matemáticamente se representa por la letra griega μ cuando se trata de la media de una población y como \bar{X} cuando se habla de la media de una muestra.

$$\mu \text{ ó } \bar{X} = (x_1 + x_2 + x_3 + \dots + x_n) / n$$

$$\bar{X} = \sum_{i=1}^{i=n} [x_i / n]$$

Sin embargo el promedio de una población es de poca utilidad a menos que se conozca el grado de variación que se presenta a su alrededor, es decir el promedio no indica qué tan cerca o que tan lejos están situados los datos respecto al centro. Para ello existen las **medidas de dispersión** que indican qué tan diseminados están los datos a cada lado del centro, "varianza" y "desviación estándar" son las medidas de dispersión más utilizadas.

Varianza, es el grado de dispersión entre el valor central y cada valor individual; para su cálculo se divide entre r ó $r-1$ dependiendo del tamaño de muestra. Si el tamaño de la muestra es mayor o igual a 60 se utiliza r y si es menor de 60 se utiliza $r-1$. Se le conoce como σ^2 cuando se habla de la varianza de una población y como S^2 cuando se trata de una muestra.

$$\sigma^2 = \sum(x - \bar{X})^2 / r$$

$$S^2 = [n \cdot \sum x^2 - (Sx)^2 / n(n-1)]$$

El uso de la varianza tiene como ventaja que ésta toma en cuenta el signo de las desviaciones, estas desviaciones son valores que pueden ser negativos o positivos con respecto al valor central, la varianza los contempla elevándolos al cuadrado, pero al estar elevado al cuadrado la dispersión queda expresada en unidades distintas a las de los datos que mide, por eso se necesita de una nueva medida de dispersión que retome las unidades originales de la variables ésta es la desviación estándar.

Desviación estándar de un conjunto de observaciones se define como la raíz cuadrada del promedio de las desviaciones con respecto a la media elevadas al cuadrado o como la raíz cuadrada de la varianza.

$$\sigma \text{ ó } S = \sqrt{S^2}$$

La desviación estándar o D.E. para un conjunto de datos se realiza para medir las variaciones con respecto a la media, mientras más pequeña sea la desviación estándar, es mas probable obtener un valor cercano a la media; mientras mayor sea la desviación estándar, es más probable obtener un valor alejado de la media.

Coefficiente de variación, representa la desviación estándar de la muestra expresada en porcentaje. Se utiliza para conocer la variación que existe cuando el mismo material es investigado por diferentes personas.

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

Cualquiera de las medidas de dispersión nos dan una idea de la variación que se tiene en los resultados experimentales.

REGRESION LINEAL⁽⁸⁾

La regresión lineal es un método que se emplea para predecir el valor de una variable dependiente en función de valores dados a la otra variable independiente, estima la relación entre dos variables, pero restringiendo una de ellas con la finalidad de estudiar las variaciones de una cuando la otra permanece constante, el método más simple es una recta que representa este cambio lineal. Esta recta casi nunca es perfecta pues los puntos no siempre estarán alineados, así que se trata de encontrar la recta que mejor se ajuste también llamada recta ideal. A la regresión lineal también se le conoce como Método de Mínimos Cuadrados, que calcula la ordenada al origen, pendiente y coeficiente de correlación de la recta ideal.

ANÁLISIS DE VARIANZA.

El análisis de varianza o ANOVA es una prueba estadística que estudia a una variable dependiente por medio de una variable independiente.

Análisis de varianza para un diseño completamente aleatorio.

El análisis de varianza totalmente aleatorio se utiliza para determinar si la variable independiente presenta o no efecto significativo sobre la respuesta evaluada variable dependiente. Del análisis de varianza sólo se puede concluir si el efecto de la variable independiente es: significativo, altamente significativo o no significativo.

Significativo (denotado por un *), indica que al menos uno de los tratamientos es diferente.

Altamente significativo (denotado por dos **), indica que más de un tratamiento es diferente.

No significativo (denotado por N.S.), indica que con cualquiera de los tratamientos utilizados se obtiene la misma respuesta.

CUADRO DE ANÁLISIS DE VARIANZA PARA UN DISEÑO TOTALMENTE ALEATORIO.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F Calculada
Tratamientos	t - 1	$\frac{\sum T_1^2 + \sum T_2^2 + \dots + \sum T_t^2}{n} - C$	$\frac{S.C._{Trat}}{G.L._{Trat}}$	$\frac{C.M._{Trat}}{C.M._{Error}}$
Error	G.L. Total - G.L. Tratamientos	S. C. Total - S. C. Tratamientos	$\frac{S.C._{Error}}{G.L._{Error}}$	
Total	n - 1	$\sum (n_1^2 + n_2^2 + \dots + n_t^2) - C$		

n = número de datos para cada tratamiento.

n-1 = número total de datos menos uno.

n₁, n₂, n_n = cada dato individual.

La F calculada se compara con la F de tablas, que se busca para los grados de libertad del error y los grados de libertad de los tratamientos. Para concluir se considera cómo es la F calculada con respecto a la F de tablas:

Si F calculada > F tablas $\alpha=0.05$ Hay diferencia significativa (*).

Si F calculada > F tablas $\alpha=0.01$ Hay diferencia altamente significativa (**)

Si F calculada \leq F tablas $\alpha=0.05$ No hay diferencia significativa (N.S.)

Pero el análisis de varianza no es posible concluir, si es que existe diferencia significativa o altamente significativa, cual de los tratamientos es el mejor o el peor. Para ello se deben hacer pruebas de rango múltiple.

Análisis de varianza para un diseño en bloques.

Este diseño permite reducir el error experimental en los casos en donde la aleatorización es restringida para una de las variables estudiadas. Así la variable que puede afectar los resultados experimentales se separa en bloques y dentro de cada bloque se distribuyen al azar los tratamientos a estudiar. También se utiliza este diseño para evaluar el efecto de repeticiones en un diseño completamente al azar y determinar si el número de repeticiones realizadas fue suficiente o no para evaluar esa variable dependiente. En caso contrario se sugiere aumentar el número de repeticiones para experimentos posteriores.

Este análisis de varianza se utiliza cuando se sospecha que la respuesta puede ser afectada por algún parámetro, por ejemplo en el presente trabajo se desea comprobar la efectividad del método, se obtienen absorbancias del extracto de cada muestra de la bebida, pero se cree que ésta respuesta puede ser diferente puesto que cada bebida tiene diferente matriz debido al contenido de jugo o de pulpa además del efecto de cada repetición para cada muestra. Entonces se separa la variable que puede afectar y al interior de cada bloque se estudia el efecto de los tratamientos deseados (diferente matriz de la bebida y efecto de repeticiones).

En el presente trabajo se estudian los valores de absorbancias bajo el efecto de los jugos diferentes (también llamados tratamientos en la tabla de ANOVA) y las repeticiones diferentes.

CUADRO DE ANÁLISIS DE VARIANZA PARA UN DISEÑO EN BLOQUES.

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	F Calculada
TRATAMIENTOS	t - 1	$\frac{\sum T_1^2 + \sum T_2^2 + \dots + \sum T_t^2}{n} - C$	$\frac{S.C. \text{ Tratamientos}}{G.L. \text{ Tratamientos}}$	$\frac{C.M. \text{ Trat.}}{C.M. \text{ Error}}$
BLOQUES	b - 1	$\frac{\sum B_1^2 + \sum B_2^2 + \dots + \sum B_b^2}{n} - C$	$\frac{S.C. \text{ Bloques}}{G.L. \text{ Bloques}}$	$\frac{C.M. \text{ Bloq.}}{C.M. \text{ Error}}$
ERROR	G.L. Tot. - GLT - GLb	SC Tot. - SC Trat. - SC Bloq.	$\frac{S.C. \text{ Error}}{G.L. \text{ Error}}$	
TOTAL	n - 1	$\sum (n_1^2 + n_2^2 + \dots + n_t^2) - C$		

n_T = número de muestras para cada tratamiento.

n_B = número de muestras para cada bloque.

$n-1$ = número total de datos menos uno.

n_1, n_2, n_n = cada dato individual.

C = factor de corrección

$C = \frac{\sum (n_1 + n_2 + \dots + n_n)^2}{\# \text{ total de datos.}}$

La F calculada se compara con la F de tablas, que se busca para los grados de libertad del error y los grados de libertad de los tratamientos y también para repeticiones. Para concluir se considera como es la F calculada con respecto a la F de tablas:

Si F calculada $> F$ tablas $\alpha=0.05$ Hay diferencia significativa ().*

*Si F calculada $> F$ tablas $\alpha=0.01$ Hay diferencia altamente significativa (**)*

Si F calculada $\leq F$ tablas $\alpha=0.05$ No hay diferencia significativa (N.S.)

Eficiencia relativa, compara los diseños del análisis de varianza y permite saber con base a cuál de los diseños propuestos se debe interpretar el experimento.

$$E:R = \frac{(C.M.error_{D,A})(G.L.error_{D,E} + 1)(G.L.error_{D,A} + 3)}{(C.M.error_{D,B})(G.L.error_{D,B} + 3)(G.L.error_{D,A} + 1)}$$

Criterio

Si $ER > 1.0$ es mejor el diseño de bloques.

Si $ER < 1.0$ es mejor el diseño aleatorio.

Homogeneidad de la varianza

Se refiere a que los errores experimentales deben tener una varianza común o similar. Supóngase que en el estudio presente se trabajaron con 11 muestras diferentes y las réplicas o valores de absorbancia de cada repetición, para la mitad de las muestras no son iguales heterogéneas y para la otra mitad son muy homogéneas. Se nota que en una población heterogénea se encuentran diferencias significativas entre cada tratamiento, por ello las diferencias entre dos tratamientos heterogéneos se puede decir que son significativas cuando en realidad son debidas al azar. De igual forma para tratamientos con varianza muy reducida (homogénea) se puede decir que las diferencias entre ellos no son significativas cuando en realidad sí son significativamente diferentes. Como se observa, la homogeneidad de la varianza es un parámetro que sí afecta la interpretación del análisis del varianza si la varianza no es homogénea.

Existen pruebas que calculan la homogeneidad de la varianza como la de Barlett y la de Hartley. Siendo más confiable la de Barlett pues involucra un mayor número de parámetros.

PRUEBA DE BARLETT

$$\chi^2_{\text{desajustada}} = 2.3026 * G.L._{\text{repeticiones}} [n * \log (\text{media de la } S^2) - \Sigma \log S^2]$$

donde n = # repeticiones

$$C = 1 + \frac{n+1}{3n * G.L._{\text{repeticiones}}}$$

$$\chi^2_{\text{ajustada}} = \chi^2_{\text{desajustada}} / C$$

χ^2_{tablas} (0.01, G.L. tratamientos)

Criterio

Si la $\chi^2_{\text{calculada}} > \chi^2_{\text{tablas}}$ al 0.01 La varianza es heterogénea y se deben transformar los datos.

Si la $\chi^2_{\text{calculada}} \leq \chi^2_{\text{tablas}}$ al 0.01 La varianza es homogénea y no se deben transformar los datos.

Metanol

Alcohol metílico

Art. núm.: 6002

Envases: 500 ml, 2 1/2 l



Propiedades físicas

Peso molecular	32,04
Punto de fusión	-97,8°C
Punto de ebullición	64°C
Densidad (d_4^{20})	0,7914
Índice de refracción (n_D^{20})	1,3288
Momento dipolar	1,70 D

Valores garantizados

Contenido (por cromatografía de gases)	mín. 99,7 %/n
Agua	máx. 0,03 %/o
Componentes no volátiles	máx. 0,0005 %/o

Valores de transmisión

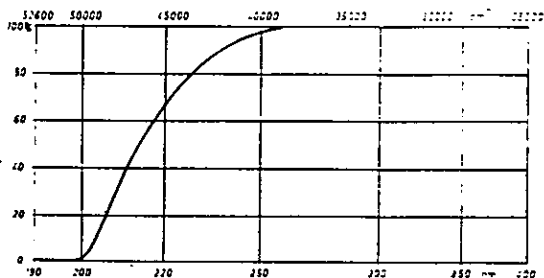
Longitud de onda (nm)	210	220	230	250	desde 260
Transmisión (%/o)	20	50	75	95	98

Aplicaciones

El metanol es miscible en cualquier relación con agua, otros alcoholes y éter dietílico y se caracteriza, respecto a su solubilidad frente a sales inorgánicas, por una cierta analogía con el agua.

Espectro UV

Espesor de la capa: 1 cm; comparación: agua



Espectro IR

Espesor de la capa: 30 μm

