

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias e Ingeniería

Estudio comparativo sobre la eficiencia para la determinación
cualitativa y cuantitativa de ácido ascórbico entre un método
cromatográfico y un método electroquímico

Proyecto de investigación

Paolo Guerini

Química

Trabajo de titulación presentado como requisito
Para la obtención del título de
Licenciatura en Química

Quito, 17 de diciembre de 2015

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ
COLEGIO DE CIENCIAS E INGENIERIA

HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE TITULACIÓN

Estudio comparativo sobre la eficiencia para la determinación cualitativa y cuantitativa de ácido ascórbico entre un método cromatográfico y un método electroquímico

Paolo Guerini

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico

David Egas, PhD

Firma del profesor

Quito, 17 de diciembre de 2015

Derechos de Autor

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante: _____

Nombres y apellidos: Paolo Stefano Guerini Vela

Código: 104323

Cédula de Identidad: 1714405519

Lugar y fecha: Quito, 17 diciembre de 2015

RESUMEN

En los últimos años la Vitamina C, también conocida como ácido ascórbico, ha sido ampliamente utilizada en la sociedad como el principal recurso para reforzar su sistema inmune. Esto se ha debido principalmente a la fácil disponibilidad del medicamento, al ser de venta libre. Adicionalmente, el costo de esta vitamina es relativamente asequible. Es por ello que la población puede estar llevando un consumo desmesurado de Vitamina C en su ingesta diaria. En el presente trabajo se ha realizado un estudio comparativo sobre la eficiencia de dos métodos, uno cromatográfico y otro electroquímico, en cuanto a la determinación de ácido ascórbico. Para el método electroquímico se han utilizado electrodos serigrafiados, con los cuales se ha investigado el proceso de oxidación del ácido ascórbico y además se han puesto a prueba las características analíticas del método. En cuanto a los análisis cromatográficos, se ha buscado principalmente definir características analíticas del método. Se ha comparado y contrastado ambas técnicas instrumentales, observando ventajas y desventajas en cada una. Finalmente, se ha logrado identificar la presencia de ácido ascórbico en las muestras problema, pero no se ha logrado cuantificarlo.

La motivación principal del proyecto yace en la posible ocurrencia de un trazador poblacional realizado en base a la cantidad de Vitamina C detectada en las aguas cruda y tratada de la Planta Piloto de la EPMAPS para la remediación de aguas. Determinar la presencia de ácido ascórbico podría llevar a evaluar su impacto en la planta de tratamiento, así como el que podría llegar a tener sobre la vida silvestre; en particular, la acuática, al ser desechado como efluente. Por lo tanto, este trabajo puede llevar a dirigir una mejora en el diseño del proceso de dicha planta; principio que puede ser extrapolado a otras plantas nacionales e internacionales.

Palabras clave: electroquímica, electrodos serigrafiados, ácido ascórbico, actividad antioxidante, identificación y cuantificación de analitos, límite de detección (LOD) voltimetría cíclica (CV), voltimetría diferencial de pulso (DPV), cromatografía líquida de alta presión (HPLC).

ABSTRACT

During the last years Vitamin C, also known as ascorbic acid, has been widely used within society as the principal resource to enhance its immune system. This has been due primarily to the drug's availability, because it can be sold without any prescription. Additionally, its reduced cost makes it relatively accessible. Therefore, it is possible that the population is driven to consuming Vitamin C excessively in a dairy basis. In the present work, a comparative study about the efficiency between two methods, one chromatographic and the other electrochemical, has been performed for the determination of ascorbic acid. For the electrochemical method, screen-printed electrodes have been used in order to investigate the oxidation process surrounding ascorbic acid and furtherly the analytical characteristics for the method have been determined as well. When dealing with the chromatographic analyses, the focus has fundamentally been the analytical characteristics. Both instrumental techniques have been compared and contrasted, observing advantages and disadvantages for each one of them. Finally, it has been possible to identify the presence of ascorbic acid in the problem samples, but not to quantify it.

The principal motivation for this project is the possible emergence of a population tracer based on the quantity of ascorbic acid detected in both raw and treated samples of the EPMAPS' Pilot Plant for water treatment. Determining the presence of ascorbic acid could lead to an evaluation of its impact on the plant itself, as well as its influence over wildlife; particularly, aquatic, because of it being wasted as an effluent. Therefore, this work can lead to an improvement on the plant's processes, a principle that can be extrapolated both nationally and internationally.

Key words: electrochemistry, screen-printed electrodes, ascorbic acid, antioxidant activity, identification and quantification of an analyte, detection limit (LOD), cyclic voltammetry (CV), differential pulse voltammetry (DPV), high-pressure liquid chromatography (HPLC).

TABLA DE CONTENIDO

Introducción.....	15
Desarrollo del Tema	18
Sección Experimental.	18
Materiales y Equipo.....	18
Preparación de soluciones.....	18
<i>Soluciones reguladoras Britton – Robinson.</i>	18
<i>Soluciones estándar de ácido ascórbico.</i>	19
<i>Fase móvil para HPLC.</i>	19
Mediciones electroquímicas.....	19
<i>Corridas de prueba: Pedestal vs. Vaso de precipitación.</i>	20
Caracterización del proceso de oxidación del ácido ascórbico.....	20
<i>Determinación de la reversibilidad del proceso.</i>	20
<i>Determinación del control del proceso: ¿difusión o adsorción?</i>	20
<i>Influencia del pH en el medio.</i>	21
Características analíticas del método.	21
<i>Repetibilidad Intra Electródica.</i>	21
<i>Repetibilidad Inter Electródica.</i>	21
<i>Curva de Calibración y Limite de Detección (LOD) con potencióstato</i>	22
<i>Análisis de muestras con el potencióstato.</i>	24
Mediciones cromatográficas.	24
<i>Curva de calibración con HPLC.</i>	24
<i>Límite de detección con HPLC.</i>	25
<i>Análisis de muestras con HPLC.</i>	26
Resultados y Discusión.	26
Corridas de Prueba: Pedestal vs. Vaso de precipitación.....	26
Caracterización del proceso de oxidación.....	28
Reversibilidad del proceso de oxidación.....	28
Control del proceso: Difusión y adsorción.	29
Influencia del pH en el medio.....	33
Repetibilidad	36
Intra electródica	36
Inter electródica	37
Curva de calibración con potencióstato.....	41

Análisis de muestras con el potencionstato.....	45
Mediciones con HPLC.....	48
Curva de calibración con HPLC.....	48
Límite de detección con HPLC.....	49
Análisis de muestras con cromatografía.....	52
Comparación y contraste de las técnicas utilizadas.....	54
Conclusiones.....	57
Referencias bibliográficas.....	58

ÍNDICE DE TABLAS

Preparación de las soluciones reguladoras Britton – Robinson de fuerza iónica constante. Cantidades añadidas de las Soluciones B y C a 25 mL de la Solución A para preparar 100 mL de cada reguladora, y pH resultante.

Tabla 2. Corriente obtenida correspondiente a la concentración de ácido ascórbico medida con el potencióstato.

Tabla 3. Prueba del límite de detección de ácido ascórbico en el potencióstato, preparado en la solución reguladora Britton – Robinson 4.

Tabla 4. Corriente obtenida correspondiente al blanco y dos estándares concentrados de ácido ascórbico en la solución reguladora Britton – Robinson 4.

Tabla 5. Concentración de ácido ascórbico en mg/mL, en mol/L, y el área de los picos correspondiente a cada concentración para HPLC.

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Voltamograma cíclico para la corrida de prueba en vaso de precipitación para la solución reguladora Britton – Robinson 4.
- Figura 2. Voltamograma cíclico para la corrida de prueba en pedestal para la solución reguladora Britton – Robinson 4.
- Figura 3. Reversibilidad del proceso de oxidación del ácido ascórbico. En azul, la línea base de H₂SO₄ 0.5 M; en rojo, el voltamograma cíclico para el estándar de La Casa *de Los Químicos*; en verde, el voltamograma cíclico para el estándar de Supelco Analytical.
- Figura 4. Voltamograma cíclico para una velocidad de barrido de 10 mV/s. En negro, línea base para H₂SO₄ 0.5 M; en rojo, corrida para una muestra de ácido ascórbico 1x10⁻⁴ M en H₂SO₄ 0.5 M.
- Figura 5. Voltamograma cíclico para una velocidad de barrido de 25 mV/s. En negro, línea base para H₂SO₄ 0.5 M; en rojo, corrida para una muestra de ácido ascórbico 1x10⁻⁴ M en H₂SO₄ 0.5 M.
- Figura 6. Voltamograma cíclico para una velocidad de barrido de 50 mV/s. En negro, línea base para H₂SO₄ 0.5 M; en rojo, corrida para una muestra de ácido ascórbico 1x10⁻⁴ M en H₂SO₄ 0.5 M.

Figura 7. Voltamograma cíclico para una velocidad de barrido de 75 mV/s. En negro, línea base para H₂SO₄ 0.5 M; en rojo, corrida para una muestra de ácido ascórbico 1x10⁻⁴ M en H₂SO₄ 0.5 M.

Figura 8. Voltamograma cíclico para una velocidad de barrido de 100 mV/s. En negro, línea base para H₂SO₄ 0.5 M; en rojo, corrida para una muestra de ácido ascórbico 1x10⁻⁴ M en H₂SO₄ 0.5 M.

Figura 9. Voltamograma cíclico para una velocidad de barrido de 250 mV/s. En negro, línea base para H₂SO₄ 0.5 M; en rojo, corrida para una muestra de ácido ascórbico 1x10⁻⁴ M en H₂SO₄ 0.5 M.

Figura 10. Voltamograma cíclico para la solución Britton – Robinson 1, pH = 2.01. En negro, la línea base de la solución reguladora; en rojo, la corrida para una solución 1x10⁻⁴ M de ácido ascórbico en el mismo buffer.

Figura 11. Voltamograma cíclico para la solución Britton – Robinson 2, pH = 3.49. En negro, la línea base de la solución reguladora; en rojo, la corrida para una solución 1x10⁻⁴ M de ácido ascórbico en el mismo buffer.

Figura 12. Voltamograma cíclico para la solución Britton – Robinson 3, pH = 4.03. En negro, la línea base de la solución reguladora; en rojo, la corrida para una solución 1x10⁻⁴ M de ácido ascórbico en el mismo buffer.

Figura 13. Voltamograma cíclico para la solución Britton – Robinson 4, pH = 5.07. En negro, la línea base de la solución

reguladora; en rojo, la corrida para una solución 1×10^{-4} M de ácido ascórbico en el mismo buffer.

Figura 14. Voltamograma cíclico para la solución Britton – Robinson 5, pH = 7.02. En negro, la línea base de la solución reguladora; en rojo, la corrida para una solución 1×10^{-4} M de ácido ascórbico en el mismo buffer.

Figura 15. DPV obtenido a diferentes amplitudes de pulso para un estándar de ácido ascórbico 1×10^{-4} M en la reguladora Britton – Robinson 4 de pH 5. En azul, amplitud de pulso de 25 mV; en verde, amplitud de pulso de 50 mV; en rosado, amplitud de pulso de 75 mV; en rojo, amplitud de pulso de 100 mV.

Figura 16. DPV para la solución reguladora Britton – Robinson 4 de pH 5, con una amplitud de pulso de 25 mV. En negro, el Electrodo 1; en azul, el Electrodo 2; en rojo, el Electrodo 3.

Figura 17. DPV para la solución reguladora Britton – Robinson 4 de pH 5, con una amplitud de pulso de 50 mV. En negro, el Electrodo 1; en azul, el Electrodo 2; en rojo, el Electrodo 3.

Figura 18. DPV para la solución reguladora Britton – Robinson 4 de pH 5, con una amplitud de pulso de 75 mV. En negro, el Electrodo 1; en azul, el Electrodo 2; en rojo, el Electrodo 3.

Figura 19. DPV para la solución reguladora Britton – Robinson 4 de pH 5, con una amplitud de pulso de 100 mV. En negro, el Electrodo 1; en azul, el Electrodo 2; en rojo, el Electrodo 3.

Figura 20. Curva de calibración: corriente como función de la concentración de ácido ascórbico para soluciones estándar preparadas en la reguladora Britton – Robinson 4.

Figura 21. DPV para los estándares de ácido ascórbico con el fin de encontrar el límite de detección del potencióstato. En negro, la línea base de la reguladora Britton – Robinson 4; en rojo, el estándar 2×10^{-4} M; en celeste, el estándar 3×10^{-4} M; en mostaza, el estándar 4×10^{-4} M; en fucsia, el estándar 7×10^{-4} M; en verde, el estándar 1×10^{-3} M; en azul, el estándar 1×10^{-2} M.

Figura 22. Curva de calibración: corriente pico como función de la concentración de ácido ascórbico para soluciones estándar preparadas en la reguladora Britton – Robinson 4, realizada en base a la prueba del límite de detección.

Figura 23. Curva de calibración: corriente pico como función de la concentración de ácido ascórbico para soluciones estándar concentradas preparadas en la reguladora Britton – Robinson 4.

Figura 24. DPV para las diluciones 1:1 de muestra cruda y tratada del Miércoles 25-11-2015. En rojo, la muestra cruda menos la línea base de la reguladora Britton – Robinson 4; en azul, la muestra tratada menos la línea base de la reguladora Britton – Robinson 4; en negro, el estándar de ácido ascórbico 4×10^{-4} M en la misma reguladora.

Figura 25. DPV para las diluciones 1:1 de muestra cruda y tratada del Jueves 26-11-2015. En rojo, la muestra cruda menos la línea base de la reguladora Britton – Robinson 4; en azul, la muestra tratada menos la línea base de la reguladora

Britton – Robinson 4; en negro, el estándar de ácido ascórbico 4×10^{-4} M en la misma reguladora.

Figura 26. DPV para las diluciones 1:1 de muestra cruda y tratada del Viernes 27-11-2015. En rojo, la muestra cruda menos la línea base de la reguladora Britton – Robinson 4; en azul, la muestra tratada menos la línea base de la reguladora Britton – Robinson 4; en negro, el estándar de ácido ascórbico 4×10^{-4} M en la misma reguladora.

Figura 27. Curva de calibración para HPLC: área en función de la concentración de ácido ascórbico.

Figura 28. Prueba para el límite de detección de ácido ascórbico en HPLC. Análisis de un estándar 1×10^{-2} M.

Figura 29. Prueba para el límite de detección de ácido ascórbico en HPLC. Análisis de un estándar 1×10^{-4} M.

Figura 30. Prueba para el límite de detección de ácido ascórbico en HPLC. Análisis de un estándar 1×10^{-5} M.

Figura 31. Prueba para el límite de detección de ácido ascórbico en HPLC. Análisis de un estándar 1×10^{-6} M.

Figura 32. Prueba para el límite de detección de ácido ascórbico en HPLC. Análisis de un estándar 1×10^{-7} M.

Figura 33. Análisis por HPLC de una muestra de agua cruda del Lunes 23-11-2015.

Figura 34. Análisis por HPLC de una muestra de agua tratada del Lunes 23-11-2015.

Figura 35. Análisis por HPLC de una muestra de agua cruda del Jueves 26-11-2015.

Figura 36. Análisis por HPLC de una muestra de agua tratada del Jueves 26-11-2015.

INTRODUCCIÓN

El ácido ascórbico, conocido también como Vitamina C, es ampliamente consumido debido a su alto valor nutricional en la dieta humana. Interesantemente, esta vitamina no puede ser sintetizada por los seres humanos, lo que ha vuelto a nuestra especie dependiente de fuentes externas (Delanghe, Langlois, De Buyzere, et al, 2011). Adicionalmente, ciertos estudios demuestran que también es de vital importancia en la dieta de otras especies (Wiberger, 1993). Una cantidad adecuada de esta vitamina en la ingesta diaria es necesaria para mantener un sistema inmunológico saludable, y su deficiencia puede manifestarse como escorbuto (Leger, 2008). Una propiedad interesante de la Vitamina C es que ella es un buen agente oxidante, especialmente cuando se relaciona con las especies reactivas del oxígeno (Chakraborty, Ramani, Sherlin, & al., 2014) (Lu, Nan, Zhang, Liu, & al., 2007) (Uluata, McClements, & Decker, 2015) (Wagner, Huebbe, Konishi, & al., 2008).

Existen numerosas técnicas que han sido desarrolladas con el fin de cuantificar o detectar la presencia de ácido ascórbico en una muestra. Muchas de ellas se utilizan rutinariamente, pero las más importantes son la Cromatografía Líquida de Alto Desempeño (HPLC por sus siglas en inglés) y, voltimetría cíclica (CV por sus siglas en inglés). Las técnicas cromatográficas, por lo general, son aquellas preferidas en la industria farmacéutica (Mitic, Kostic, Naskovic-Dokic, & al., 2011). Para las técnicas cromatográficas es posible manipular algunas variables con el fin de mejorar el tiempo de retención de las muestras, o de resolver picos cuando se detectan varios analitos: velocidad de flujo, empaquetamiento de la columna, composición de la fase móvil y su pH, entre otras (Dennison, Brawley, & Hunter, 1981) (Lykkesfeldt, Loft, & Poulsen, 1995) (Sood, Sartori, Wittmer, & Haney, 1976). Para ambas técnicas existen claras limitaciones. Una de las limitaciones más importantes es que para HPLC

los tiempos de análisis son relativamente extensos cuando son comparados a los de mediciones electroquímicas. Una corrida en HPLC puede demorar varios minutos (Wilson & Shaw, 1987). Por su parte, los análisis electroquímicos por lo general se encuentran en el orden de segundos, dependiendo de la técnica escogida (Shahrokhian & Asadian, 2010). Otra de las desventajas de HPLC es la inevitable presencia del pico del producto de oxidación del ácido ascórbico, el ácido dehidroascórbico, los cuales tienen tiempo de retención semejantes, y sus picos pueden volverse difíciles de separar (Dennison, Brawley, & Hunter, 1981). Por otro lado, las técnicas electroquímicas que se describen en la literatura generalmente se basan en la detección simultánea de varios compuestos, como por ejemplo: acetaminofén, ácido úrico, dopamina, e isozianida (Colin-Orozco, Avendano-Corona, Ramirez-Silva, & al, 2012) (Ensafi, Taei, & Arabzadeh, 2010). Estos métodos son relativamente abundantes en las referencias bibliográficas. Generalmente, se necesita modificar químicamente de alguna manera al electrodo para poder hacer dichos análisis (Ensafi, Taei, & Arabzadeh, 2010) (Ramakrishnan, et al., 2012) (Shahrokhian & Asadian, 2010) (Safavi, Maleki, Moradlou, & al., 2006), lo que puede volver a estos métodos menos reproducibles y también difícilmente disponibles (Zhao, Li, Gao, & al, 2015).

Interesantemente, no ha sido posible encontrar referencias bibliográficas que hablen de la Vitamina C en efluentes como un trazador del consumo de esta vitamina en los seres humanos. Tampoco ha sido posible encontrar información sobre los posibles efectos que podría causar en grandes concentraciones en dichos efluentes, tanto en los procesos de tratamiento de aguas, como en la vida acuática.

En este trabajo se ha utilizado un potencióstato obtenido comercialmente, con electrodos intercambiables con el fin de caracterizar el proceso de oxidación – reducción

alrededor del ácido ascórbico, utilizando un software incluido con el potencióstato. Paralelamente, se ha utilizado HPLC con el fin de comparar ambos métodos en lo que respecta a la identificación y cuantificación de cada analito. Una vez caracterizadas las características de ambos métodos, se ha procedido a medir muestras de una planta de remediación de aguas de la ciudad de Quito.

DESARROLLO DEL TEMA

Sección Experimental.

Materiales y Equipo.

Para las mediciones electroquímicas (Voltametría Cíclica, Voltametría Diferencial de Pulso) se ha utilizado el potenciostato/galvanostato *Dropsens μ Stat400* en conjunto con el software *Dropview 8400 (Versión 2.1 13B1017)*. Las condiciones específicas para cada procedimiento se indican en los mismos.

Para la medición de pH se ha utilizado un potenciómetro *Oakton pH 11 Series* previamente reactivado debido a lentas respuestas por 20 minutos en una solución buffer pH 4 + 1/100 $\text{KCl}_{(\text{ac})}$ saturado. Se ha calibrado con soluciones buffer de pH 4, 7 y 10.

Los estándares se han preparado con ácido ascórbico obtenido de *La Casa de los Químicos* y de *Supelco Analytical*, sin purificación posterior.

Para las mediciones cromatográficas, se ha utilizado un equipo de HPLC *Buck Scientific* en conjunto con el software *PeakSimple (Versión 4.44, 6 channel)*. Se ha utilizado un detector UV-Visible con detección a una longitud de onda fija a $\lambda = 254 \text{ nm}$, un flujo de 1.00 mL/min, y una resolución de 0.500, en una columna C18.

Preparación de soluciones.

Soluciones reguladoras Britton – Robinson.

Se han preparado seis soluciones reguladoras Britton – Robinson, de fuerza iónica constante. En primer lugar, se han preparado tres soluciones: A, B, y C. La Solución A consiste en una mezcla ácida con concentración 0.16 M de cada uno de los siguientes: ácido bórico (H_3BO_3), ácido fosfórico (H_3PO_4), y ácido acético glacial (CH_3COOH). Por su parte, la Solución B es una solución básica para ajustar pH, compuesta por hidróxido de sodio (NaOH) 0.80 M. La

Solución C es una solución de cloruro de sodio (NaCl) *p.a.* 1.34 M preparada con el fin de ajustar la fuerza iónica.

Para preparar 100 mL de cada solución reguladora Britton – Robinson se ha colocado 25 mL de la solución A en un balón aforado de 100 mL y posteriormente se han agregado las cantidades indicadas en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Preparación de las soluciones reguladoras Britton – Robinson de fuerza iónica constante. Cantidades añadidas de las Soluciones B y C a 25 mL de la Solución A para preparar 100 mL de cada reguladora, y pH resultante.

Soln. #	Solucion B, NaOH 0.8 M (± 0.01 mL)	Solucion C, NaCl 1.34 M (± 0.1 mL)	pH resultante
BR1	3.65	20.9	2.01
BR2	5.00	19.6	3.49
BR3	6.04	18.8	4.03
BR4	8.00	16.9	5.07
BR5	12.57	12.2	7.02

Soluciones estándar de ácido ascórbico.

La preparación de las soluciones estándar de ácido ascórbico se detalla según el tipo de análisis realizado.

Fase móvil para HPLC.

Se ha utilizado una fase móvil 95:5 (v/v) metanol (MeOH) grado HPLC: agua ultrapura más 6 gotas de ácido sulfúrico 6 M con el fin de acidificar la solución. La fase móvil ha sido filtrada con un filtro PVDF de 0.45 μm y degasificada por 20 min.

Mediciones electroquímicas

Para todas las mediciones electroquímicas se ha degasificado previamente las soluciones a utilizarse por 5 minutos mediante burbujeo con N_2 y posteriormente por 5 minutos con ultrasonido.

Corridas de prueba: Pedestal vs. Vaso de precipitación.

Un paso importante para todos los análisis ha sido determinar el recipiente donde realizar las mediciones. Se han realizado pruebas comparativas entre un pedestal incluido con el potenciostato y un vaso de precipitación, con el electrodo completamente inmerso en la solución reguladora Britton – Robinson 4. Para ello, se ha comparado el voltamograma cíclico en ambos recipientes con las siguientes condiciones: Potencial de partida, $E_{begin}=0.1$ V; Potencial de cambio 1, $E_{vtx1}=0.9$ V; Potencial de cambio 2, $E_{vtx2}=-0.1$ V; Definición, $E_{step}=0.002$ V; Velocidad de barrido, $S_{rate}=0.05$ V/s; Número de escaneos $n_{scans}=3$. Los voltamogramas resultantes se muestran en las **Figura 1** y **Figura 2**.

Caracterización del proceso de oxidación del ácido ascórbico.***Determinación de la reversibilidad del proceso.***

La determinación de la reversibilidad del proceso se ha llevado a cabo con las siguientes condiciones en voltametría cíclica: $E_{begin}=-0.3$ V; $E_{vtx1}=0.9$ V; $E_{vtx2}=-0.3$ V; $E_{step}=0.002$ V; $S_{rate}=0.05$ V/s; $n_{scans}=4$. Se ha realizado primero una corrida para la línea base de la reguladora Britton – Robinson 4 y luego se ha analizado dos estándares de ácido ascórbico 1×10^{-2} M preparados en la misma reguladora, uno de *La Casa de los Químicos* y el otro de *Supelco Analytical*. En la **Figura 3** se muestran los voltamogramas obtenidos.

Determinación del control del proceso: ¿difusión o adsorción?

Se ha utilizado CV a diferentes velocidades de barrido: 10, 25, 50, 75, 100, y 250 mV/s; con las siguientes condiciones: $E_{begin}=0.1$ V; $E_{vtx1}=0.75$ V; $E_{vtx2}=0.1$ V; $E_{step}=0.002$ V; $n_{scans}=4$. En primer lugar se han creado todas las líneas base para H_2SO_4 0.5 M en orden de velocidad ascendente, y posteriormente se han realizado las corridas para estándares de ácido ascórbico 1×10^{-4} M en H_2SO_4 0.5 M en orden descendente. Es posible observar los voltamogramas cíclicos obtenidos desde la **Figura 4** hasta la **Figura 9**.

Influencia del pH en el medio.

Se han preparado 5 soluciones de ácido ascórbico 1×10^{-4} M aforadas con las soluciones reguladoras Britton – Robinson 1 – 5, cuyo pH se encuentra listado en la *¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.*. Se ha analizado mediante voltametría cíclica con las siguientes condiciones: $E_{begin}=0.1$ V; $E_{vtx1}=0.75$ V; $E_{vtx2}=0.1$ V; $S_{rate}=0.1$ V/s; $E_{step}=0.002$ V; $n_{scans}=4$. Los resultados se muestran desde la **Figura 10** hasta la **Figura 14**.

Características analíticas del método.

Repetibilidad Intra Electrónica.

Se ha utilizado voltametría diferencial de pulso (DPV) con las siguientes condiciones: $E_{begin}=0.45$ V, $E_{end}=-0.15$ V, $E_{step}=0.004$ V, tiempo de pulso, $t_{puls}=10$ ms, $S_{rate}=0.04$ V/s, $n_{scans}=1$ (se ha hecho uno por uno manualmente hasta llegar a un total de 4 corridas para poder lavar el electrodo serigrafiado con el estándar correspondiente después de cada análisis) y se han utilizado diferentes amplitudes de pulso: 25, 50, 75, y 100 mV. Se ha trabajado con un estándar de ácido ascórbico 1×10^{-4} M aforado con la solución reguladora Britton – Robinson 4 de pH 5. En la **Figura 15** se muestran los voltamogramas obtenidos.

Repetibilidad Inter Electrónica.

Se ha utilizado DPV con la solución reguladora Britton – Robinson 4 con las siguientes condiciones: $E_{begin}=0.45$ V, $E_{end}=-0.15$ V, $E_{step}=0.004$ V, $t_{puls}=10$ ms, $S_{rate}=0.04$ V/s, $n_{scans}=4$ (de forma consecutiva), y amplitudes de pulso variables: 25, 50, 75, y 100 mV. Se han utilizado 3 electrodos distintos (E1, E2, E3), para los cuales se ha analizado cada amplitud de pulso. Todos los electrodos fueron previamente lavados con agua destilada. Se han registrado los voltamogramas en las **Figura 16 a Figura 19**, donde se comparan los 3 electrodos a una amplitud de pulso específica en cada uno.

Curva de Calibración y Limite de Detección (LOD) con potenciostato.

Se ha realizado una curva de calibración, utilizando distintos estándares de ácido ascórbico aforados con la solución Britton – Robinson 4. Los estándares preparados, en conjunto con la corriente pico medida se muestran en la **Tabla 2**. Corriente obtenida correspondiente a la concentración de ácido ascórbico medida con el potenciostato. Se ha realizado los análisis mediante DPV con las siguientes condiciones: $E_{begin}=-0.25$ V; $E_{end}=0.75$ V; $E_{step}=0.004$ V; $E_{puls}=0.002$ V; $t_{puls}=10$ ms; $S_{rate}=0.04$ V/s; $n_{scans}=1$ (uno por uno realizado manualmente hasta alcanzar 4 escaneos, lavando el electrodo con H₂O destilada después de cada corrida).

Tabla 2. Corriente obtenida correspondiente a la concentración de ácido ascórbico medida con el potenciostato.

Concentracion VitC (M)	Corriente pico (A)
0.00	0.0000
4.00E-04	0.2653
7.00E-04	0.4109
1.00E-03	0.4760
1.00E-02	4.1330

Se ha realizado un gráfico de dispersión utilizando *Microsoft Excel 2013*, el cual se muestra en la **Figura 20**. Con este mismo software se ha hecho una regresión por el método de mínimos cuadrados para encontrar la ecuación de la recta que describa a la línea de tendencia y también se ha computado el coeficiente de correlación al cuadrado; datos incluidos en la sección de Resultados y Discusión.

Se ha hecho también una prueba del Límite de Detección (LOD por sus siglas en inglés) de ácido ascórbico para el potenciostato. Al realizar la primera curva de calibración se ha

observado que al preparar un estándar 1×10^{-4} M, no se ha obtenido una respuesta medible en el potenciostato. Por lo tanto, la prueba del límite de detección se ha realizado con estándares entre 1×10^{-3} y 1×10^{-4} M, los cuales se detallan en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Prueba del límite de detección de ácido ascórbico en el potenciostato, preparado en la solución reguladora Britton – Robinson 4.

Concentracion VitC (M)	Corriente pico (A)
0.00	0.0000
2.00E-04	0.1146
3.00E-04	0.2092
7.00E-04	0.4450
1.00E-03	0.6704
1.00E-02	3.6095

En la sección de Resultados y Discusión, se incluye un gráfico de la voltametría diferencial de pulso realizada para los estándares en la **Figura 21**, y a continuación, se ha graficado a la corriente como función de la concentración de Vitamina C, con el fin de realizar una curva de calibración adicional en la **Figura 22**.

Por último, se ha realizado una curva de calibración de ácido ascórbico solamente con 2 estándares relativamente concentrados y el blanco. Los datos se muestran en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Corriente obtenida correspondiente al blanco y dos estándares concentrados de ácido ascórbico en la solución reguladora Britton – Robinson 4.

Concentracion VitC (M)	Corriente pico (A)
0.00	0.0000
1.00E-03	0.5416
1.00E-02	3.4179

La curva de calibración, mostrada en la **Figura 23** junto con la ecuación de la recta y el coeficiente de correlación al cuadrado correspondientes se muestran en la sección de Resultados y Discusión.

Análisis de muestras con el potenciostato.

Se ha preparado diluciones 1:1 tanto de la muestra cruda como de la muestra tratada con la solución reguladora Britton – Robinson 4, las cuales han sido posteriormente degasificadas con ultrasonido, por 5 min, y burbujeando N₂, por 5 min. Se ha utilizado las muestras crudas y tratadas de las fechas: Miércoles 25-12-2015, Jueves 26-12-2015, y Viernes 27-12-2015. Se ha corrido DPV con las siguientes condiciones: E_{begin}=-0.25 V; E_{end}=0.75 V; E_{puls}=0.002 V; E_{step}=0.004 V; t_{puls}=10 ms; n_{scans}= 1 (Uno por uno realizado manualmente hasta alcanzar 4 escaneos, lavando el electrodo con H₂O destilada después de cada corrida). En las **Figura 24, Figura 25, y Figura 26** se muestran los análisis para las tres muestras, en conjunto con una curva del estándar 4x10⁻⁴ M de ácido ascórbico.

Mediciones cromatográficas.

Curva de calibración con HPLC.

Los estándares preparados, en conjunto con el área obtenida para cada uno de ellos se muestran en la

Tabla 5.

Tabla 5. Concentración de ácido ascórbico en mg/mL, en mol/L, y el área de los picos correspondiente a cada concentración para HPLC.

Concentración (mg/mL)	Concentración (M)	Área (adim.)
0.05	2.84E-04	29.296
0.10	5.68E-04	64.326
0.15	8.52E-04	92.501
0.20	1.14E-03	115.703
0.25	1.42E-03	147.215
0.30	1.70E-03	175.281

Con los datos de esta tabla, se ha procedido a realizar una regresión lineal por el método de mínimos cuadrados en *Microsoft Excel 2013*. Con el mismo software se ha calculado la ecuación de la recta obtenida así como el coeficiente de relación al cuadrado. La curva de calibración se muestra en la **Figura 27** de la sección de Resultados y Discusión.

Límite de detección con HPLC.

Se han preparado estándares 1×10^{-7} , 1×10^{-6} , 1×10^{-5} , y 1×10^{-4} de ácido ascórbico en la solución reguladora Britton – Robinson 4 por diluciones sucesivas a partir del estándar 1×10^{-2} M. Todos los estándares han sido posteriormente degasificados con ultrasonido por 10 min previo a ser inyectados. Los cromatogramas obtenidos se muestran desde la **Figura 28** hasta la **Figura 32**.

Análisis de muestras con HPLC.

Se han preparado 25 mL de una solución 1:1 de muestra con la reguladora Britton – Robinson 4, tanto con la muestra de agua cruda como con la tratada. Estas muestras fueron posteriormente filtradas con un filtro PVDF de 0.45 μm y luego degasificadas por 10 min con ultrasonido previo a ser inyectadas. Los cromatogramas resultantes se incluyen en las **Figura 33** a la **Figura 36**.

Resultados y Discusión.

Corridas de Prueba: Pedestal vs. Vaso de precipitación.

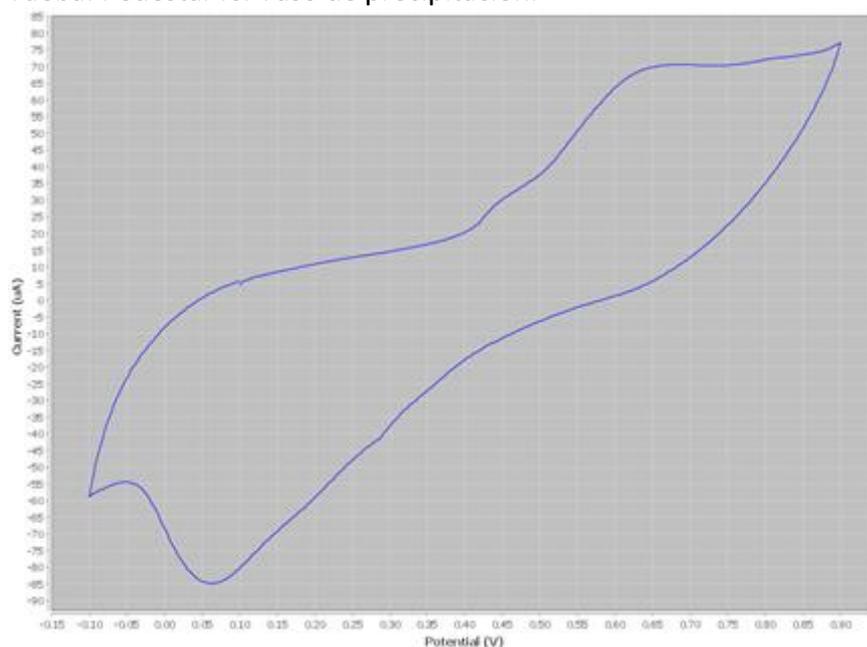


Figura 1. Voltamograma cíclico para la corrida de prueba en vaso de precipitación para la solución reguladora Britton – Robinson 4.

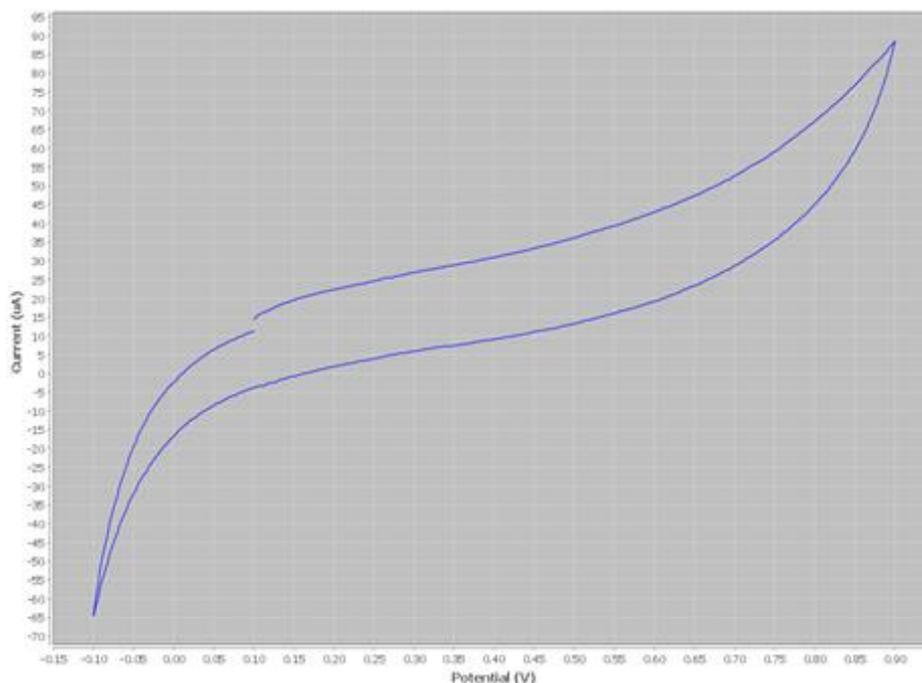


Figura 2. Voltamograma cíclico para la corrida de prueba en pedestal para la solución reguladora Britton – Robinson 4.

En base a los voltamogramas obtenidos en las **Figuras 1 y 2**, se puede apreciar una diferencia importante sobre el análisis entre ambos recipientes. Se puede ver que en el pedestal existe una discontinuidad de la curva, además de la falta de algún pico, el cual sí está presente tanto en la oxidación como en la reducción para la prueba realizada en el vaso de precipitación. Se ha escogido utilizar un vaso de precipitación para todas las mediciones debido a que en el pedestal incluido con el potenciostato, donde el problema principal que puede generar estos errores se ha atribuido a la presencia de pequeñas burbujas difíciles de remover. Esto, a su vez, altera la superficie del electrodo cubierta por la solución analizada en una magnitud desconocida. Por ello, en el vaso de precipitación se puede garantizar que la superficie del electrodo estará cubierta en su totalidad.

Caracterización del proceso de oxidación
Reversibilidad del proceso de oxidación

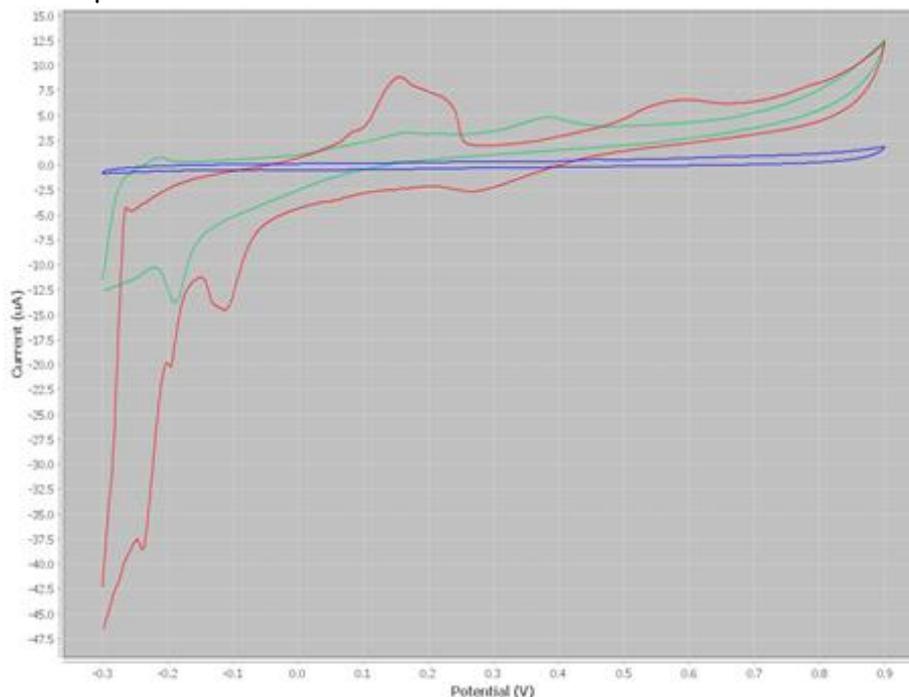


Figura 3. Reversibilidad del proceso de oxidación del ácido ascórbico. En azul, la línea base de H_2SO_4 0.5 M; en rojo, el voltamograma cíclico para el estándar de *La Casa de Los Químicos*; en verde, el voltamograma cíclico para el estándar de *Supelco Analytical*.

Una de las características más importantes que se ha podido apreciar para los voltamogramas de ambos estándares es la presencia de dos jorobas en la parte de oxidación del proceso. Esto indica que el proceso de oxidación es uno que conlleva 2 electrones, lo cual sucede en esta reacción. Sin embargo, no era esperado poder observar una distinción entre ambos picos en el voltamograma, debido a que es regular que exista un solapamiento de ambos y es algo difícil definirlos. Interesantemente, es posible ver que también para ambos en la parte de la curva que describe el proceso de reducción se puede apreciar una pequeña joroba (alrededor de -0.2 V para el estándar de *Supelco Analytical*, y alrededor de -0.1V para el estándar de *La Casa de los Químicos*) que indica que algo del analito vuelve a reducirse.

Se ha escogido trabajar con el estándar de *La Casa de los Químicos* debido a que se ha observado una respuesta más pronunciada en el voltamograma cíclico de la **Figura 1**, y a su fácil disponibilidad en el mercado local.

Control del proceso: Difusión y adsorción.

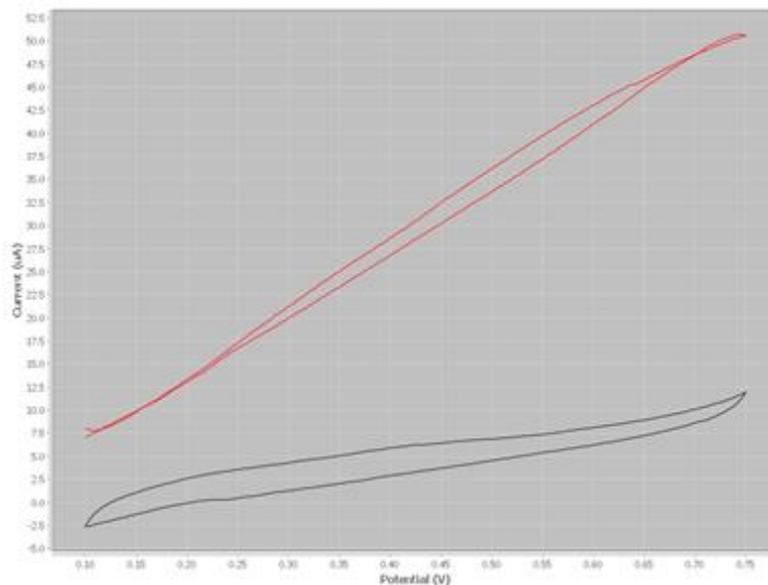


Figura 4. Voltamograma cíclico para una velocidad de barrido de 10 mV/s. En negro, línea base para H_2SO_4 0.5 M; en rojo, corrida para una muestra de ácido ascórbico 1×10^{-4} M en H_2SO_4 0.5 M.

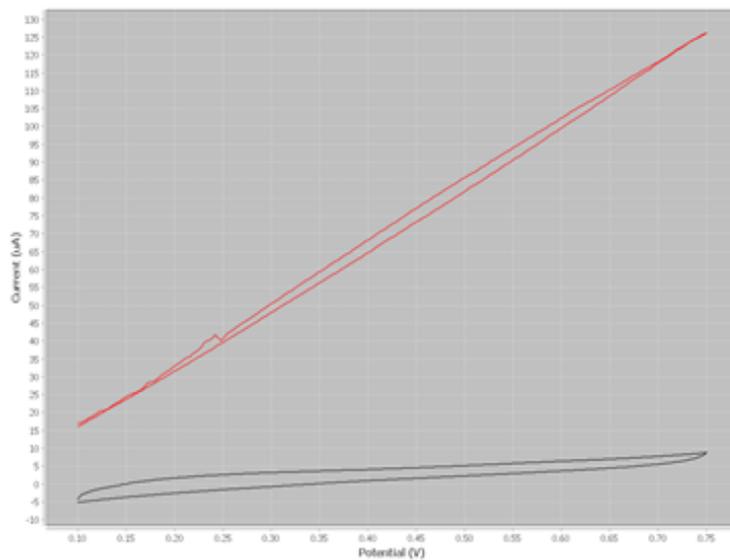


Figura 5. Voltamograma cíclico para una velocidad de barrido de 25 mV/s. En negro, línea base para H_2SO_4 0.5 M; en rojo, corrida para una muestra de ácido ascórbico 1×10^{-4} M en H_2SO_4 0.5 M.

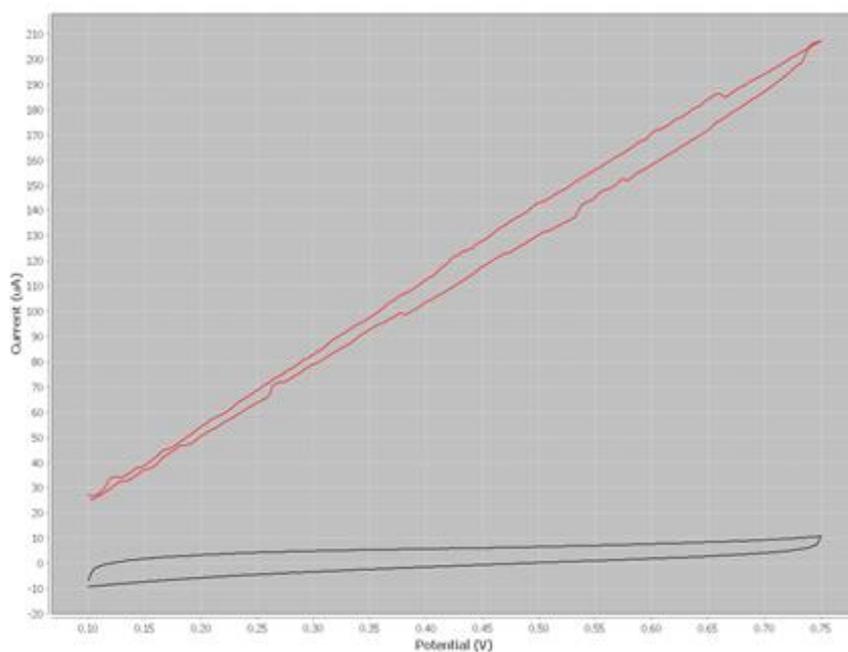


Figura 6. Voltamograma cíclico para una velocidad de barrido de 50 mV/s. En negro, línea base para H_2SO_4 0.5 M; en rojo, corrida para una muestra de ácido ascórbico 1×10^{-4} M en H_2SO_4 0.5 M.

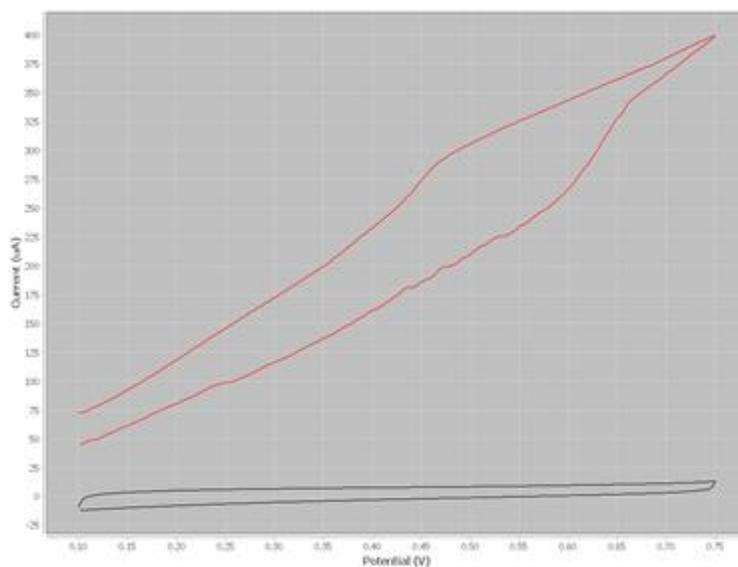


Figura 7. Voltamograma cíclico para una velocidad de barrido de 75 mV/s. En negro, línea base para H₂SO₄ 0.5 M; en rojo, corrida para una muestra de ácido ascórbico 1x10⁻⁴ M en H₂SO₄ 0.5 M.

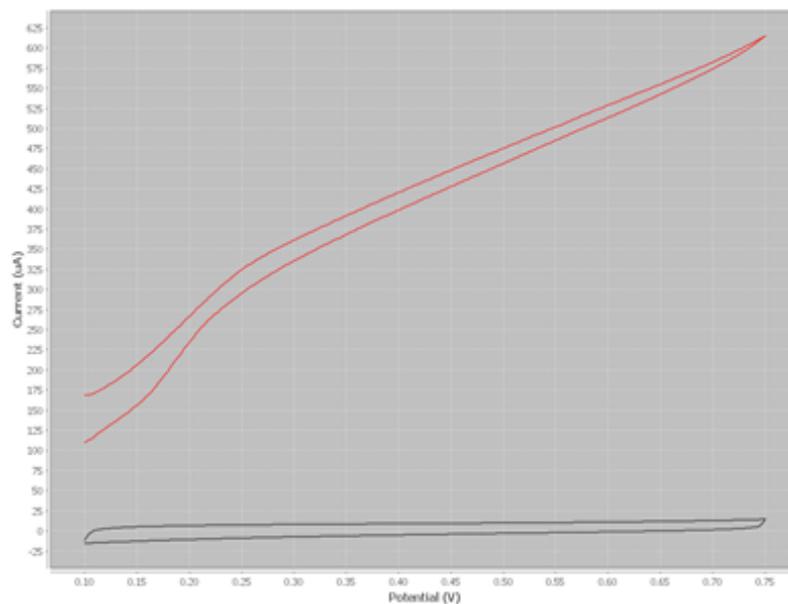


Figura 8. Voltamograma cíclico para una velocidad de barrido de 100 mV/s. En negro, línea base para H₂SO₄ 0.5 M; en rojo, corrida para una muestra de ácido ascórbico 1x10⁻⁴ M en H₂SO₄ 0.5 M.

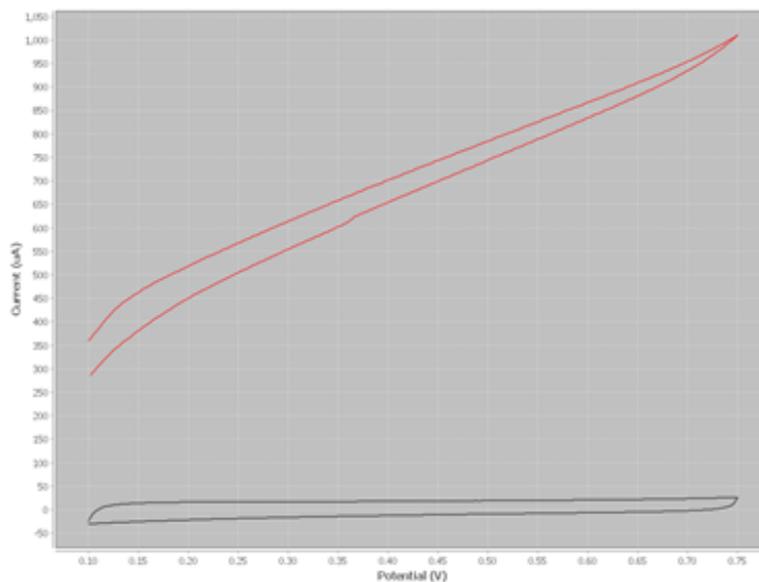


Figura 9. Voltamograma cíclico para una velocidad de barrido de 250 mV/s. En negro, línea base para H₂SO₄ 0.5 M; en rojo, corrida para una muestra de ácido ascórbico 1×10^{-4} M en H₂SO₄ 0.5 M.

Se ha podido apreciar que mientras la velocidad de barrido incrementa, no se observan diferencias notables en los voltamogramas cíclicos obtenidos. Por lo tanto, esto indica que el proceso está gobernado por fenómenos difusivos.

Influencia del pH en el medio.

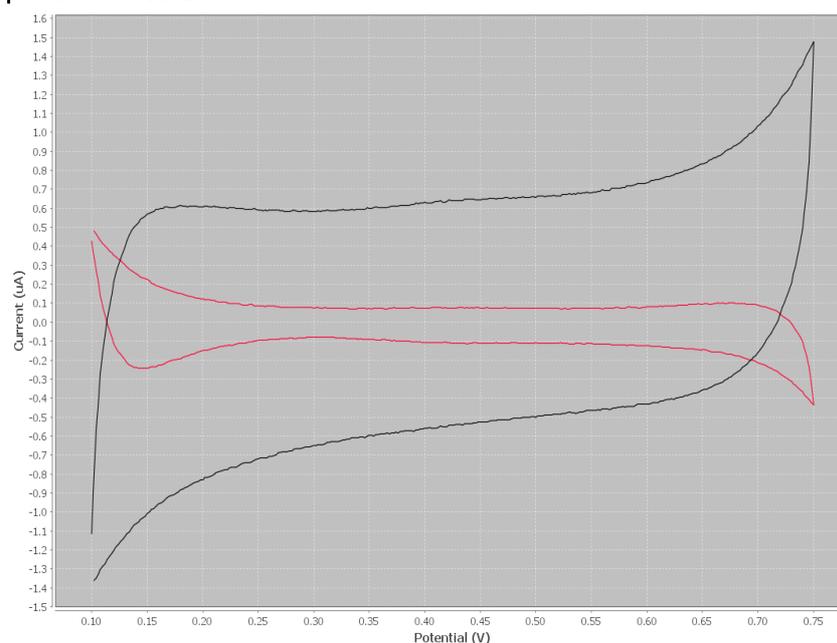


Figura 10. Voltamograma cíclico para la solución Britton – Robinson 1, pH = 2.01. En negro, la línea base de la solución reguladora; en rojo, la corrida para una solución 1×10^{-4} M de ácido ascórbico en el mismo buffer.

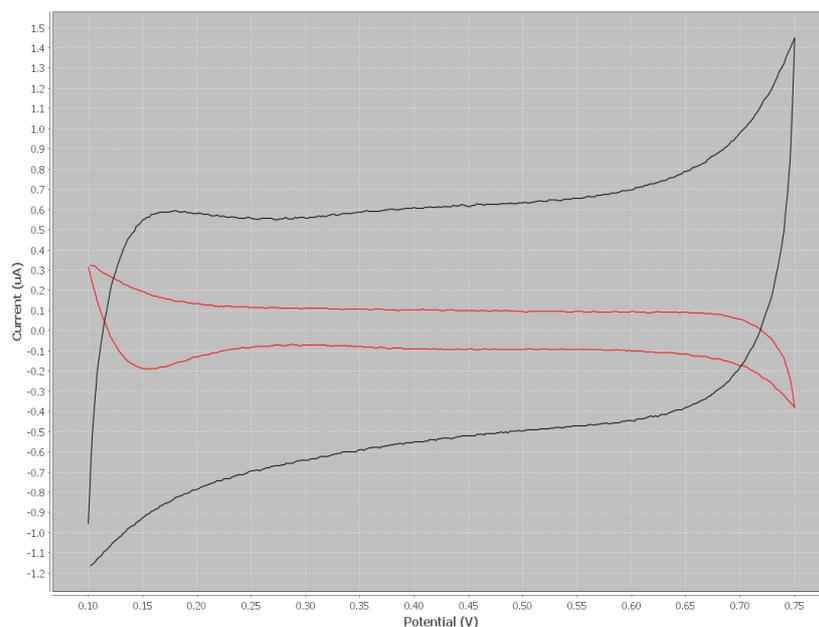


Figura 11. Voltamograma cíclico para la solución Britton – Robinson 2, pH = 3.49. En negro, la línea base de la solución reguladora; en rojo, la corrida para una solución 1×10^{-4} M de ácido ascórbico en el mismo buffer.

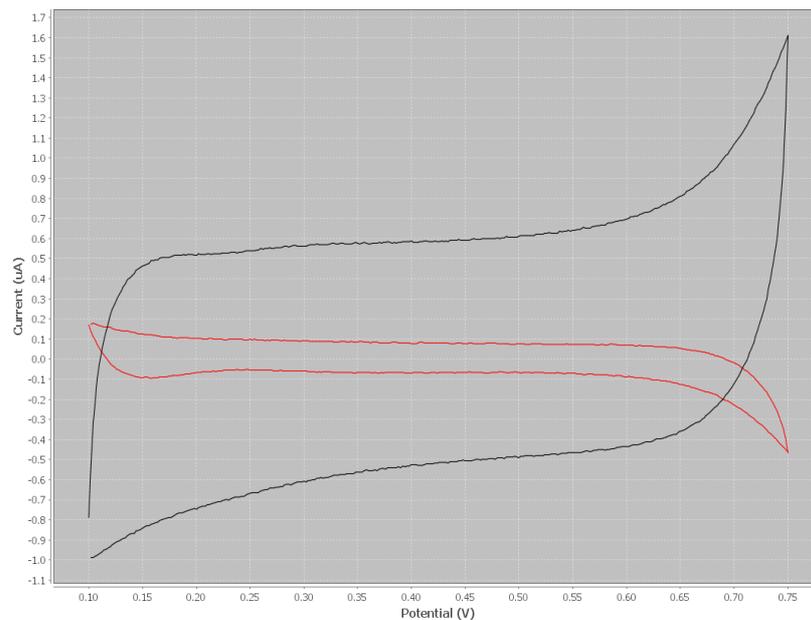


Figura 12. Voltamograma cíclico para la solución Britton – Robinson 3, pH = 4.03. En negro, la línea base de la solución reguladora; en rojo, la corrida para una solución 1×10^{-4} M de ácido ascórbico en el mismo buffer.

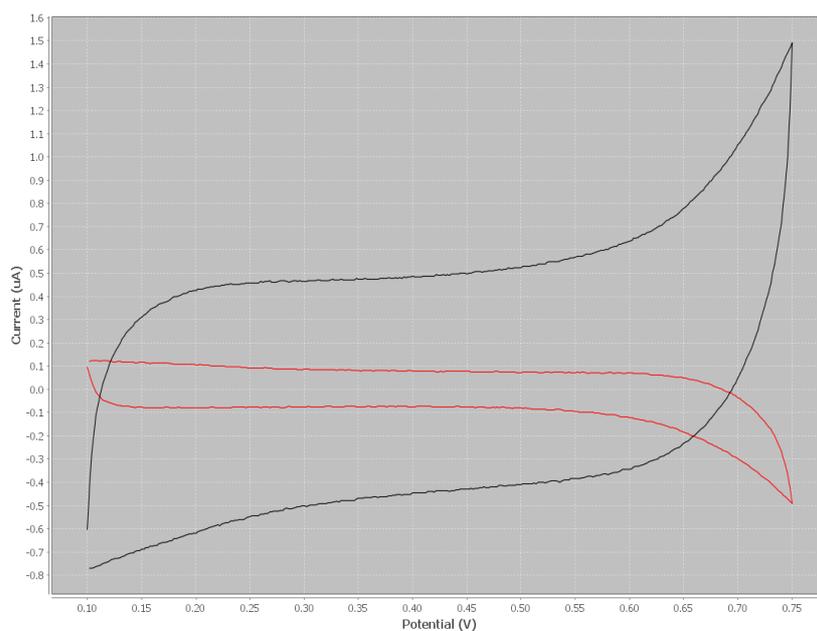


Figura 13. Voltamograma cíclico para la solución Britton – Robinson 4, pH = 5.07. En negro, la línea base de la solución reguladora; en rojo, la corrida para una solución 1×10^{-4} M de ácido

ascórbico en el mismo buffer.

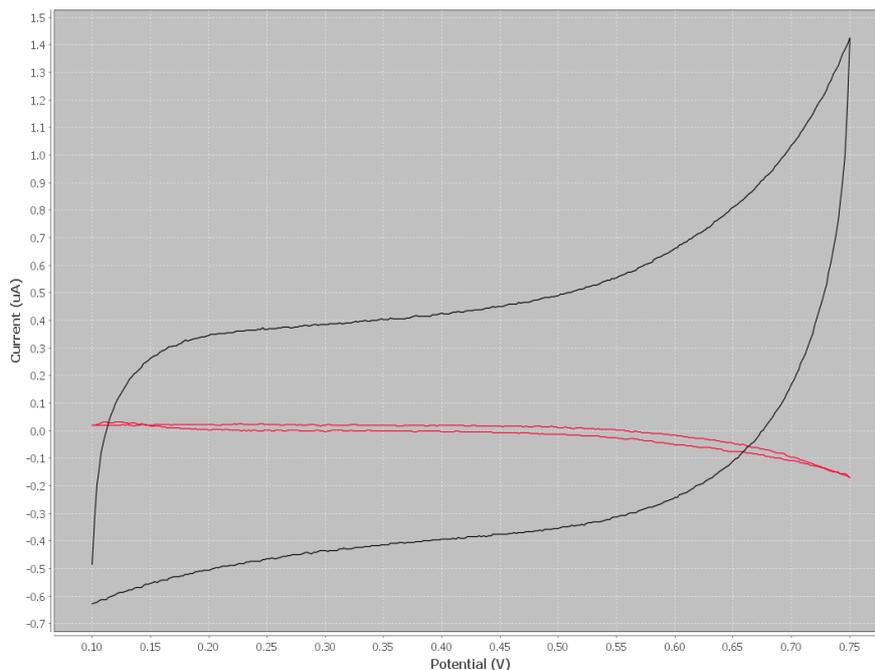


Figura 14. Voltamograma cíclico para la solución Britton – Robinson 5, pH = 7.02. En negro, la línea base de la solución reguladora; en rojo, la corrida para una solución 1×10^{-4} M de ácido ascórbico en el mismo buffer.

En cuanto a la influencia del pH en el medio, se ha podido apreciar que el estándar utilizado en las corridas ha estado demasiado diluido como para poder detectar ácido ascórbico. De todas formas, se puede realizar un análisis de forma indirecta observando la curva de reducción (parte inferior de la curva) del CV. Se puede claramente apreciar que el pico correspondiente a una cantidad de ácido dehidroascórbico está presente, y disminuye según el pH incrementa. En pH = 5, este pico es mínimo. En pH = 7 se observan problemas con la curva, principalmente atribuidos a que puede estarse tratando con una especie cargada (el ion ascorbato) el cual se aleja de la superficie del electrodo. Se ha escogido el la solución Britton – Robinson 4 de pH 5 como medio de las soluciones.

Repetibilidad Intra electródica

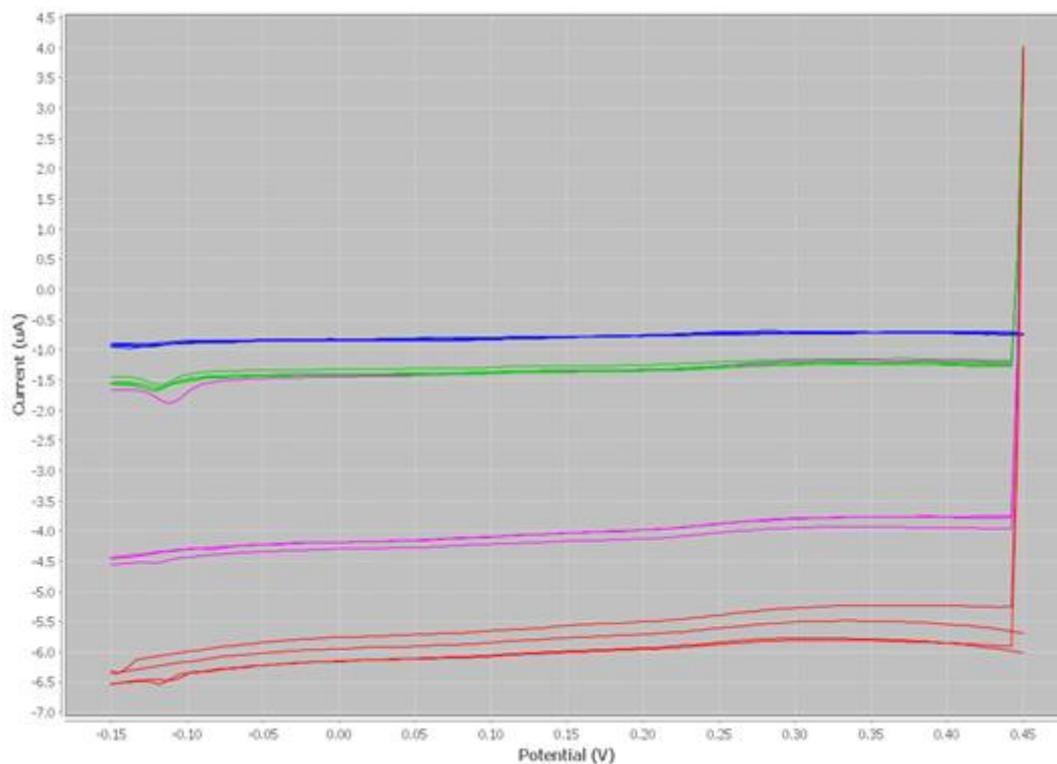


Figura 15. DPV obtenido a diferentes amplitudes de pulso para un estándar de ácido ascórbico 1×10^{-4} M en la reguladora Britton – Robinson 4 de pH 5. En azul, amplitud de pulso de 25 mV; en verde, amplitud de pulso de 50 mV; en rosado, amplitud de pulso de 75 mV; en rojo, amplitud de pulso de 100 mV.

De la **Figura 15** se puede apreciar que existe una buena repetibilidad intra electródica ya que todas las curvas obtenidas en el voltamograma reflejan perfiles similares a potenciales similares. También se ha podido notar que entre más grande sea la amplitud de pulso, existe una mayor separación entre las repeticiones de cierta amplitud; las curvas para las corridas de amplitud de 25 mV son mucho más cercanas y semejantes entre sí que las realizadas a 100 mV. Por último, cabe mencionar que una de las curvas de los análisis a amplitud 75 mV,

correspondiente a la última corrida está muy cerca de las curvas de 50 mV, lo cual puede atribuirse a que no se ha eliminado totalmente el analito del electrodo en el proceso de lavado.

Inter electródica

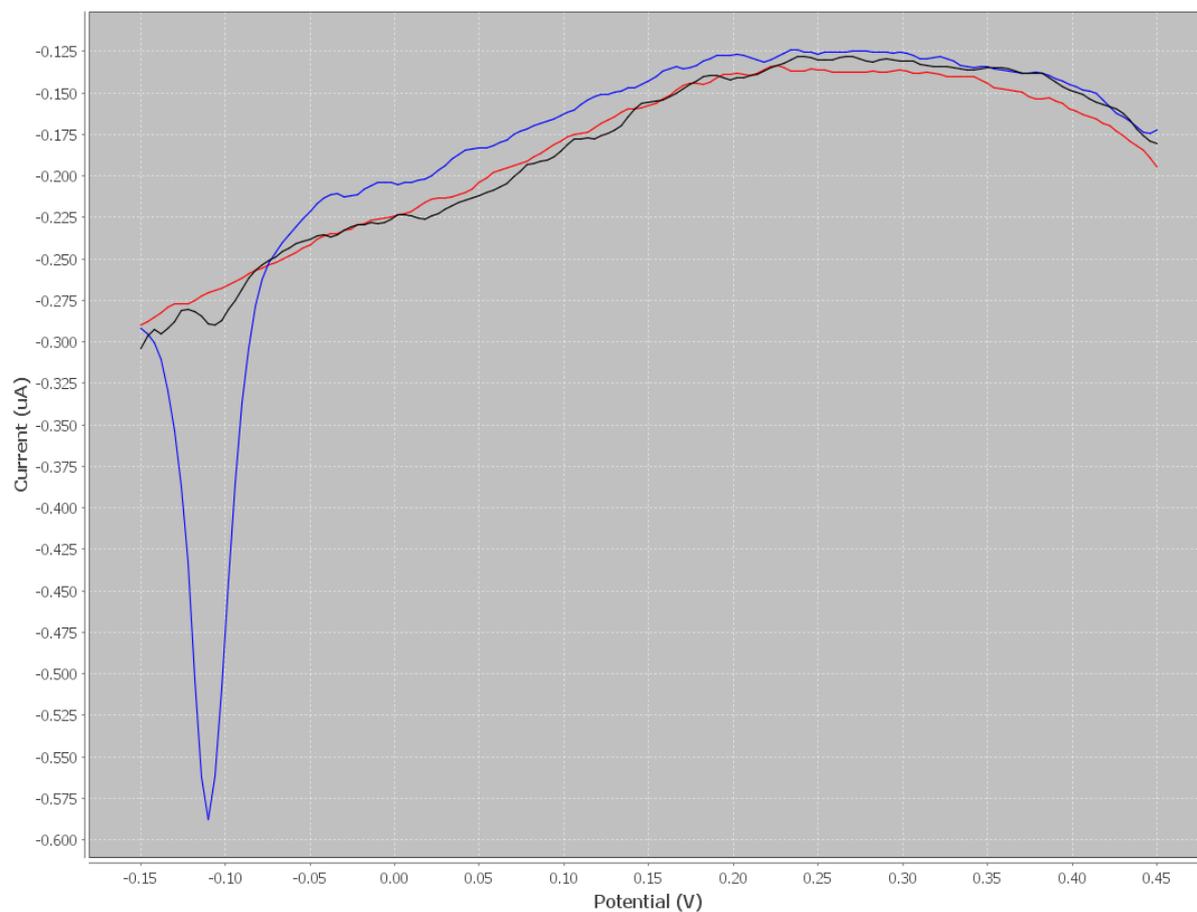


Figura 16. DPV para la solución reguladora Britton – Robinson 4 de pH 5, con una amplitud de pulso de 25 mV. En negro, el Electrodo 1; en azul, el Electrodo 2; en rojo, el Electrodo 3.

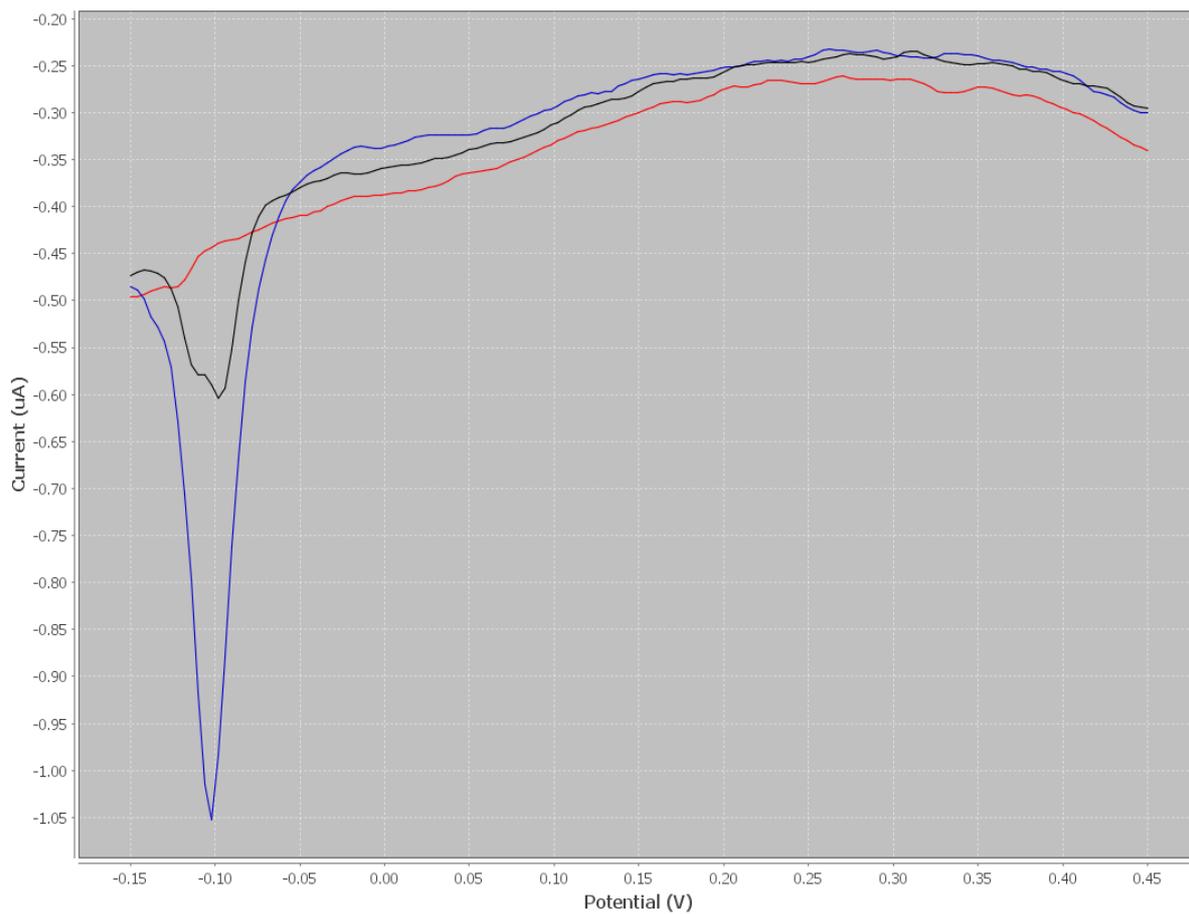


Figura 17. DPV para la solución reguladora Britton – Robinson 4 de pH 5, con una amplitud de pulso de 50 mV. En negro, el Electrodo 1; en azul, el Electrodo 2; en rojo, el Electrodo 3.

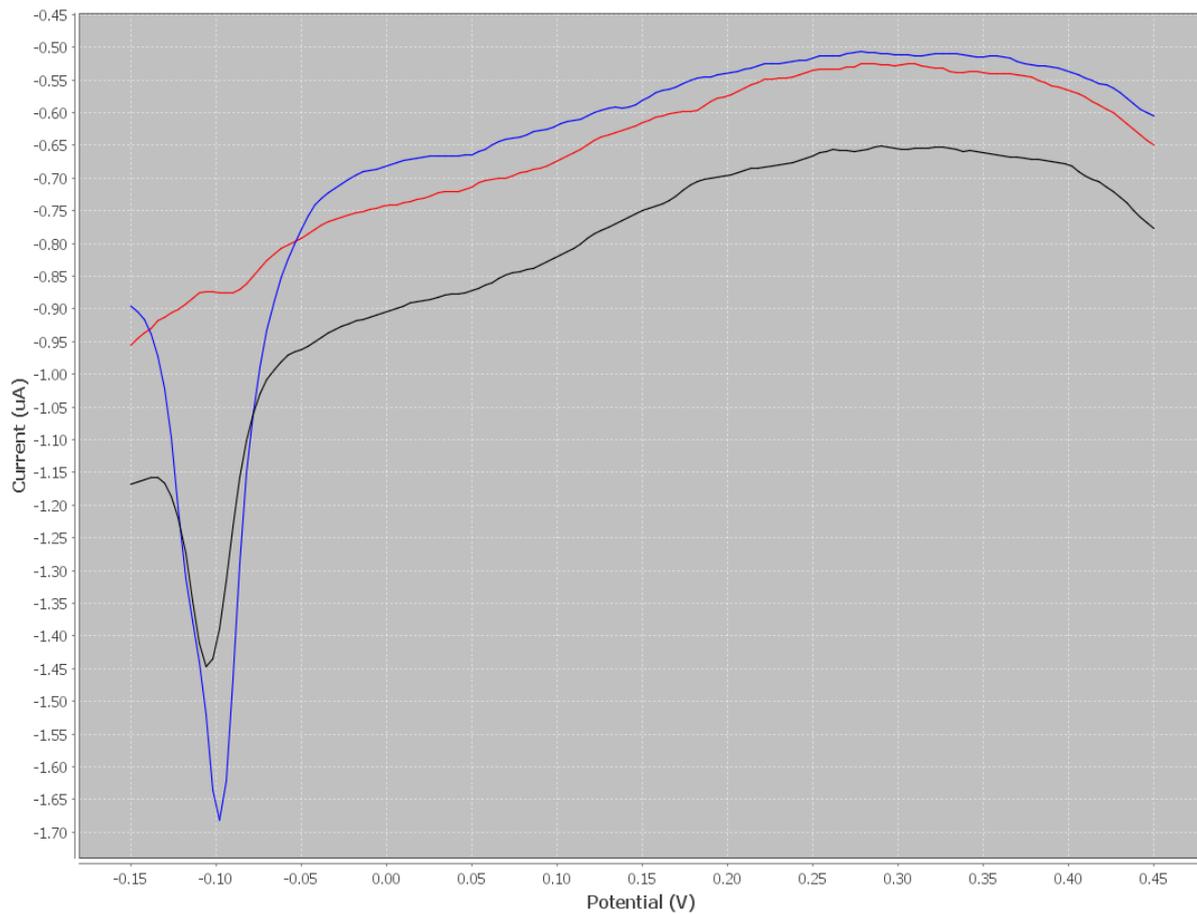


Figura 18. DPV para la solución reguladora Britton – Robinson 4 de pH 5, con una amplitud de pulso de 75 mV. En negro, el Electrodo 1; en azul, el Electrodo 2; en rojo, el Electrodo 3.

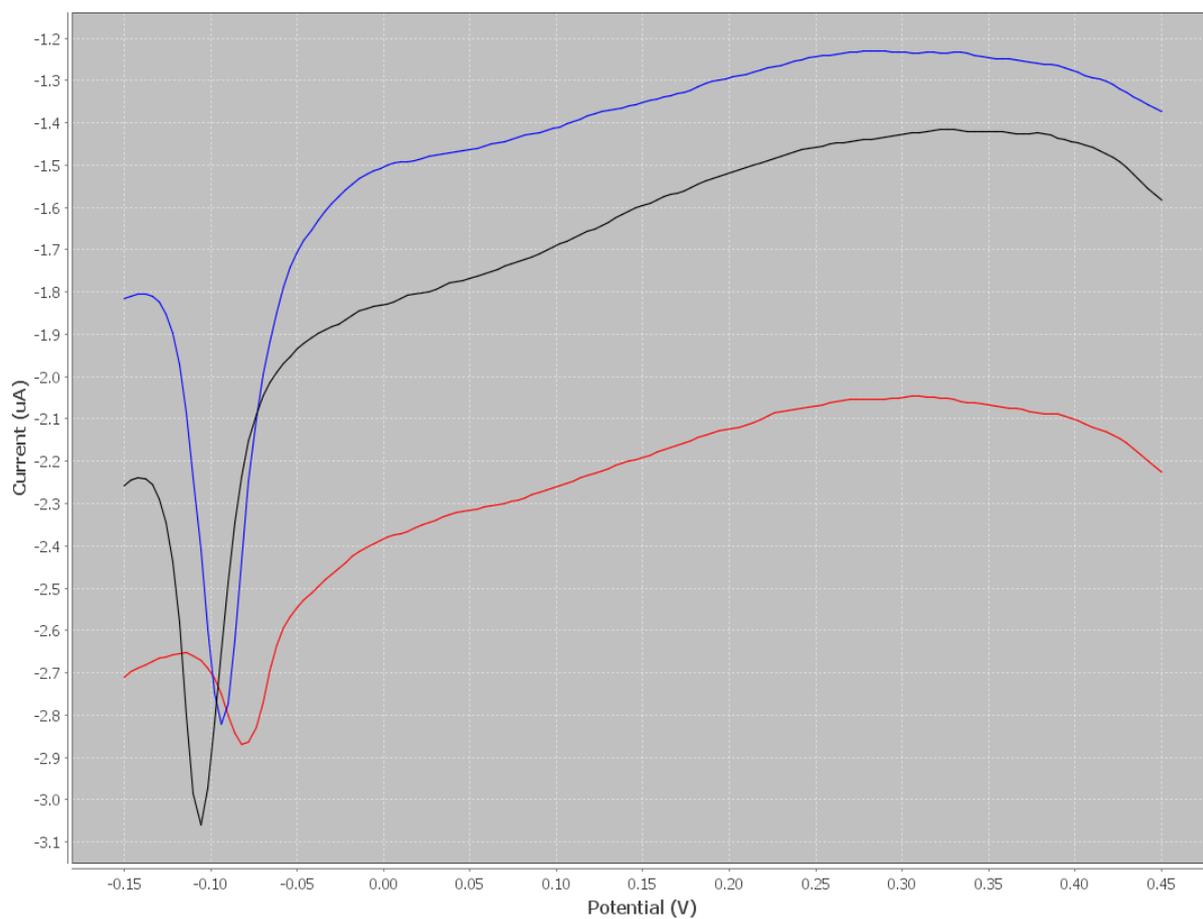


Figura 19. DPV para la solución reguladora Britton – Robinson 4 de pH 5, con una amplitud de pulso de 100 mV. En negro, el Electrodo 1; en azul, el Electrodo 2; en rojo, el Electrodo 3.

Curva de calibración con potenciostato.

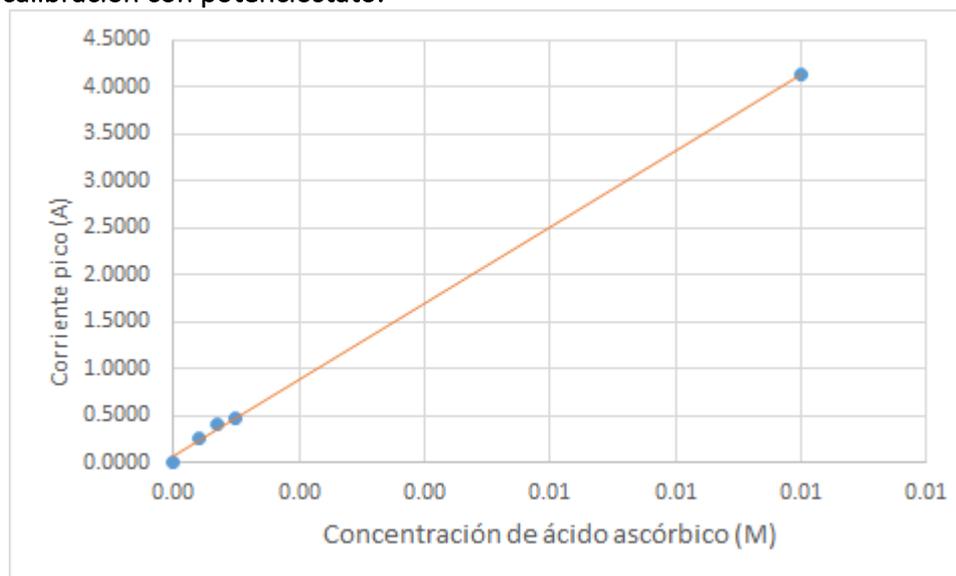


Figura 20. Curva de calibración: corriente como función de la concentración de ácido ascórbico para soluciones estándar preparadas en la reguladora Britton – Robinson 4.

La ecuación de la recta, y el coeficiente de correlación al cuadrado correspondientes

son:

$$y = 406.39x + 0.0736$$

$$r^2 = 0.9992$$

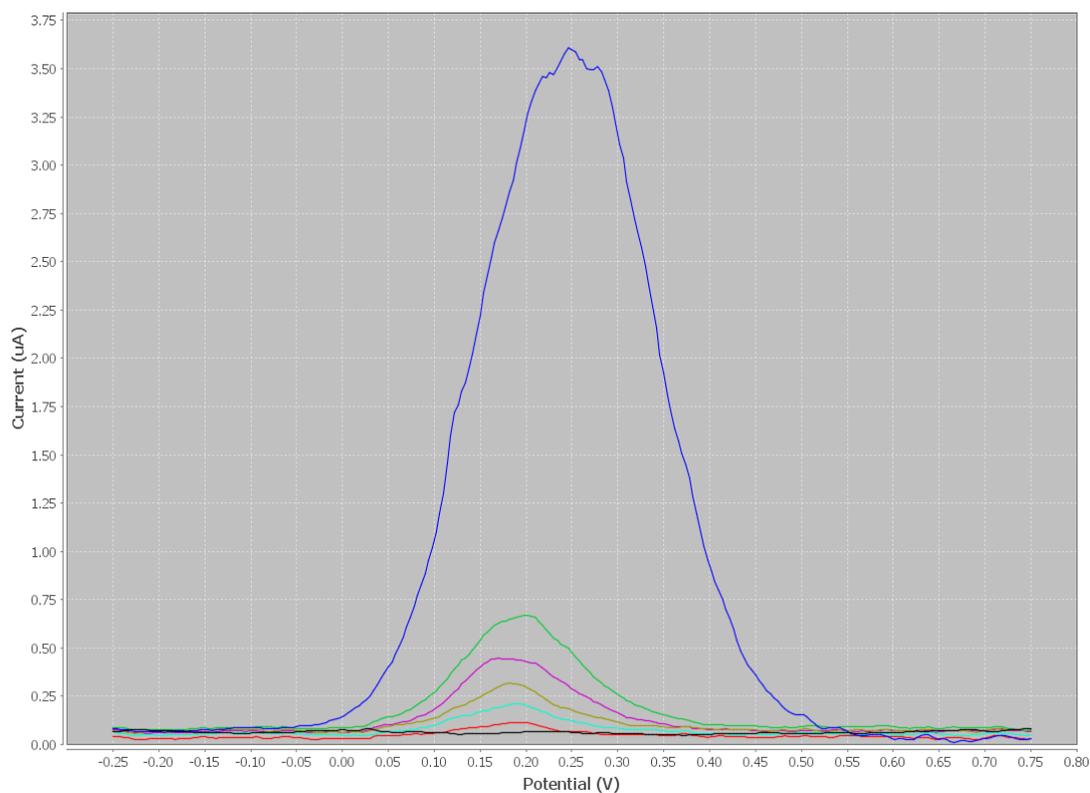


Figura 21. DPV para los estándares de ácido ascórbico con el fin de encontrar el límite de detección del potencióstato. En negro, la línea base de la reguladora Britton – Robinson 4; en rojo, el estándar 2×10^{-4} M; en celeste, el estándar 3×10^{-4} M; en mostaza, el estándar 4×10^{-4} M; en fucsia, el estándar 7×10^{-4} M; en verde, el estándar 1×10^{-3} M; en azul, el estándar 1×10^{-2} M.

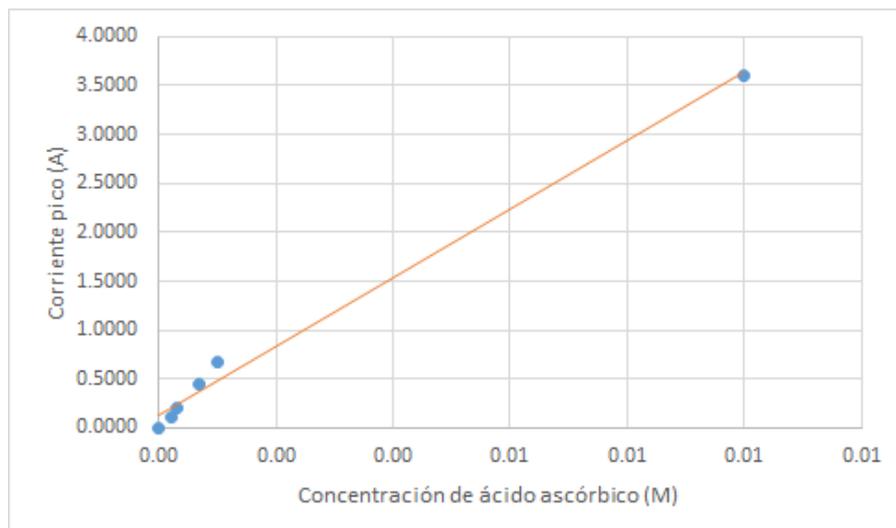


Figura 22. Curva de calibración: corriente pico como función de la concentración de ácido ascórbico para soluciones estándar preparadas en la reguladora Britton – Robinson 4, realizada en base a la prueba del límite de detección.

La ecuación de la recta y el coeficiente de correlación al cuadrado son:

$$y = 350.16x + 0.1295$$

$$r^2 = 0.993$$

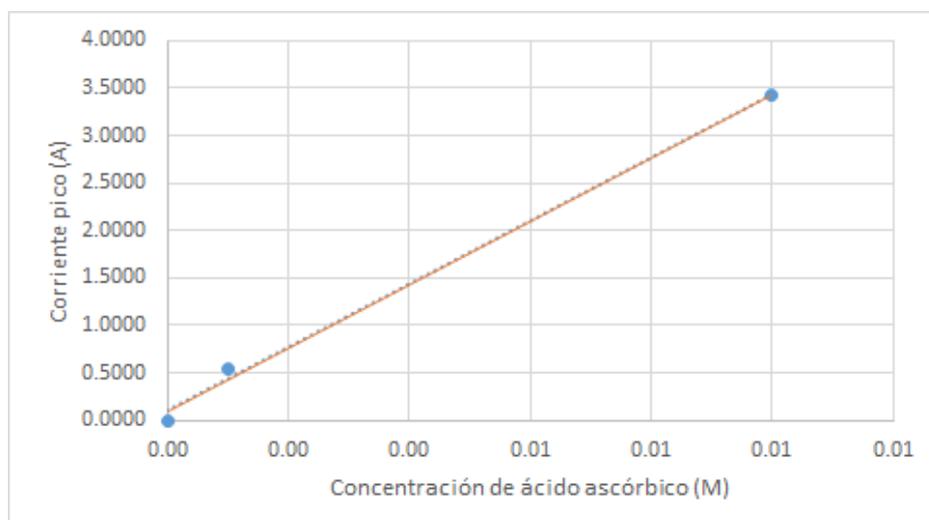


Figura 23. Curva de calibración: corriente pico como función de la concentración de ácido ascórbico para soluciones estándar concentradas preparadas en la reguladora Britton – Robinson 4.

Con la correspondiente ecuación de la recta y coeficiente de correlación:

$$y = 333.01x + 0.0988$$
$$r^2 = 0.9968$$

Dentro del rubro de las curvas de calibración para el método electroquímico, es posible apreciar regresiones lineales con coeficientes de correlación bastante buenos, muy cercanos a la unidad. Esto, además de indicar que los estándares fueron preparados apropiadamente, ha demostrado la capacidad del potencióstato en términos de sensibilidad para medir pequeñas corrientes. Sin embargo, es posible notar que las curvas de calibración difieren entre sí a pesar de contar con dichos coeficientes de correlación. Esto se debe principalmente a que los análisis por DPV no han sido repetidos con los mismos estándares. De todas formas, debería poder apreciarse una curva más semejante entre los distintos grupos de datos. Adicionalmente, se ha podido determinar que el límite de detección del potencióstato es de alrededor de 2×10^{-4} M para el ácido ascórbico, valor para el cual aún se observa linealidad. Este valor no es tan bajo como se podría desear, especialmente para el análisis de las muestras, lo cual será discutido en la siguiente subsección.

En la **Figura 22** se puede apreciar que, probablemente, una recta no sea lo que mejor se ajuste a los datos, sino una función de tipo sigmoïdal. Sin embargo, el alto coeficiente de correlación al cuadrado indica que la recta es una buena aproximación, y esta malinterpretación puede atribuirse a la falta de estándares menos discretos que describan lo que sucede entre el último y penúltimo estándares.

Análisis de muestras con el potenciostato.

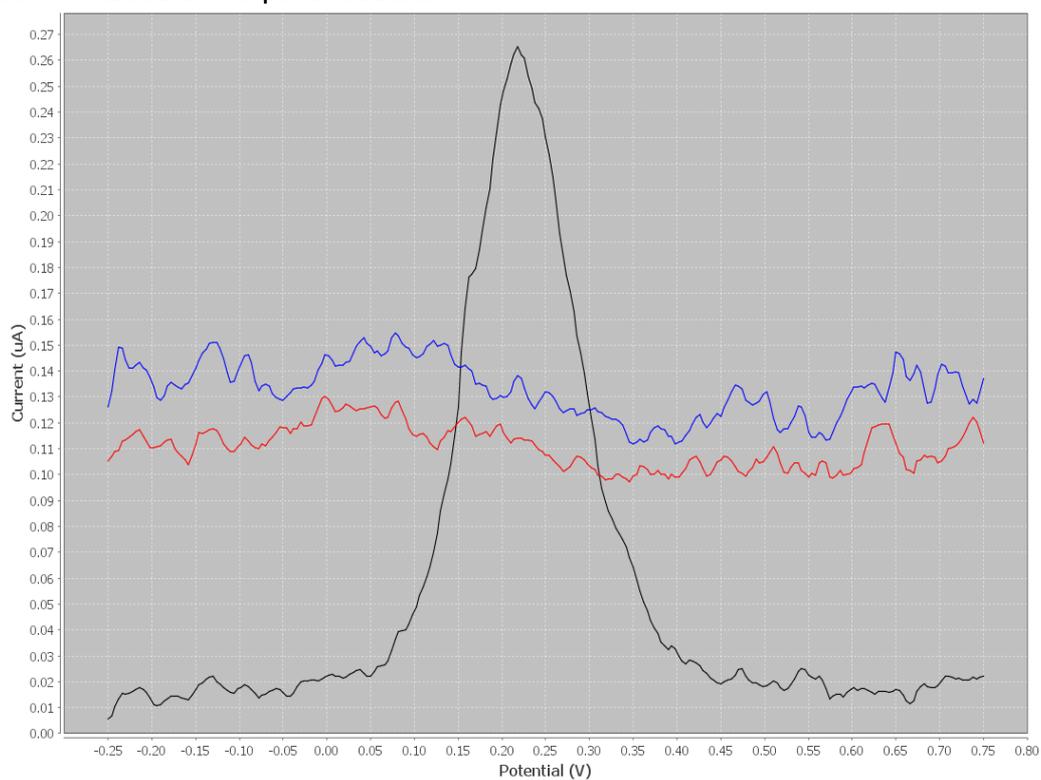


Figura 24. DPV para las diluciones 1:1 de muestra cruda y tratada del Miércoles 25-11-2015.

En rojo, la muestra cruda menos la línea base de la reguladora Britton – Robinson 4; en azul,

la muestra tratada menos la línea base de la reguladora Britton – Robinson 4; en negro, el

estándar de ácido ascórbico 4×10^{-4} M en la misma reguladora.

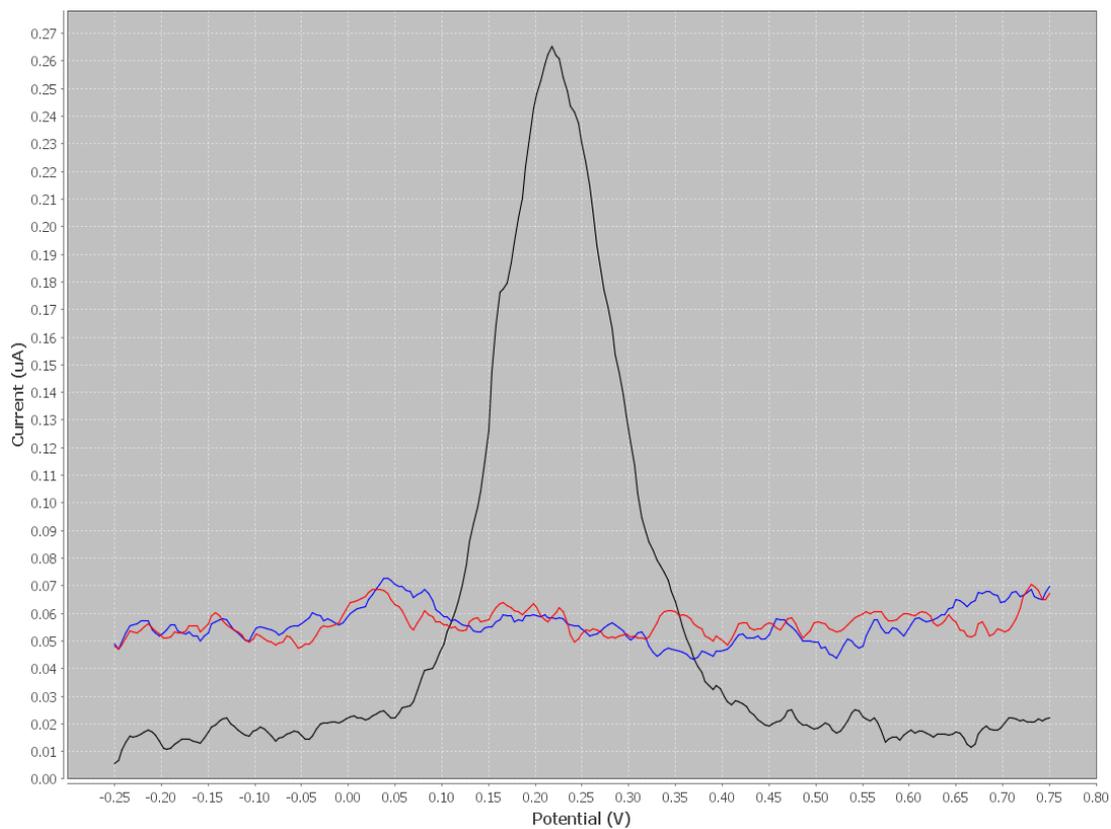


Figura 25. DPV para las diluciones 1:1 de muestra cruda y tratada del Jueves 26-11-2015. En rojo, la muestra cruda menos la línea base de la reguladora Britton – Robinson 4; en azul, la muestra tratada menos la línea base de la reguladora Britton – Robinson 4; en negro, el estándar de ácido ascórbico 4×10^{-4} M en la misma reguladora.

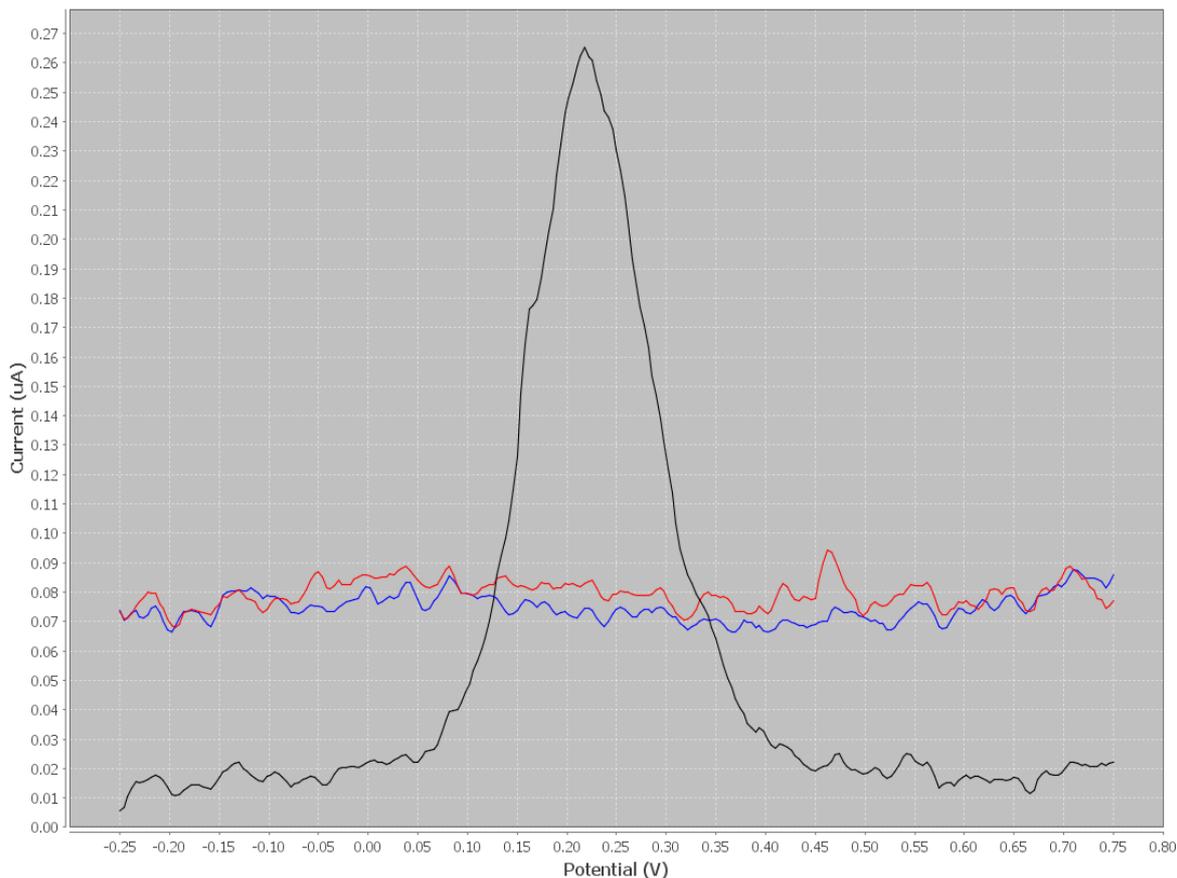


Figura 26. DPV para las diluciones 1:1 de muestra cruda y tratada del Viernes 27-11-2015. En rojo, la muestra cruda menos la línea base de la reguladora Britton – Robinson 4; en azul, la muestra tratada menos la línea base de la reguladora Britton – Robinson 4; en negro, el estándar de ácido ascórbico 4×10^{-4} M en la misma reguladora.

El análisis de las muestras ha sido un procedimiento elementalmente fallido debido a que, como se ha mencionado previamente, el potenciostato no posee un límite de detección tan bajo como es deseado. Es lógico pensar que la Vitamina C, en caso de encontrarse presente en las muestras, se encontraría en concentraciones sustancialmente disminuidas, debido a los largos lapsos de exposición al ambiente: luz, calor, y oxígeno. Por lo tanto, se puede argumentar que el potenciostato utilizado no es la mejor alternativa para la detección y cuantificación de ácido ascórbico en este tipo de muestras acuosas, cuyo principal culpable es el límite de

detección de 2×10^{-4} M. Cabe aclarar finalmente, que en las **Figura 24** **Figura 26** no se ha incluido el estándar 2×10^{-4} M de ácido ascórbico debido a que este solamente es el límite de detección, no el de cuantificación; por ello se ha tomado en cuenta el estándar 4×10^{-4} M.

Mediciones con HPLC.

Curva de calibración con HPLC.

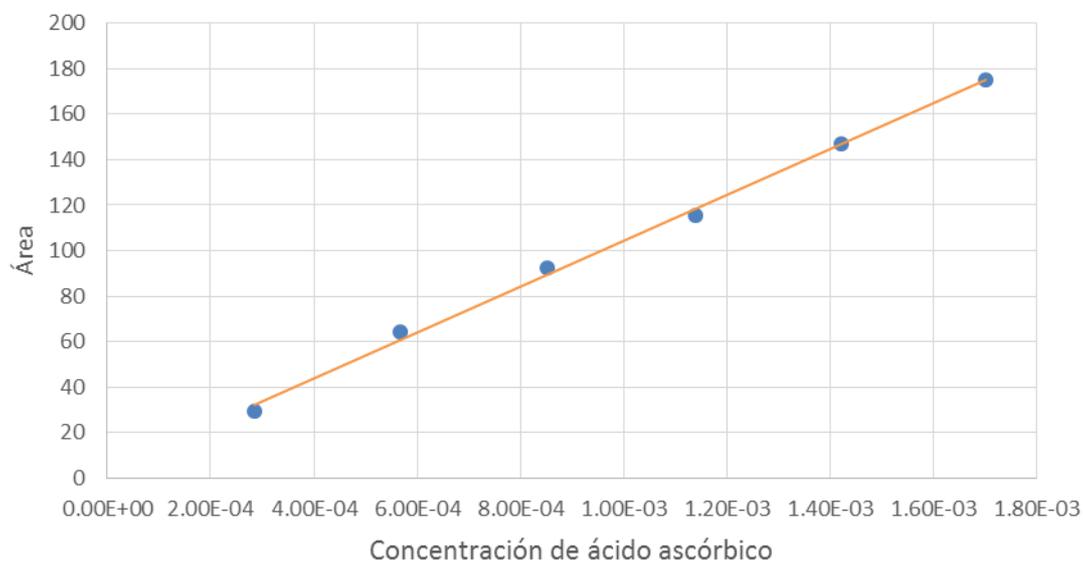


Figura 27. Curva de calibración para HPLC: área en función de la concentración de ácido ascórbico.

$$y = 100938x + 3.7214$$

$$r^2 = 0.9974$$

La curva de calibración para HPLC muestra un coeficiente de correlación muy cercano a la unidad, reflejando un bajo error. El tiempo de retención observado es de alrededor de 5.10 min. Finalmente, vale la pena mencionar que en los análisis cromatográficos existe una pequeña dificultad en el momento de realizar la integración de los picos de forma manual, cuando el software no lo hace automáticamente. Esto debido a que puede existir un sesgo en

los datos según la percepción del operador del sistema, ya que la terminación de un pico no siempre es clara ya que aquel del ácido dehidroascórbico se presenta inmediatamente a continuación del pico del ácido ascórbico. Por lo tanto, se puede argumentar que la resolución de los picos es una limitación importante en la integración, lo que indirectamente puede tener efecto sobre la cuantificación.

Límite de detección con HPLC.

Se ha realizado una prueba en cuanto al límite de detección de HPLC para el ácido ascórbico, con los estándares descritos en la Sección Experimental. Los resultados se muestran desde la **Figura 28** hasta la **Figura 32**. Importante: Las imágenes se encuentran con un acercamiento (zoom) distinto; no están a la misma escala.

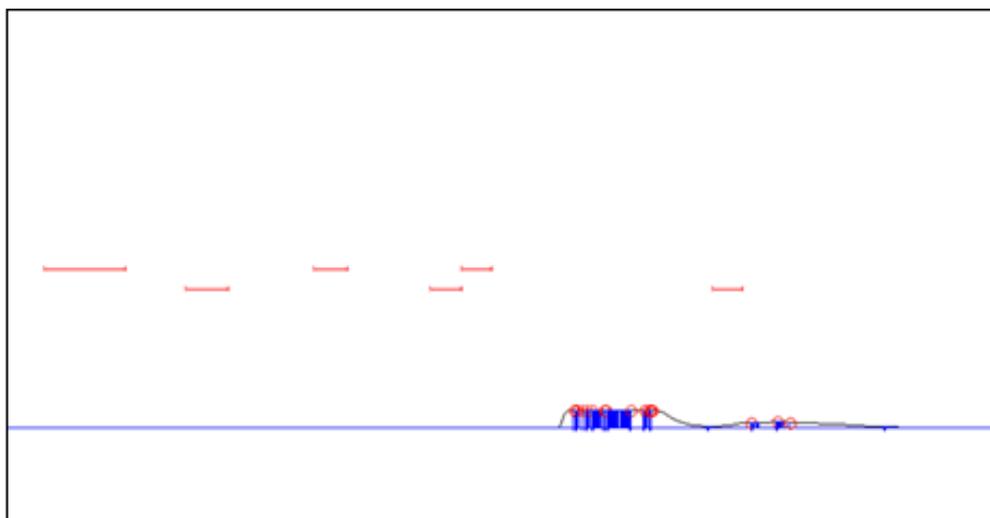


Figura 28. Prueba para el límite de detección de ácido ascórbico en HPLC. Análisis de un estándar 1×10^{-2} M

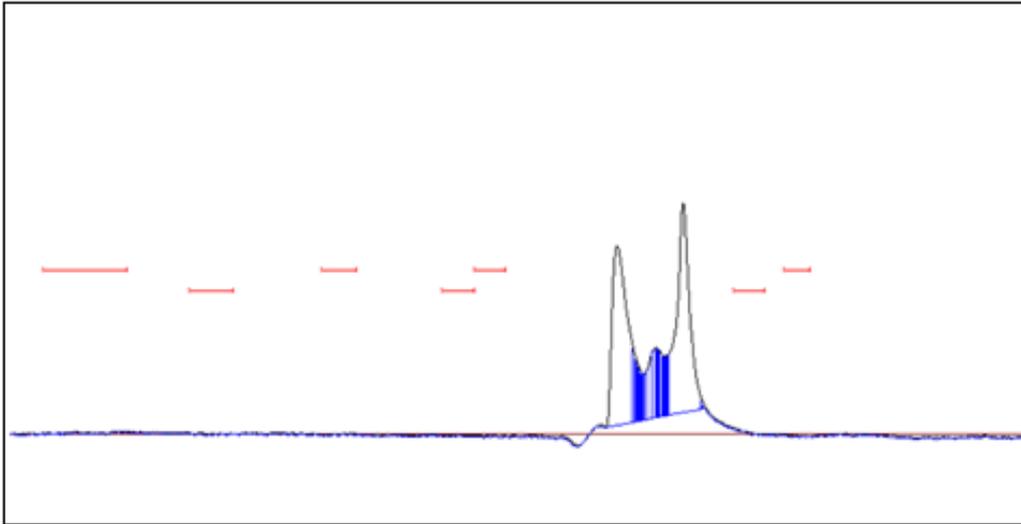


Figura 29. Prueba para el límite de detección de ácido ascórbico en HPLC. Análisis de un estándar 1×10^{-4} M.

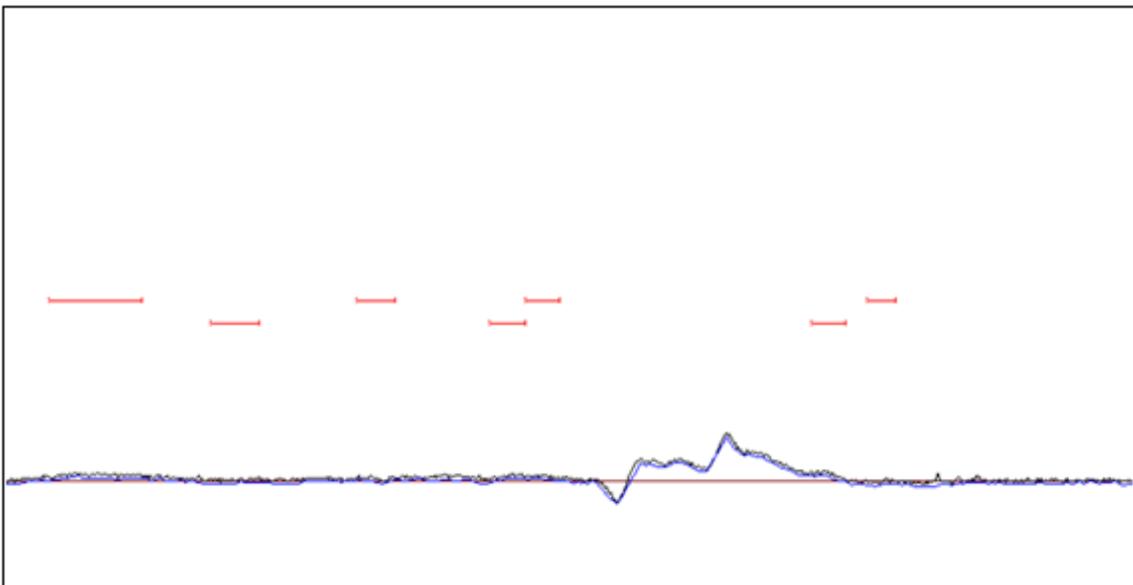


Figura 30. Prueba para el límite de detección de ácido ascórbico en HPLC. Análisis de un estándar 1×10^{-5} M.

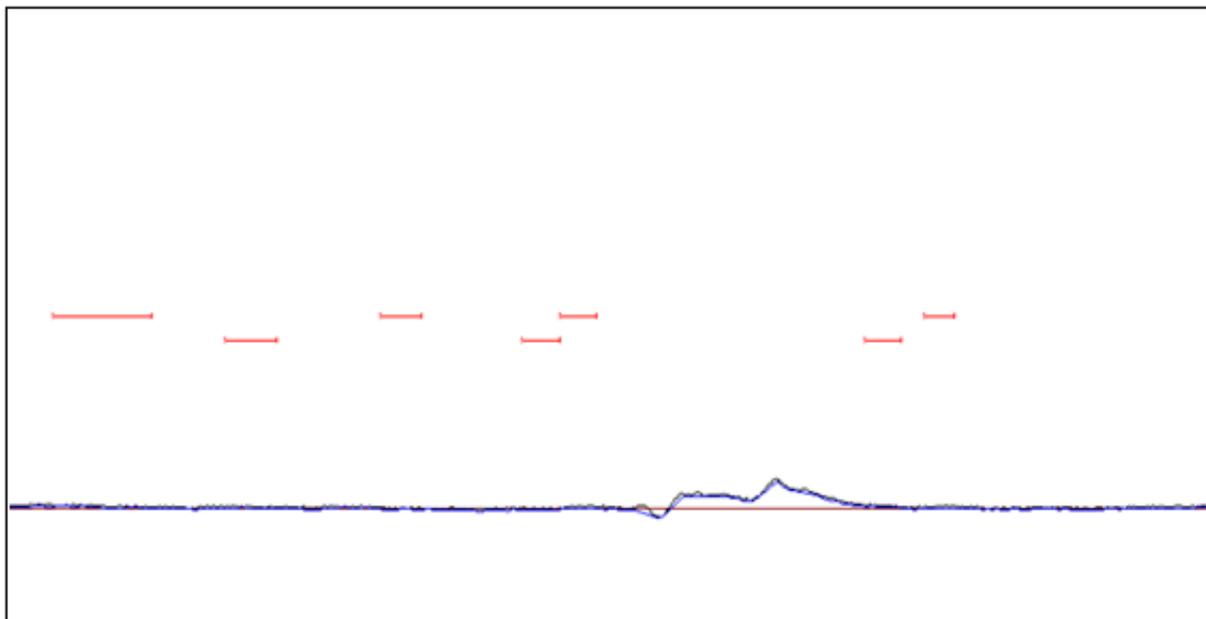


Figura 31. Prueba para el límite de detección de ácido ascórbico en HPLC. Análisis de un estándar 1×10^{-6} M.

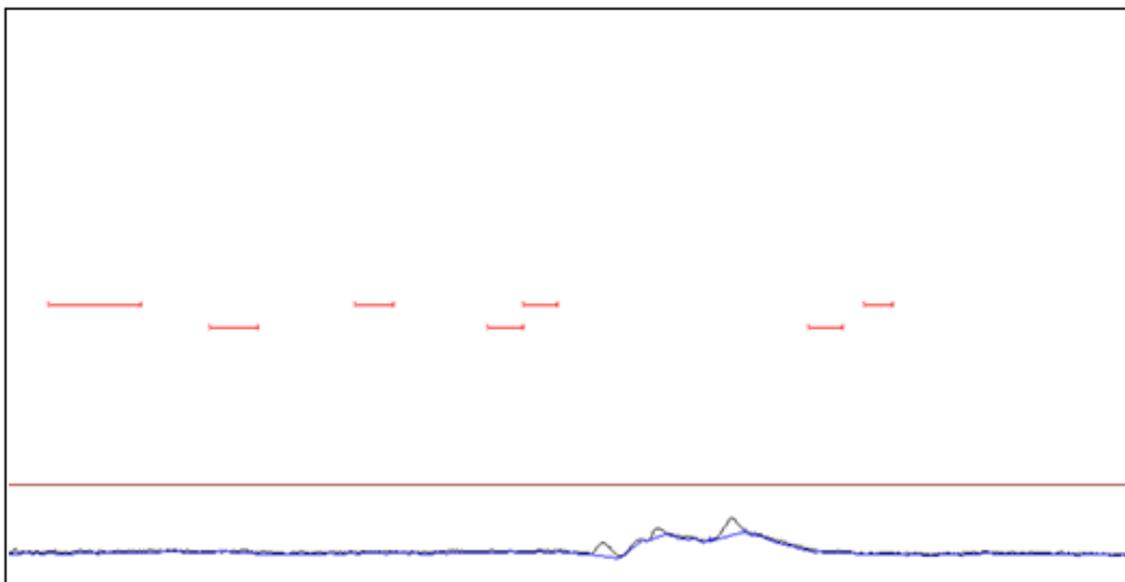


Figura 32. Prueba para el límite de detección de ácido ascórbico en HPLC. Análisis de un estándar 1×10^{-7} M.

La prueba del límite de detección en HPLC ha demostrado que es posible alcanzar una detección inclusive a concentraciones en el orden de 1×10^{-7} M, observando un pico para ácido ascórbico en el tiempo de retención esperado en todos los casos. El único dato que presenta alguna variación es el estándar más concentrado, 1×10^{-2} M, el cual tiene una gran definición entre los picos de ácido ascórbico y dehidroascórbico, pero cuyo pico de ácido ascórbico tiene un área sustancialmente marcada, y una forma chata. Esto puede deberse precisamente a la alta concentración utilizada.

Análisis de muestras con cromatografía.

Los análisis de dos muestras de días distintos: lunes 23-11-2015 y jueves 26-11-2015, tanto crudas y tratadas, se muestran desde la **Figura 33** hasta la **Figura 36**.

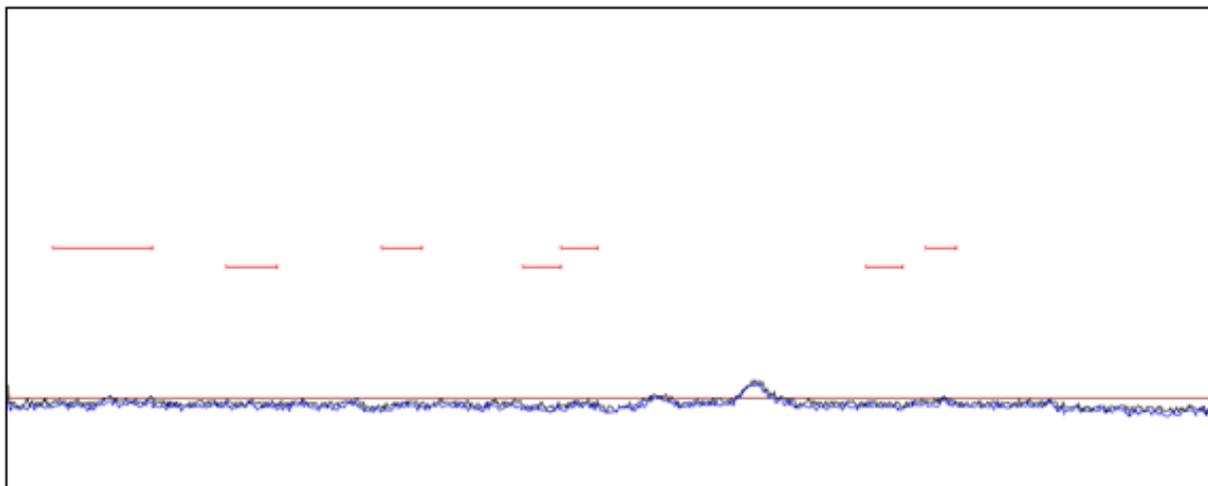


Figura 33. Análisis por HPLC de una muestra de agua cruda del Lunes 23-11-2015.

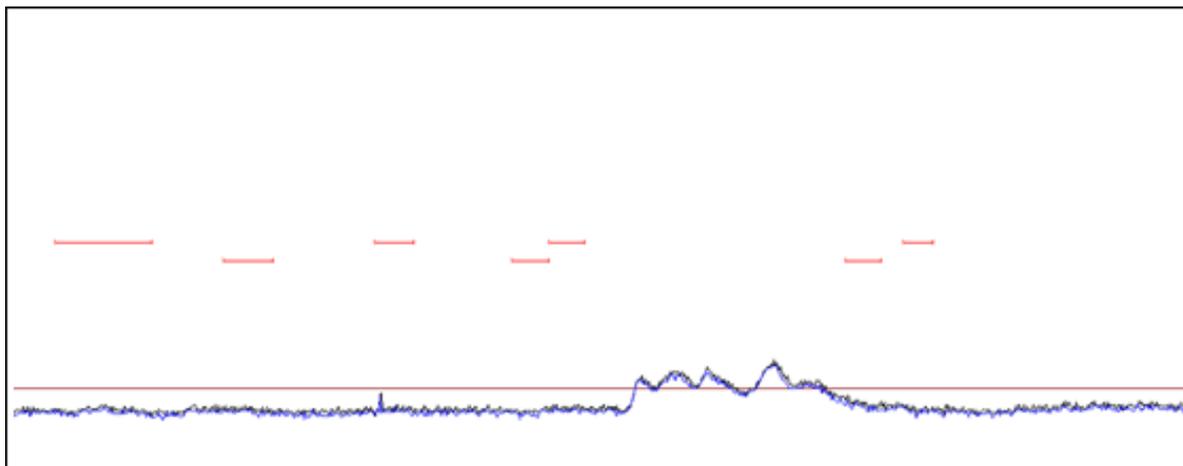


Figura 34. Análisis por HPLC de una muestra de agua tratada del Lunes 23-11-2015.

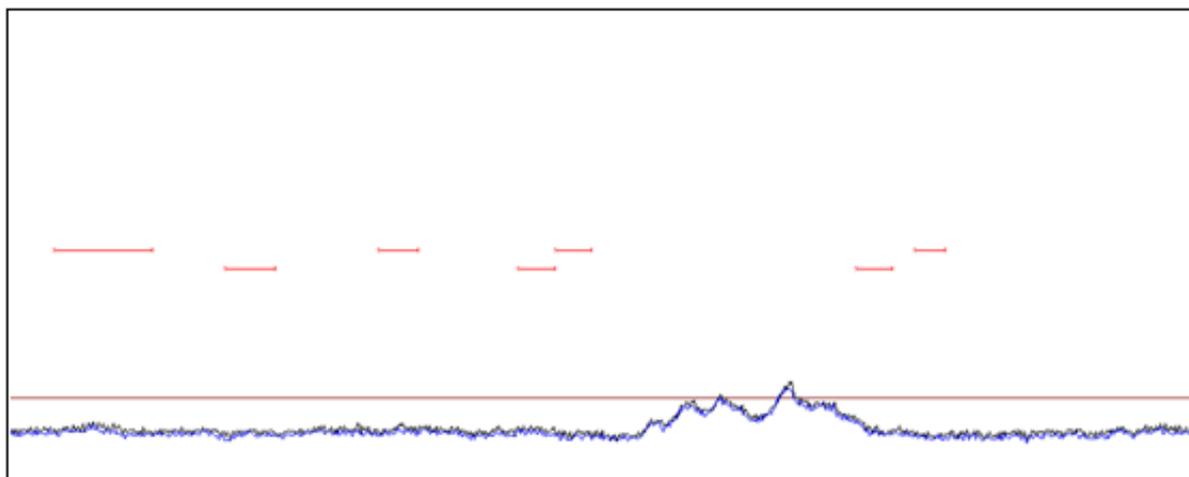


Figura 35. Análisis por HPLC de una muestra de agua cruda del Jueves 26-11-2015.

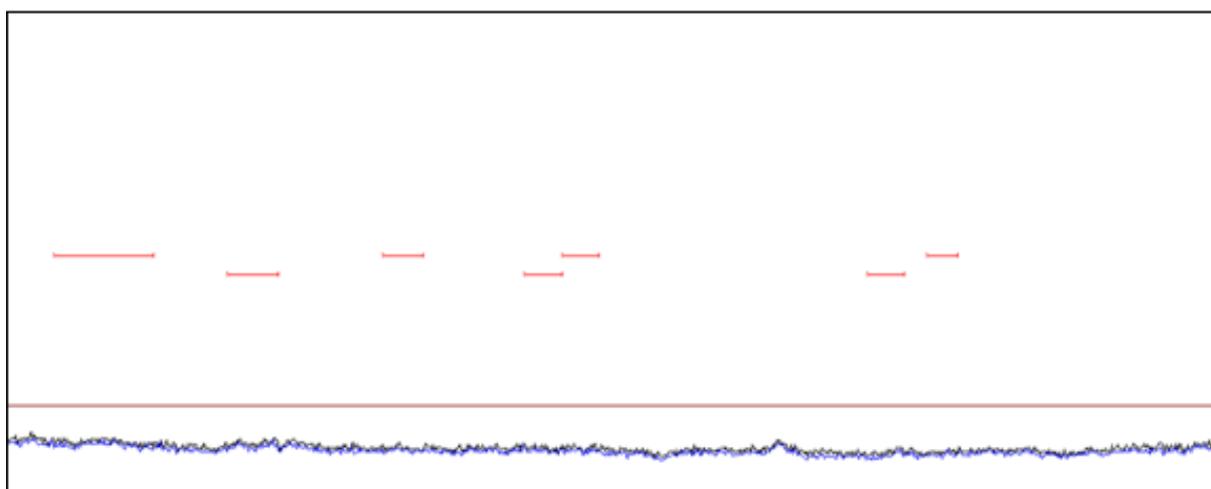


Figura 36. Análisis por HPLC de una muestra de agua tratada del Jueves 26-11-2015.

En primer lugar, como resultado general, se puede decir que ha sido posible detectar la presencia de ácido ascórbico mediante HPLC, debido a la existencia de pequeños picos en el tiempo de retención esperado, lo cual se puede apreciar especialmente en las **Figura 33**, **Figura 34**, y **Figura 35**. A pesar de ser un resultado importante en el presente trabajo, cabe recalcar que no es posible cuantificar el ácido ascórbico presente en estas muestras por dos motivos principales. El primero, es que sería necesario realizar una extrapolación a la curva de calibración establecida, lo cual no necesariamente puede brindar resultados certeros debido a que no se conoce si la curva sigue comportándose linealmente fuera del rango establecido. El segundo factor que imposibilita una cuantificación es que la concentración de ácido ascórbico en las muestras es muy cercana al límite de detección, lo cual no es muy deseable. Un límite de cuantificación deseable, por su parte, debería de ser alrededor de 3 desviaciones estándar mayor al límite de detección.

Como se puede apreciar en las muestras cruda y tratada del jueves 26-11-2015, si bien no es posible conocer en que magnitud, la concentración de ácido ascórbico ha disminuido de la muestra cruda a la tratada. Esto indica que esta ha sido oxidada. Lógicamente, entonces debería aparecer un pico correspondiente al ácido dehidroascórbico con una magnitud proporcional a la cantidad que se ha degradado. La no presencia de este pico puede atribuirse a que también se encuentra en una concentración tan baja que no es detectable, lo que puede sugerir que este desaparece como consecuencia de otro proceso llevado a cabo en la Planta Piloto.

Comparación y contraste de las técnicas utilizadas.

Para la técnica electroquímica se ha podido apreciar una gran versatilidad en cuanto a la manipulación de las variables involucradas. El tipo de análisis, DPV, CV, y las posibles

condiciones de cada una de ellas se pueden modificar en cuestión de segundos y volver a analizar la muestra en cuestión instantáneamente. En cuanto a tiempos de análisis y modificación de variables, la técnica electroquímica ha demostrado una evidente supremacía sobre la técnica cromatográfica la cual, por su parte, requiere de relativamente extensos tiempos de análisis (10 min) comparada con los de la electroquímica (30 s). La técnica electroquímica, adicionalmente, provee al usuario la ventaja de poder cambiar el electrodo serigrafiado a voluntad, lo cual implica una fácil búsqueda de mejores resultados eliminando errores potenciales que puedan presentarse debido al electrodo. En el caso del método cromatográfico no se puede hablar de facilidad en términos de cambiar uno de los componentes de detección, ya que implicaría desarmar al equipo de forma obligatoria.

Sin embargo, la técnica cromatográfica ha demostrado una alta sensibilidad para el ácido ascórbico a concentraciones sustancialmente bajas (1×10^{-7} M). Con eso en mente, esta técnica tiene que ser la primera a cual recurrir, entre ambas, cuando se espera que las muestras a analizar no estén concentradas. De todas maneras, es de fundamental importancia recalcar que en HPLC no es posible evitar la aparición del pico correspondiente al ácido dehidroascórbico, producto de la degradación del ácido ascórbico, al menos en altas concentraciones. Añadido a ese hecho se encuentra la dificultad de poder resolver eficazmente los picos de ambas especies presentes, ya que tienen que modificarse algunas variables en ensayos de prueba y error lo cual, como se ha mencionado previamente, es costoso en términos de tiempo para HPLC. En muy bajas concentraciones, como las que se han utilizado, es posible detectar un pico para el ácido ascórbico, pero no para el dehidroascórbico, lo que sugiere que el límite de detección para este último no es tan bajo como el del ácido ascórbico, lo cual podría facilitar cuantificaciones pero solamente en estos casos particulares. La técnica

electroquímica puede evitar directamente el problema de la aparición del pico del ácido dehidroascórbico, ya que si se analiza mediante voltametría diferencial de pulso, es posible barrer el potencial solamente de negativo a positivo, dentro del rango deseado. De esta forma es posible discriminar el análisis para solo presenciar un pico de corriente para el ácido ascórbico.

Cabe mencionar que ambas técnicas han presentado exigencias en el tiempo de preparación de estándares y de muestras. Para ambas ha sido necesario una buena degasificación previa con el fin de evitar interferencias, para la técnica electroquímica, y de no dañar la columna, para la técnica cromatográfica. En esta última, además ha sido necesario filtrar estándares y muestras ya que sólidos no disueltos pueden quedarse retenidos en la columna de forma permanente, causando daños definitivos.

Ultimas consideraciones generales.

Además de haber hecho análisis específicos para la repetibilidad intra e inter electródica, otros análisis corroboran sus resultados. Por ejemplo, hacer todos los análisis para la curva de calibración y obtener un alto coeficiente de correlación al cuadrado significa una buena repetibilidad en estos dos rubros.

De manera interesante, esto también sucede para el control del proceso. Los análisis realizados en aquella subsección indican que el proceso está controlado principalmente por difusión. Si se observa el voltamograma cíclico de la **Figura 3**, es posible observar que en la curva de reducción no se obtiene un pico para el ácido dehidroascórbico con un área de tamaño comparable a los de oxidación, lo cual sugiere que esta especie se difunde rápidamente en la solución y no logra ser reducido en la superficie del electrodo serigrafiado.

CONCLUSIONES

Al concluir este proyecto se ha podido establecer una clara diferencia entre el funcionamiento de los dos métodos utilizados, cromatografía y electroquímica, así como las ventajas y desventajas de cada uno de ellos. El análisis de las muestras que se ha llevado a cabo ha reflejado que la técnica electroquímica utilizada no es lo suficientemente útil en términos de sensibilidad hacia el ácido ascórbico, dentro de los lineamientos seguidos. Sin embargo, en el caso de muestras más concentradas, dentro del límite de detección, podría demostrar su verdadera valía. Por su parte, el uso de HPLC ha permitido la detección de ácido ascórbico en las muestras problema, pero tampoco ha permitido su cuantificación. La detección de ácido ascórbico a bajas concentraciones (1×10^{-7} M) ha demostrado que el analito se encuentra presente en las muestras y trabajo futuro en esta área debería tratar de replicar las características analíticas aquí determinadas, y buscar encontrar la concentración de ácido ascórbico en las muestras. Esto a su vez permitiría realizar consideraciones sobre el diseño de la Planta Piloto, donde se debería probar la eficiencia de los métodos oxidativos. Adicionalmente, una variable importante a ser medida en el futuro es a la Vitamina C como un trazador poblacional. El consumo de Vitamina C en la población podría ser medido indirectamente con los métodos descritos en el presente trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Chakraborty, A., Ramani, P., Sherlin, H., & al., e. (2014). Antioxidant and pro-oxidant activity of Vitamin C in oral environment. *Indian Journal of Dental Research*, 499-504.
- Colin-Orozco, E., Avendano-Corona, S., Ramirez-Silva, M., & al, e. (2012). On the Electrochemical Oxidation of Dopamine, Ascorbic Acid and Uric Acid onto a Bare Carbon Paste Electrode from a 0.1 M NaCl Aqueous Solution at pH 7. *International Journal of Electrochemical Science*, 6097-6105.
- Delanghe, J., Langlois, M., De Buyzere, M., & al, e. (2011). Vitamin C deficiency: more than just a nutritional disorder. *Genes Nutr*, 341-346.
- Dennison, D., Brawley, T., & Hunter, G. (1981). Rapid High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Ascorbic Acid and Combined Ascorbic Acid-Dehydroascrobic Acid in Beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 927-929.
- Ensafi, A., Taei, M., & Arabzadeh, K. (2010). Highly selective determination of ascorbic acid, dopamine, and uric acid by differential pulse voltammetry using poly(sulfonazo III) modified glassy carbon electrode. *Sensors and Actuators B*, 213-221.
- Leger, D. (2008). Scurvy: Reemergence of nutritional deficiencies. *Canadian Family Physician*, 1403-1406.

- Lu, X., Nan, M., Zhang, H., Liu, X., & al., e. (2007). Investigation of the Antioxidant Property of Ascorbic Acid. *Journal of Physical Chemistry*, 14998-15002.
- Lykkesfeldt, J., Loft, S., & Poulsen, H. (1995). Determination of Ascorbic Acid and Dehydroascorbic Acid in Plasma by High-Performance Liquid Chromatography with Coulometric Detection - Are They Reliable Biomarkers of Oxidative Stress? *Analytical Biochemistry*, 329-335.
- Mitic, S., Kostic, D., Naskovic-Dokic, D., & al., e. (2011). Rapid and Reliable HPLC Method for the Determination of Vitamin C in Pharmaceutical Samples. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 105-111.
- Ramakrishnan, S., Pradeep, K. R., Raghul, A., Senthilkumar, R., Rangarajan, M., & Kothurkar, N. (2012). One - step synthesis of Pt -decorated graphene-carbon nanotube for electrochemical sensing of dopamine, uric acid and ascorbic acid. *Analytical Methods*, 1-10.
- Safavi, A., Maleki, N., Moradlou, O., & al., e. (2006). Simultaneous determination of dopamine, ascorbic acid, and uric acid using carbon ionic liquid electrode. *Analytical Biochemistry*, 224-229.
- Shahrokhian, S., & Asadian, E. (2010). Simultaneous voltammetric determination of ascorbic acid, acetaminophen and isozianid using thionine immobilized multi-walled carbon nanotube modified carbon paste electrode. *Electrochimica Acta*, 666-672.
- Sood, S., Sartori, L., Wittmer, D., & Haney, W. (1976). High-Pressure Liquid Chromatographic Determination of Ascorbic Acid in Selected Foods and Multivitamin Products. *Analytical Chemistry*, 796-798.

- Uluata, S., McClements, J., & Decker, E. (2015). How the Multiple Antioxidant Properties of Ascorbic Acid Affect Lipid Oxidation in Oil-in-Water Emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1819-1824.
- Wagner, A., Huebbe, P., Konishi, T., & al., e. (2008). Free Radical Scavenging and Antioxidant Activity of Ascorbigen Versus Ascorbic Acid: Studies in Vitro and in Cultured Human Keratinocytes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 11694-11699.
- Wiberger, P. (1993). Effects of Vitamin C Deficiency on Body Shape and Skull Osteology in *Geophagus Brasiliensis*: Implications for Interpretations of Morphological Plasticity. *Copeia*, 343-351.
- Wilson, C., & Shaw, P. (1987). High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Ascorbic Acid in Aseptically Packaged Orange Juice Using Ultraviolet and Electrochemical Detectors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 329-331.
- Zhao, L., Li, H., Gao, S., & al, e. (2015). MgO nanobelt-modified graphene-tantalum wire electrode for the simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid. *Electrochimica Acta*, 191-198.