

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias e Ingeniería

**Estudio de la Degradación de Vitamina C (como ácido
ascórbico) Bajo Diferentes Métodos de Almacenamiento:
Determinación de la Influencia de la Luz en el Principio
Activo en Distintas Presentaciones
Proyecto de Investigación**

Carla Montesinos

Ingeniería Química

Trabajo de titulación presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniera Química

Quito, 16 de diciembre del 2015

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ
COLEGIO DE CIENCIAS E INGENIERÍA

**HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE TITULACIÓN**

**Estudio de la Degradación de Vitamina C (como ácido ascórbico) Bajo
Diferentes Métodos de Almacenamiento: Determinación de la Influencia de la
Luz en el principio Activo en Distintas Presentaciones.**

Carla Montesinos

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico

David A. Egas , PhD

Firma del profesor

Quito, 16 de diciembre del 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: Carla María Montesinos Maldonado

Código: 100406

Cédula de Identidad: 1719819904

Lugar y fecha: Quito, 16 de diciembre del 2015

RESUMEN

Tres fuentes de suplementos vitamínicos se usaron como fuente de vitamina C (conocido como ácido ascórbico, AA). El método de análisis de la concentración de AA se realizó mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC, por sus siglas en inglés) en modo isocrático. El sistema de HPLC usado es Buck Scientific con una columna Pinnacle II C18 (Restek, Estados Unidos, 5 μ m, 150mm x 4.6mm), a temperatura de laboratorio (22-24°C). El HPLC operó con flujo de 1 mL/ min, y resolución de 0.5. Se usó una fase móvil metanol:agua (5:95, v/v) acidificada con 6 gotas de H₂SO₄ 6M. El detector del HPLC es UV con longitud de onda de 254 nm. La curva de calibración fue lineal en el rango analizado de estándares de AA (0.05-0.3 mg/mL). El tiempo de retención del AA varió entre 5.5-5.9. Se logró obtener reproducibilidad y repetitividad en la curva de calibración. Las corridas de muestra tuvieron una duración de 10 minutos cada una mientras los estándares fueron analizados por 8 minutos. Se ha obtenido la fecha de expiración para los respectivos suplementos vitamínicos, la cual sobrepasa la fecha establecida en los frascos de los mismos. Por esta razón, se ha determinado la presencia de Zinc y Magnesio en los suplementos vitamínicos mediante absorción atómica como posible razón de la lenta degradación del ácido ascórbico. *Palabras clave: Ácido ascórbico, ácido dehidroascórbico, cromatografía líquida, degradación, vitamina C, suplementos vitamínicos, absorción atómica.*

ABSTRACT

Three vitamin supplements were used as a vitamin C source (known as ascorbic acid, AA). The analytical method used to determine the concentration of AA was high performance liquid chromatography (HPLC) in isocratic mode. A Buck Scientific HPLC system with a C18 Pinnacle II column (Restek, United States, 5 μ m, 150mm x 4.6mm), at laboratory temperature (22-24°C), was used. The HPLC operated with a flow of 1 mL/ min, and a resolution of 0.5. A mobile phase of methanol:water (5.95 v/v) acidified with 6 drops of H₂SO₄ 6M was used. The HPLC detector is UV with a wavelength of 254nm. The calibration curve was linearized on the range of AA standards (0.05-0.3 mg/mL). The retention time for AA was between 5.5-5.9. Reproducibility and repeatability was obtained for the calibration curve. The injections for the samples lasted 10 minutes each, while the standards were analyzed for 8 minutes. The expiration date was obtained for each vitamin supplement, and it was found that it exceeds the specified date on the vitamin packages. Therefore, the presence of Zinc and Magnesium in the vitamin supplements has been determined by atomic absorption as a possible reason for the slow degradation of ascorbic acid.

Key words: Ascorbic acid, dehydroascorbic acid, liquid chromatography, degradation, vitamin C, vitamin supplements, atomic absorption.

TABLA DE CONTENIDO

Introducción.....	15
Desarrollo del Tema.....	19
Parte experimental.....	19
Métodos y materiales.....	19
Químicos y reactivos.....	19
Muestras.....	19
Equipo HPLC y condiciones.....	19
Equipo absorción atómica y condiciones.....	20
Preparación de Soluciones.....	20
Fase Móvil.....	20
Estándares.....	20
Muestras.....	20
Líquido.....	21
Efervescente.....	21
Tabletas.....	21
Estándares absorción atómica.....	21
Preparación de muestras para absorción atómica.....	22
Efervescente.....	22
Líquida.....	22
Tabletas.....	22
Curva de calibración.....	22
Análisis de muestras.....	22
Presencia de metales.....	23

Resultados y discusión	23
Curva de calibración.....	23
Muestras.....	26
Orden 0.....	26
Orden 1.....	27
Orden 2.....	27
Efervescente.....	27
Muestras almacenadas al sol.....	28
Muestras almacenadas en ambiente fresco y oscuro.....	29
Líquido.....	31
Muestras almacenadas al sol.....	31
Muestras almacenadas en ambiente fresco y oscuro.....	33
Tabletas.....	34
Muestras almacenadas al sol.....	35
Muestras almacenadas en ambiente fresco y oscuro.....	36
Efervescente.....	39
Muestras almacenadas al sol.....	39
Muestras almacenadas en ambiente fresco y oscuro.....	40
Líquido.....	40
Muestras almacenadas al sol.....	41
Tabletas.....	42
Muestras almacenadas en ambiente fresco y oscuro.....	44
Conclusiones	53
Referencias bibliográficas	54
Anexo A: Cromatogramas de ácido ascórbico	56

Anexo B: Método integral 61

Anexo C: método Diferencial 63

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Cantidad Recomendada de Ingesta de Vitamina C	16
Tabla 2: Resultados concentración de ácido ascórbico (AA) y área de estándares para la curva de calibración 1.....	23
Tabla 3: Resultados concentración de ácido ascórbico (AA) y área, de estándares para la curva de calibración 2.....	24
Tabla 4: Concentración de ácido ascórbico (mg/mL) en función del tiempo (días) en distintos tipos de almacenamiento para las muestras efervescentes.	27
Tabla 5: Concentración de ácido ascórbico (mg/mL) en función del tiempo (días) en distintos tipos de almacenamiento para las muestras líquidas.	31
Tabla 6: Concentración de ácido ascórbico (mg/mL) en función del tiempo (días) en distintos tipos de almacenamiento para las muestras en tabletas.	34
Tabla 7: Resultados de la cinética de degradación para suplementos vitamínicos almacenados en diferentes ambientes	45
Tabla 8: Fechas de expiración para los diferentes suplementos vitamínicos.....	46
Tabla 9: Razón de degradación para los medicamentos de vitamina C	47
Tabla 10: Concentración de Zn y Mg para pastillas efervescentes	50
Tabla 11: Concentración de Zn y Mg para vitamina C en líquido	50
Tabla 12: Concentración de Zn y Mg para tabletas.....	50
Tabla 13: Concentración de Zn y Mg en los suplementos vitamínicos	51
Tabla 14: Resultados del método diferencial para pastillas efervescentes almacenadas al sol	63

Tabla 15: Resultados del método diferencial para pastillas efervescentes almacenadas en lugar fresco y oscuro	63
Tabla 16: Resultados del método diferencial para presentación líquida almacenadas al sol .	64
Tabla 17: Resultados del método diferencial para presentación líquida almacenadas en un lugar fresco y oscuro	64
Tabla 18: Resultados del método diferencial para tabletas almacenadas al sol	65
Tabla 19: Resultados del método diferencial para tabletas almacenadas en un lugar fresco y oscuro	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Curva de calibración de ácido ascórbico obtenida para días diferentes (prueba de repetitividad).	24
Figura 2: Curva de Calibración de Ácido Ascórbico.....	25
Figura 3: Concentración de AA versus tiempo para reacción elemental de orden 0 para pastillas efervescentes almacenadas al sol.	28
Figura 4: Logaritmo natural de concentración de AA versus tiempo para reacción elemental de orden 1 para pastillas efervescentes almacenadas al sol.	28
Figura 5: Inversa de la concentración de AA versus tiempo para reacción elemental de orden 2 para pastillas efervescentes almacenadas al sol.	29
Figura 6: Concentración de AA versus tiempo para reacción elemental de orden 0 para pastillas efervescentes almacenadas en ambiente fresco y oscuro.	29
Figura 7: Logaritmo natural de concentración de AA versus tiempo para reacción elemental de orden 1 para pastillas efervescentes almacenadas en ambiente fresco y oscuro.....	30
Figura 8: Inversa de la concentración de AA versus tiempo para reacción elemental de orden 2 para pastillas efervescentes almacenadas en ambiente fresco y oscuro.	30
Figura 9: Concentración de AA versus tiempo para reacción elemental de orden 0 para presentación líquida almacenadas al sol.....	31
Figura 10: Logaritmo natural de concentración de AA versus tiempo para reacción elemental de orden 1 para presentación líquida almacenadas al sol.....	32
Figura 11: Inversa de la concentración de AA versus tiempo para reacción elemental de orden 2 para presentación líquida almacenadas al sol.	32

Figura 12: Concentración de AA versus tiempo para reacción elemental de orden 0 para presentación líquida almacenadas en ambiente fresco y oscuro.	33
Figura 13: Logaritmo natural de concentración de AA versus tiempo para reacción elemental de orden 1 para presentación líquida almacenadas en ambiente fresco y oscuro.	33
Figura 14: Inversa de la concentración de AA versus tiempo para reacción elemental de orden 2 para presentación líquida almacenadas en ambiente fresco y oscuro.	34
Figura 15: Concentración de AA versus tiempo para reacción elemental de orden 0 para tabletas almacenadas al sol.	35
Figura 16: Logaritmo natural de concentración de AA versus tiempo para reacción elemental de orden 1 para tabletas almacenadas al sol.	35
Figura 17: Inversa de la concentración de AA versus tiempo para reacción elemental de orden 2 para tabletas almacenadas al sol.	36
Figura 18: Concentración de AA versus tiempo para reacción elemental de orden 0 para tabletas almacenadas en ambiente fresco y oscuro.	36
Figura 19: Logaritmo natural de concentración de AA versus tiempo para reacción elemental de orden 1 para tabletas almacenadas en ambiente fresco y oscuro.	37
Figura 20: Inversa de la concentración de AA versus tiempo para reacción elemental de orden 2 para tabletas almacenadas en ambiente fresco y oscuro.	37
Figura 21: Polinomio ajustado a la concentración de AA versus tiempo para pastillas efervescentes almacenadas al sol.	39
Figura 22: Polinomio ajustado a la concentración de AA versus tiempo para pastillas efervescentes almacenadas en lugar fresco y oscuro.	40

Figura 23: Polinomio ajustado a la concentración de AA versus tiempo para presentación líquida almacenada al sol.	41
Figura 24: Polinomio ajustado a la concentración de AA versus tiempo para presentación líquida almacenada en lugar fresco y oscuro.	42
Figura 25: Polinomio ajustado a la concentración de AA versus tiempo para tabletas almacenadas al sol.....	43
Figura 26: Polinomio ajustado a la concentración de AA versus tiempo para tabletas almacenadas en lugar fresco y oscuro.	44
Figura 27: Curva de calibración de Zinc	49
Figura 28: Curva de calibración de Magnesio	49
Figura 29: Estructura de L-ácido asórbico.....	51
Figura 30: Cromatograma característico de los estándares de AA.....	56
Figura 31: Cromatograma característico de muestras efervescentes de control.....	56
Figura 32: Cromatograma de muestras efervescentes almacenadas al sol.....	57
Figura 33: Cromatograma característico de muestras efervescentes almacenadas en lugar fresco y oscuro.....	57
Figura 34: Cromatograma característico de muestras líquidas de control.....	58
Figura 35: Cromatograma de muestras líquidas almacenadas al sol.....	58
Figura 36: Cromatograma característico de muestras líquidas almacenadas en lugar fresco y oscuro	59
Figura 37: Cromatograma característico de muestras en tabletas de control.....	59
Figura 38: Cromatograma de muestras en tabletas almacenadas al sol.....	59

Figura 39: Cromatograma característico de muestras en tabletas almacenadas en lugar

fresco y oscuro..... 60

INTRODUCCIÓN

El ácido ascórbico (AA), conocido comúnmente como vitamina C, es un sólido blanco inodoro e hidrosoluble (Nojavan & et. al, 2008). El isómero activo de este compuesto es el ácido L-ascórbico y el ácido L-dehidroascórbico (DHAA). El AA se oxida a ácido dehidroascórbico (DHAA) mediante una reacción reversible. Esto se da debido a algunas condiciones: altas temperaturas, presencia de oxígeno, luz, alto pH y acción enzimática (Nováká & et. al, 2008).

Esta vitamina juega un papel muy importante dentro del cuerpo humano, puesto que actúa como antioxidante y es un precursor en la producción de colágeno (vital para la cicatrización) (National Institutes of Health, 2011). La vitamina C sintetiza citocromo P₄₅₀, esencial para reacciones de destoxificación; disminuye el colesterol al sintetizar ácidos biliares, entre otros (Biesalski & Grimm, 2007). La vitamina C forma parte de algunos mecanismos biológicos como su reducción a ascorbato, el cual participa en sistemas redox como el del glutaión (Biesalski & Grimm, 2007). Es un donante de hidrógenos en las reacciones de hidroxilación, por ejemplo en la síntesis de adrenalina (Biesalski & Grimm, 2007).

Tabla 1: Cantidad Recomendada de Ingesta de Vitamina C

Edad	Cantidad Recomendada [mg]	Edad	Cantidad Recomendada [mg]
0-6 meses	40	Hombres Adultos	90
7-12 meses	50	Mujeres Adultas	75
1-3 años	15	Adolescentes Embarazadas	80
4-8 años	25	Mujeres Embarazadas	85
9-13 años	45	Adolescentes en período de lactancia	115
Varones 14-18 años	75	Mujeres en período de lactancia	120
Mujeres 14-18 años	65		

Su déficit reduce la resistencia a infecciones (Gil, 2010) y produce escorbuto. Según el Instituto Nacional de la Salud (NIH por sus siglas en inglés) la cantidad recomendada al día se muestra en la Tabla 1.

Debido a la ley pasada en el año 1979, las farmacéuticas tienen que incluir una fecha de expiración en sus productos. Esta fecha es únicamente una garantía de que el suplemento todavía mantiene el 90% de su potencia terapéutica o principio activo de los medicamentos. Sin embargo, esto es referente a los envases que permanecen cerrados (Harvard, 2003). En un estudio realizado por la Food and Drug Administration (FDA), se encontró que el 90% de los medicamentos se encontraban en perfectas condiciones después de 15 años (envase cerrado) (Harvard, 2003).

El almacenamiento de los medicamentos tiene un impacto sobre el principio activo de los mismos. La temperatura afecta la degradación de los medicamentos. El almacenamiento

adecuado de la vitamina C debe ser en un lugar fresco y oscuro para que se cumpla con la fecha de expiración proporcionada por el fabricante. Sin embargo, una vez abierto el empaque, se lo expone al aire. Esto conduce a la degradación de la vitamina C y a la pérdida de su principio activo (Oyetade & et. al, 2012). Por otro lado, un almacenamiento inadecuado (expuesto a la luz solar), conduce a una degradación más rápida del medicamento. Es por esto que el fabricante no puede garantizar la fecha de expiración una vez abierto el empaque. Esto se debe a que el mismo desconoce las condiciones de almacenamiento de cada empaque, causando que la fecha de expiración predicha no sea la misma (Blakley, 2004).

La cinética de una reacción homogénea describe el cambio en la concentración de un componente en función del tiempo. Por ejemplo, si se tiene una reacción $A + B \rightarrow C$, la velocidad de desaparición de A en un reactor batch va a estar dada por (Foggler, 2001)

$$-r_A = \frac{dC_A}{dt}$$

La velocidad de reacción dice que tan rápido se dará la misma y en función de que componentes. Esta va a ser velocidad de decrecimiento para reactivos o de crecimiento para productos. La velocidad de reacción depende de algunas variables como la temperatura, la composición de los componentes de la reacción, y de la presión, aunque la última va de la mano de la temperatura (Levenspiel, 1990). Se la puede representar como sigue

$$R_A = kC_A^\alpha C_B^\beta$$

En este caso el orden de reacción con respecto a A es α y con respecto a B es β . El orden global de la reacción es la suma de las dos. Y k es la constante de velocidad.

Existen varias técnicas para determinar la concentración de ácido ascórbico dentro de una muestra. Uno de ellos es el uso de la cromatografía líquida de alto rendimiento

(HPLC, por sus siglas en inglés). Este método tiene la ventaja de ser rápido, sencillo y selectivo en cuanto a la determinación de vitaminas. Su beneficio es el uso de pequeñas cantidades de muestra para que sean detectadas en este instrumento. Esto reduce los costos de muestra, así como los costos de preparación de muestra (Papadoyannis, Tsioni, & Samanidou, 2006).

En este estudio, se va a analizar el impacto que tiene el almacenamiento de la vitamina C sobre la fecha de expiración. Se estima que los medicamentos almacenados en un ambiente inadecuado tengan una cinética de degradación mayor a la de los almacenados adecuadamente. Es decir, su principio activo va a perder efectividad más rápido que el de los almacenados en un lugar fresco y oscuro (Blakley, 2004).

DESARROLLO DEL TEMA

Parte experimental

Métodos y materiales.

Químicos y reactivos.

Fase Móvil: metanol marca Fisher Scientific (grado HPLC, Lote: 6804), ácido sulfúrico marca H.V.O. y agua ultra pura. Estándares: ácido ascórbico y agua ultra pura. Matriz absorción atómica: ácido nítrico p.a. marca H.V.O. 67%, solución madre Zinc marca Inorganic Ventures (1000 µg/mL, Lote: A2-ZN02036) y solución madre de Magnesio marca Buck Scientific (1000 µg/mL, Lote: 9911V).

Muestras.

Vitamina C: gotas (200 mg/mL, Lote: RJ0579) marca Redoxon (Brasil); efervescente (1000 mg, Lote: 5B6350) marca MK (Colombia); tabletas (500 mg, Lote: 14237J) marca Mason (Estados Unidos).

Equipo HPLC y condiciones.

Se ha utilizado el sistema HPLC Buck Scientific BLC-10/11 serie isocrática equipado con: detector UV ($\lambda = 254 \text{ nm}$); una bomba para análisis de rutina (flujo: 1 mL/min); válvula de purga PEEK 0.0625" de diámetro, válvula de inyección manual con lazo de muestra PEEK de 20 µL (Buck Scientific). El equipo se ha utilizado en conjunto con el software *PeekSimple* (Versión 4.26, 6 channels).

Se ha utilizado una columna Pinnacle II C18 (Restek, Estados Unidos, 5µm, 150mm x 4.6mm) en conjunto al sistema HPLC.

Equipo absorción atómica y condiciones.

Se ha utilizado el espectrofotómetro de absorción atómica Buck Scientific 210 VGP equipado con: monocromador Ebert mount (0.25m); gradilla (32 nm x 27 nm, 600 surcos/nm) corrección de fondo: lámpara de arco de deuterio. El equipo se utilizó en conjunto con lámparas de cátodo hueco de Zinc y Magnesio.

Preparación de Soluciones.

Fase Móvil.

La fase móvil ha consistido en una mezcla metanol:agua (5:95, v/v) adicionando 6 gotas de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 6M. La fase móvil se ha filtrado mediante filtros hidrofílicos PVDF 0.45 μ m (Millipore, Millex-HV) y desgasificada por 20 minutos en ultrasonido (Bransonic modelo 5510R-DTH) (Shafqat & et. al, 2012), previo a su inyección en el HPLC.

Estándares.

Se ha pesado 50 mg de AA y se los ha diluido en 50 mL de agua ultra pura para obtener una solución madre (1 mg/mL). Adicionalmente, se ha diluido la solución madre en agua ultra pura para obtener estándares de 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25 y 0.30 mg/mL. Todos los estándares se han preparado el día de la medición, y almacenado en un lugar fresco y oscuro.

Muestras.

Todas las soluciones, estándares y muestras, se han filtrado a través de filtros hidrofílicos PVDF 0.45 μ m (Millipore, Millex-HV) y se han desgasificado por 5 minutos en limpiador ultrasónico (Modelo 5510R-DTH, Branson, Estados Unidos).

Líquido.

Se ha diluido 100 μL de vitamina C líquida (Redoxon) en 100 mL de agua ultra pura. Se ha filtrado 10 mL de la solución antes de su inyección en HPLC.

Efervescente.

Se ha pulverizado la pastilla efervescente de 1000 mg (MK), se ha pesado 300 mg de vitamina C y se ha diluido en 100 mL de agua ultra pura. Se ha utilizado ultra sonido por 10 minutos para disolver todas las partículas. Adicionalmente, se ha realizado una dilución 1:10 (AA:agua).

Tabletas.

Se ha pulverizado la tableta de 500 mg (Mason), se ha pesado 200 mg y se ha diluido en 100 mL de agua ultra pura. Se ha utilizado ultra sonido por 10 minutos para disolver todas las partículas. Se ha realizado una dilución 1:10 (AA:agua).

Estándares absorción atómica.

Se ha realizado una solución de ácido nítrico HNO_3 al 5% como matriz. Se ha realizado una dilución de una solución madre de Zinc de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para obtener una solución de 2.5 ppm. Se ha realizado estándares para Zinc de 0.01, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.5 ppm.

Se ha realizado una solución de 2 ppm de magnesio a partir de una solución madre de Magnesio de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se ha realizado estándares de Magnesio de 0.015, 0.5, 1.0 y 1.5 ppm.

Preparación de muestras para absorción atómica.

Efervescente.

Se ha pesado una pastilla efervescente y se ha diluido el 10% en 100 mL de matriz de HNO₃ al 5%. Se ha utilizado ultrasonido para facilitar el proceso de disolución.

Líquida.

Se ha diluido 1 mL de vitamina C líquida en 100 mL de matriz de HNO₃ al 5%.

Tabletas.

Se ha pesado una tableta y se ha diluido el 10% en 100 mL de matriz de HNO₃ al 5%. Se ha utilizado ultrasonido para facilitar el proceso de disolución.

Curva de calibración.

Se ha corrido cada estándar por triplicado durante 8 minutos en HPLC. Se ha obtenido una curva de calibración reproducible (Intra día) y repetible (Inter día). La curva se ha realizado al inicio y al final de la investigación. El cromatograma característico de los estándares se muestra en Anexo A.

Análisis de muestras.

Los suplementos de vitamina C (líquido, efervescente y tabletas) se han almacenado de la siguiente forma: un paquete en ambiente oscuro y fresco, un paquete en ambiente expuesto al sol, 8 paquetes de control en ambiente oscuro y fresco (para líquido y efervescente); para las tabletas el paquete de control se ha purgado con nitrógeno y almacenado en ambiente oscuro y fresco.

Los paquetes almacenados en ambiente oscuro y expuesto al sol han sido analizados durante 6 meses en 9 corridas en HPLC. Cada muestra se ha analizado por triplicado.

En 8 de las 9 corridas, los paquetes de control son abiertos y analizados por triplicado únicamente en el día respectivo. Después de eso no se los vuelve a analizar. Estos paquetes nos permiten comparar la concentración inicial del lote con la de los paquetes abiertos. Los cromatogramas característicos de las muestras se muestran en Anexo A.

Presencia de metales.

Se ha utilizado absorción atómica para determinar la presencia de Zinc y Magnesio dentro de las muestras. Se ha utilizado una llama aire-acetileno para medir los dos metales con apertura de rendija de 0.7 nm. La longitud de onda que se ha utilizado para Zinc y Magnesio es 213.9 y 285.2 nm, respectivamente. Se ha realizado la curva de calibración de Zn y Mg. Se ha medido la absorbancia de las muestras para cada metal.

Resultados y discusión

Curva de calibración.

Los valores obtenidos para la reproducibilidad y repetitividad de las dos curvas de calibración de ácido ascórbico que se ha realizado se muestran en la Tabla 2 y la **Tabla 3**.

Tabla 2: Resultados concentración de ácido ascórbico (AA) y área de estándares para la curva de calibración 1

Concentración AA [mg/mL]	Día 1	Día 2	Día 3	Inter Día	Desviación Estándar	% RSD
	Intra día	Intra día	Intra día			
0.05	28.853	29.174	29.860	29.296	0.514	1.755
0.1	65.929	62.034	65.016	64.326	2.037	3.167
0.15	91.306	89.827	96.370	92.501	3.432	3.710
0.2	116.735	117.190	113.183	115.703	2.194	1.896
0.25	145.856	145.581	150.208	147.215	2.596	1.763
0.3	183.760	167.990	174.093	175.281	7.952	4.537

Tabla 3: Resultados concentración de ácido ascórbico (AA) y área, de estándares para la curva de calibración 2

Concentración AA [mg/mL]	Día 1	Día 2	Día 3	Inter Día	Desviación Estándar	% RSD
	Intra día	Intra día	Intra día			
0.05	31.027	28.803	29.052	29.627	1.219	4.113
0.1	65.501	65.338	66.578	65.806	0.674	1.024
0.15	90.926	90.404	90.998	90.776	0.324	0.357
0.2	117.957	118.911	120.163	119.011	1.106	0.929
0.25	146.389	144.511	144.832	145.244	1.004	0.692
0.3	182.982	184.012	181.183	182.726	1.431	0.783

Se ha graficado las dos curvas de calibración para el ácido ascórbico a partir de la Tabla 2 y la

Tabla 3. Las curvas se muestran en la Figura 1.

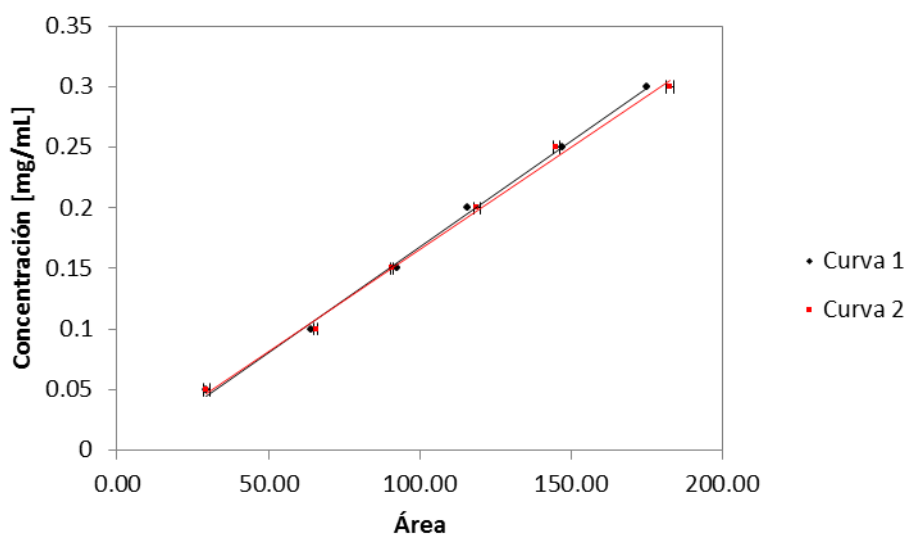


Figura 1: Curva de calibración de ácido ascórbico obtenida para días diferentes (prueba de repetitividad).

Se ha realizado una regresión lineal con Microsoft Excel para cada grupo de datos. Las ecuaciones de la recta y el valor del coeficiente de correlación al cuadrado correspondientes se muestran a continuación.

Curva 1:

$$C_{AA} = 0.0017A - 0.0063$$

$$R^2 = 0.9975$$

Curva 2:

$$C_{AA} = 0.0017A - 0.0033$$

$$R^2 = 0.9961$$

Se ha seleccionado la curva 1 (Figura 2) como referencia para calcular la concentración de ácido ascórbico en relación a su área, debido a que su coeficiente de correlación es más cercano a 1.

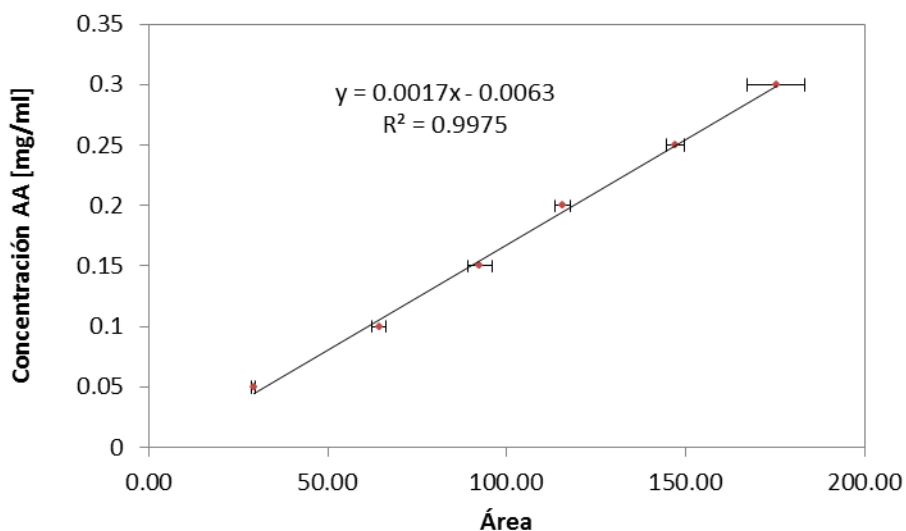


Figura 2: Curva de Calibración de Ácido Ascórbico

La curva de calibración de ácido ascórbico muestra linealidad, lo cual es de suma importancia para que cumpla con la Ley de Beer. Se puede apreciar que el instrumento HPLC es estable puesto que los resultados son reproducibles y repetibles en días diferentes. Esto

corroborar que no se debe realizar una curva de calibración para cada día que se analice las muestras. El R^2 obtenido en la curva de calibración fue de 0.9975, implicando que los datos tienen un buen ajuste entre ellos.

Los valores de la Desviación Estándar Relativa (RSD, por sus siglas en inglés) muestran que el método utilizado para el análisis de AA en HPLC tiene buena precisión debido a que los datos se encuentran dentro del 5%.

Por otro lado, se puede ver que los resultados obtenidos en HPLC no tienen interferencias, puesto que no se encontró picos para otros excipientes que se pueden encontrar en los suplementos vitamínicos. Esto indica que el método es selectivo para AA.

Muestras.

La cinética de degradación del AA para todos los diferentes suplementos vitamínicos se ha obtenido mediante el siguiente procedimiento. En primer lugar, se ha obtenido la cinética de degradación mediante el método integral para determinar si el ajuste de datos está relacionado con las reacciones elementales de orden 0, 1 o 2. Mediante este método se ha integrado las ecuaciones cinéticas particulares de cada orden elemental con respecto al tiempo y a la concentración del ácido ascórbico. Las expresiones obtenidas después de integrar se muestran a continuación (Levenspiel, 1990). Las integraciones se encuentran en Anexo B

Orden 0.

$$C_{AA} = kt$$

Para este orden de reacción, se ha graficado la concentración de ácido ascórbico (C_{AA}) en mg/mL versus el tiempo en días.

Orden 1.

$$\ln AA = \ln AA_0 - kt$$

Para este orden de reacción, se ha graficado el logaritmo natural de la concentración de ácido ascórbico (C_{AA}) versus el tiempo en días.

Orden 2.

$$\frac{1}{C_{AA}} = \frac{1}{C_{AA_0}} - kt$$

Para este orden de reacción, se ha graficado el inverso de la concentración de ácido ascórbico (C_{AA}) versus el tiempo en días.

Una vez que se ha realizado las respectivas gráficas, se espera escoger la que tenga el mejor ajuste basado en el coeficiente de correlación. Los gráficos para las diferentes presentaciones de suplementos vitamínicos se muestran a continuación.

Efervescente.

Los datos de la concentración de AA determinada en función del tiempo que se han utilizado para las diferentes gráficas se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4: Concentración de ácido ascórbico (mg/mL) en función del tiempo (días) en distintos tipos de almacenamiento para las muestras efervescentes.

t [días]	0	1	4	7	12	30	56	104	137	152
Sol	0.1099	0.1096	0.1093	0.1070	0.1036	0.1019	0.0965	0.0930	0.0836	0.0831
Oscuro	0.1108	0.1104	0.1104	0.1101	0.1078	0.1059	0.1025	0.1012	0.1010	0.0904
Control	0.1102	0.1095	0.1235	0.1108	0.1074	0.1102	0.1031	0.1075	0.1107	0.1116

Las gráficas obtenidas respectivamente para cada orden elemental de la reacción para las pastillas efervescentes se muestran de la Figura 3 a la Figura 8.

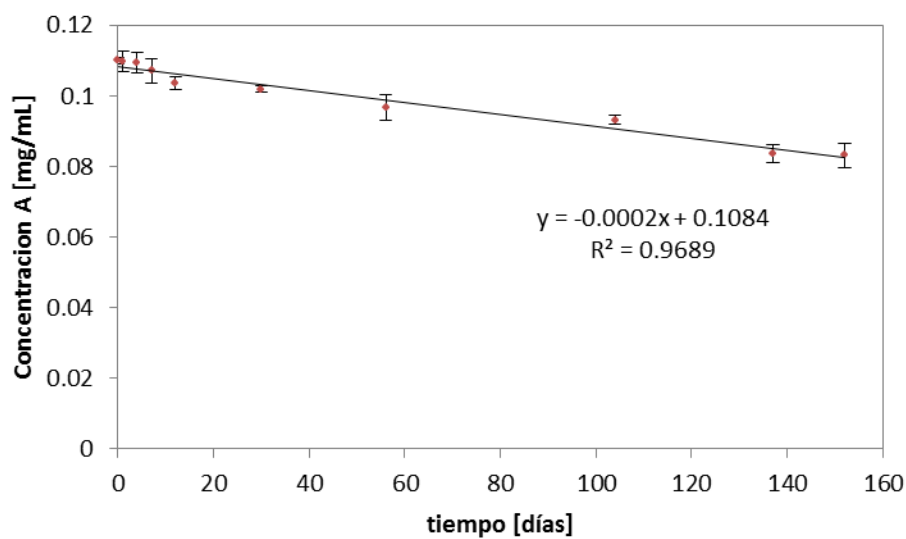
Muestras almacenadas al sol.

Figura 3: Concentración de AA versus tiempo para reacción elemental de orden 0 para pastillas efervescentes almacenadas al sol.

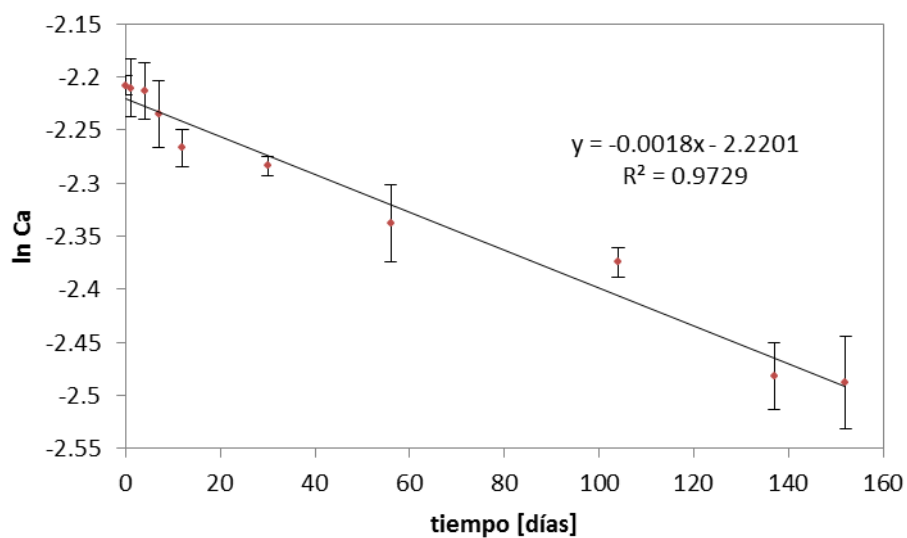


Figura 4: Logaritmo natural de concentración de AA versus tiempo para reacción elemental de orden 1 para pastillas efervescentes almacenadas al sol.

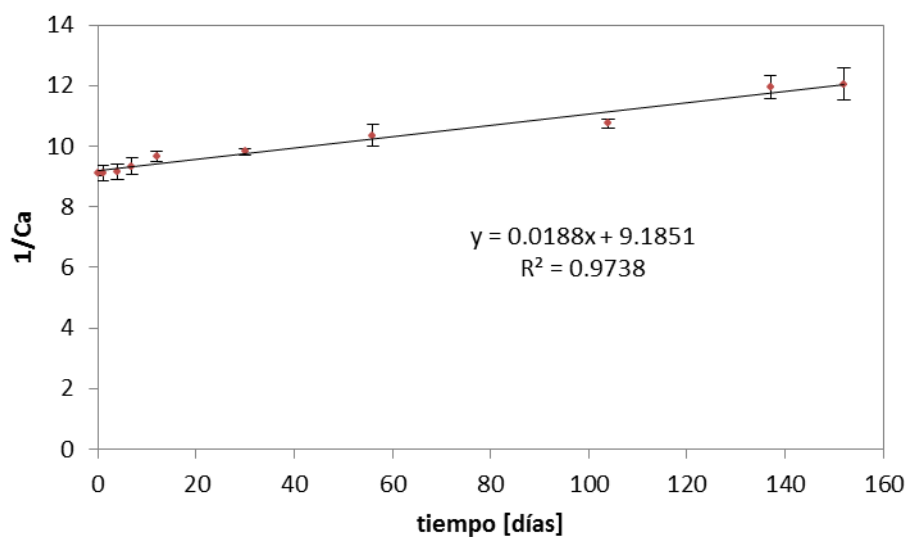


Figura 5: Inversa de la concentración de AA versus tiempo para reacción elemental de orden 2 para pastillas efervescentes almacenadas al sol.

Se ha visto que el orden de reacción para las pastillas efervescentes almacenadas al sol que se ajusta mejor a los datos es la de segundo orden.

Muestras almacenadas en ambiente fresco y oscuro.

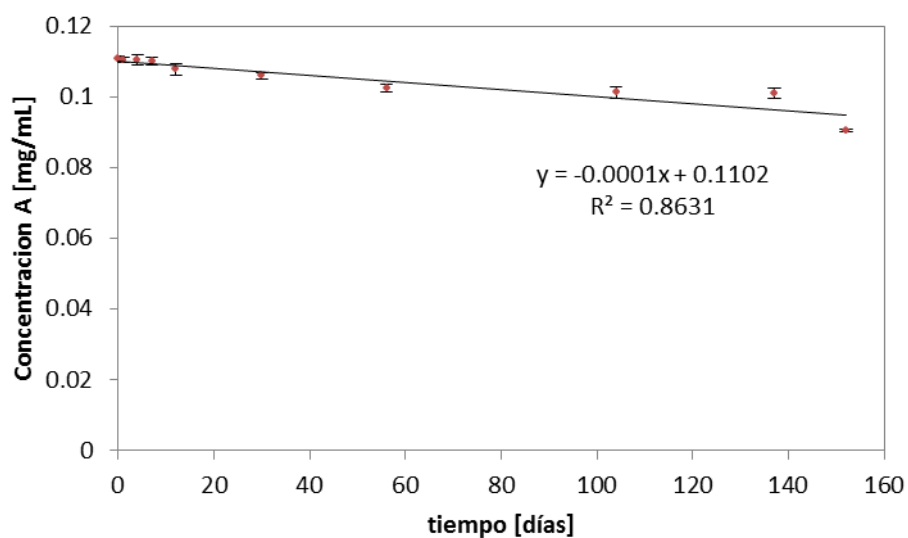


Figura 6: Concentración de AA versus tiempo para reacción elemental de orden 0 para pastillas efervescentes almacenadas en ambiente fresco y oscuro.

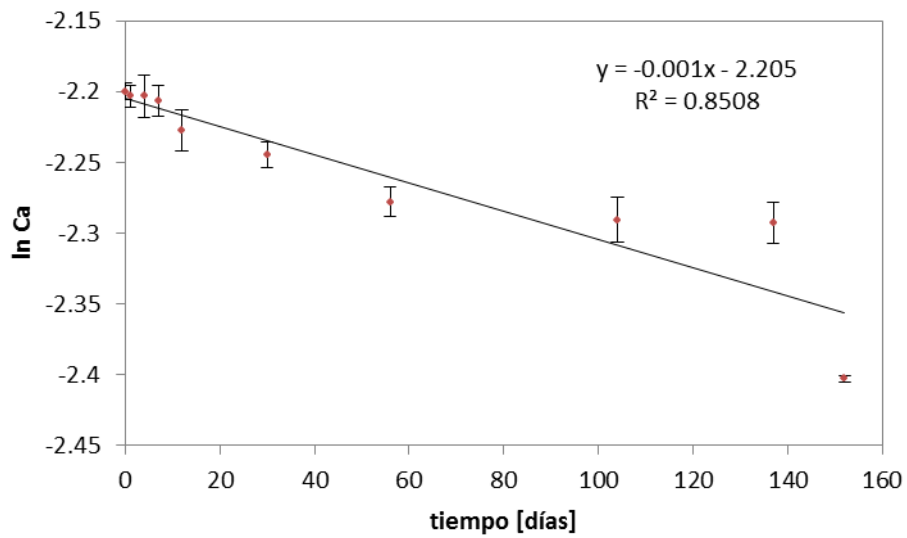


Figura 7: Logaritmo natural de concentración de AA versus tiempo para reacción elemental de orden 1 para pastillas efervescentes almacenadas en ambiente fresco y oscuro.

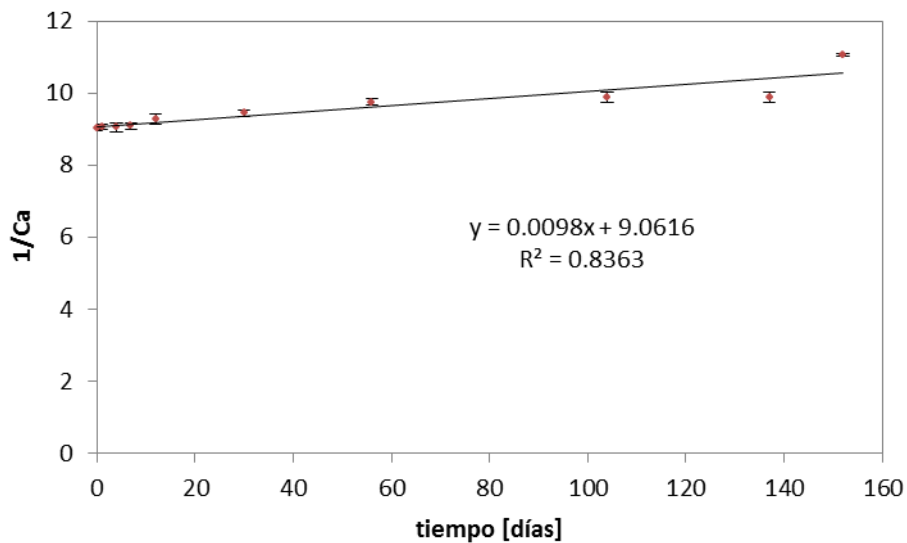


Figura 8: Inversa de la concentración de AA versus tiempo para reacción elemental de orden 2 para pastillas efervescentes almacenadas en ambiente fresco y oscuro.

El mejor ajuste para las pastillas efervescentes almacenadas en un lugar fresco y oscuro es la reacción de orden 0.

Líquido.

En la Tabla 5 se muestran los datos utilizados para realizar las gráficas de concentración versus tiempo para las reacciones elementales.

Tabla 5: Concentración de ácido ascórbico (mg/mL) en función del tiempo (días) en distintos tipos de almacenamiento para las muestras líquidas.

t [días]	0	1	4	7	12	30	56	104	137	152
Sol	0.2410	0.2407	0.2398	0.2384	0.2389	0.2291	0.2253	0.2117	0.1744	0.1539
Oscuro	0.2437	0.2423	0.2411	0.2407	0.2419	0.2372	0.2359	0.2278	0.2014	0.1969
Control	0.2414	0.2437	0.2356	0.2435	0.2374	0.2391	0.2380	0.2401	0.2392	0.2406

Las gráficas obtenidas para la presentación en gotas se muestran desde la Figura 9 hasta la Figura 14.

Muestras almacenadas al sol.

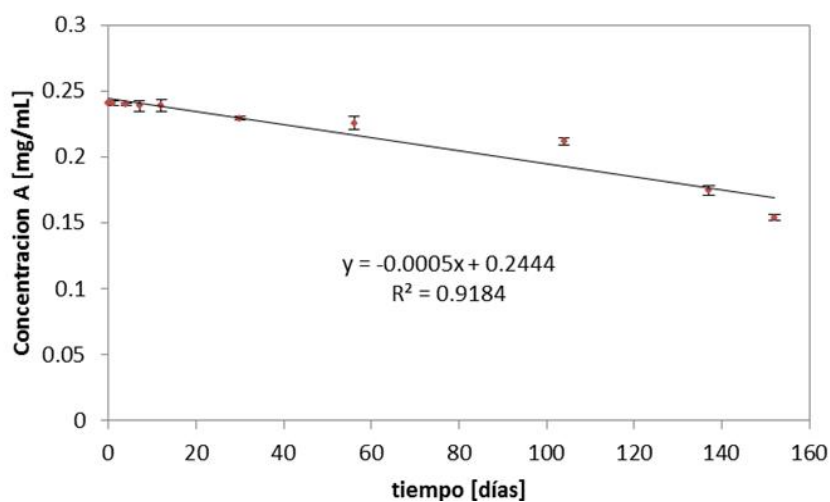


Figura 9: Concentración de AA versus tiempo para reacción elemental de orden 0 para presentación líquida almacenadas al sol.

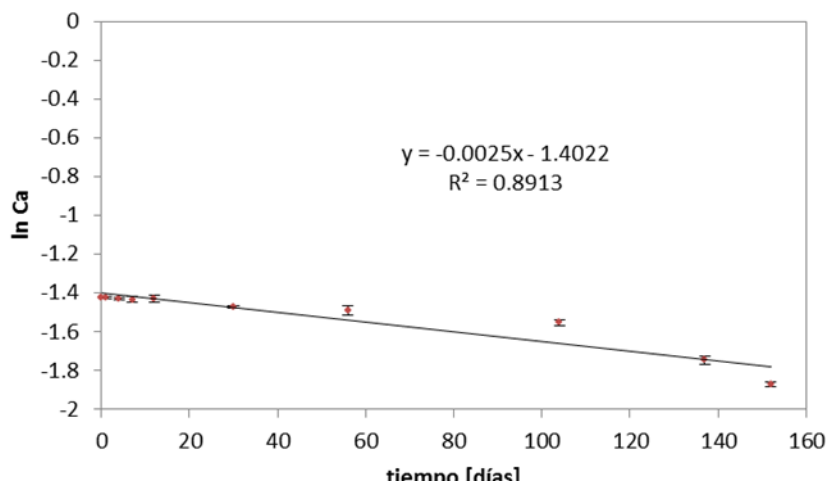


Figura 10: Logaritmo natural de concentración de AA versus tiempo para reacción elemental de orden 1 para presentación líquida almacenadas al sol.

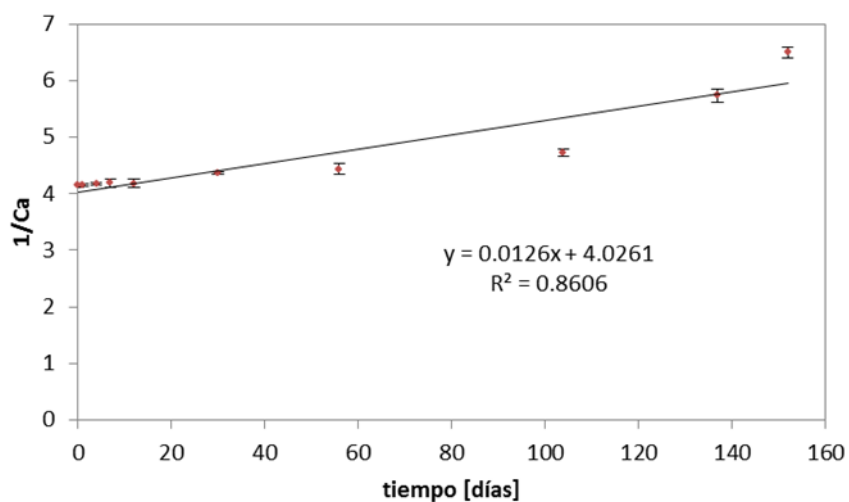


Figura 11: Inversa de la concentración de AA versus tiempo para reacción elemental de orden 2 para presentación líquida almacenadas al sol.

La reacción de orden 0 nos ha dado el mejor ajuste para la vitamina C en presentación líquida cuando es almacenada al sol.

Muestras almacenadas en ambiente fresco y oscuro.

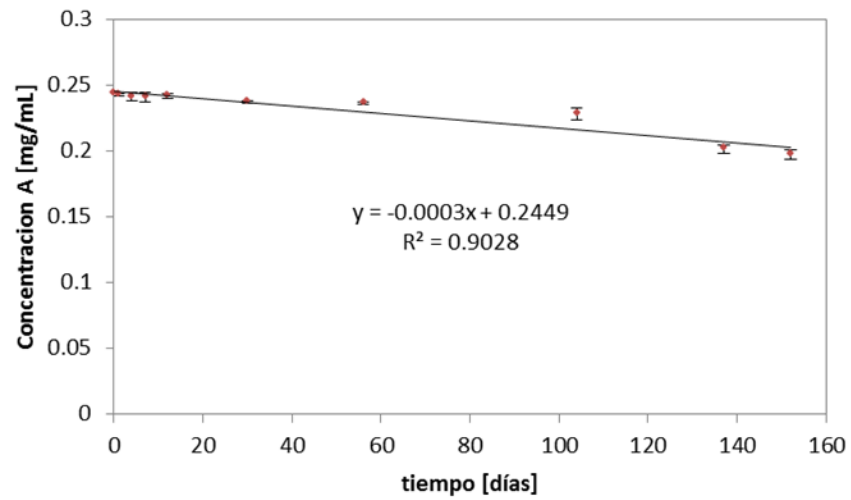


Figura 12: Concentración de AA versus tiempo para reacción elemental de orden 0 para presentación líquida almacenadas en ambiente fresco y oscuro.

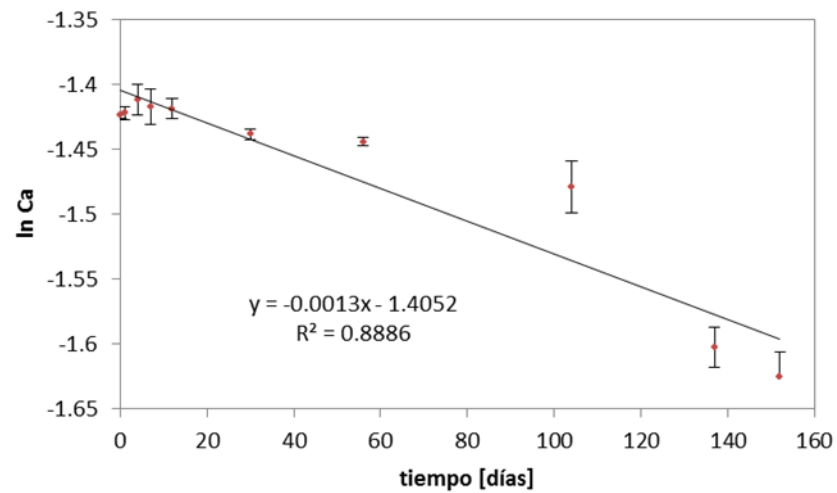


Figura 13: Logaritmo natural de concentración de AA versus tiempo para reacción elemental de orden 1 para presentación líquida almacenadas en ambiente fresco y oscuro.

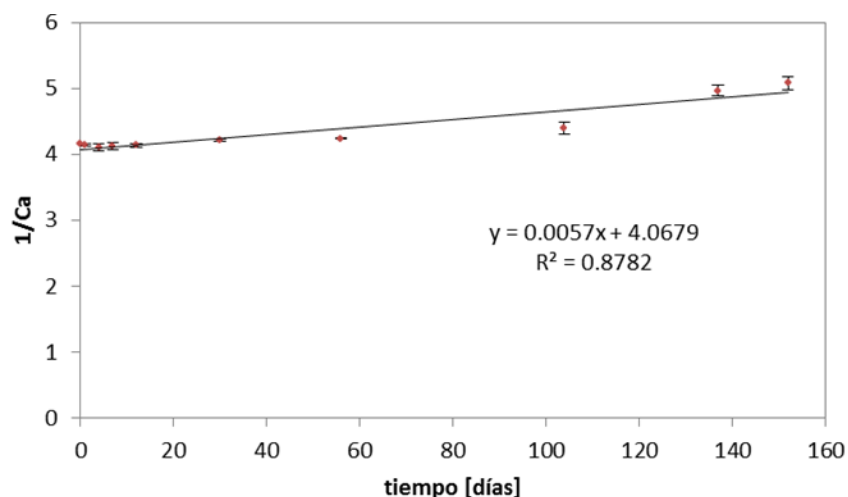


Figura 14: Inversa de la concentración de AA versus tiempo para reacción elemental de orden 2 para presentación líquida almacenadas en ambiente fresco y oscuro.

Se puede ver que en este caso el mejor ajuste es para la reacción de orden 0 para la vitamina C en líquido almacenadas en un lugar oscuro y fresco.

Tabletas.

Los datos de concentración que se han utilizado para los gráficos de reacciones elementales se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6: Concentración de ácido ascórbico (mg/mL) en función del tiempo (días) en distintos tipos de almacenamiento para las muestras en tabletas.

T [días]	0	1	4	7	12	30	56	104	137	152
Sol	0.2166	0.2154	0.2155	0.2181	0.2053	0.2024	0.2013	0.2003	0.1748	0.1721
Oscuro	0.222	0.2216	0.2186	0.2175	0.2222	0.2202	0.2179	0.2134	0.1774	0.1725
Control	0.2267	0.2255	0.2183	0.2209	0.2235	0.2235	0.2288	0.2218	0.2064	0.2305

Las gráficas obtenidas para las tabletas se muestran desde la Figura 15 hasta la Figura 20.

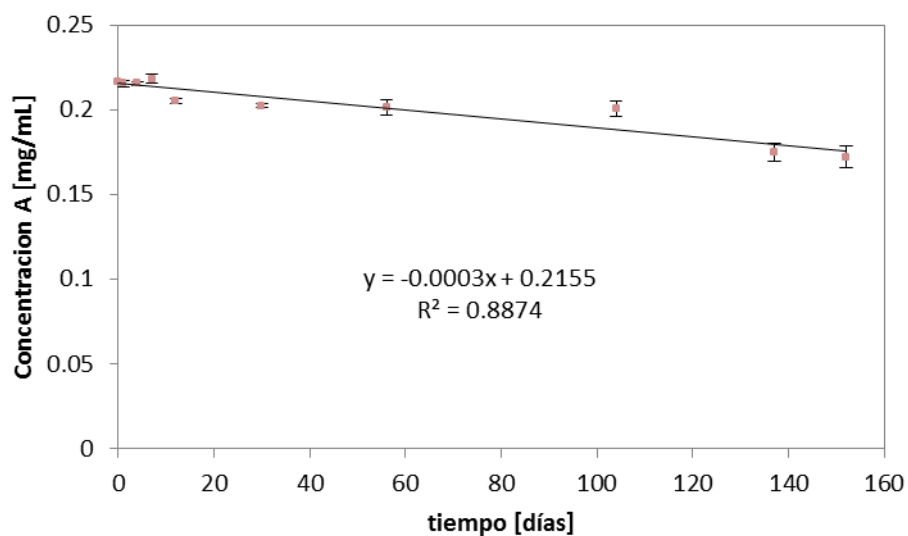
Muestras almacenadas al sol.

Figura 15: Concentración de AA versus tiempo para reacción elemental de orden 0 para tabletas almacenadas al sol.

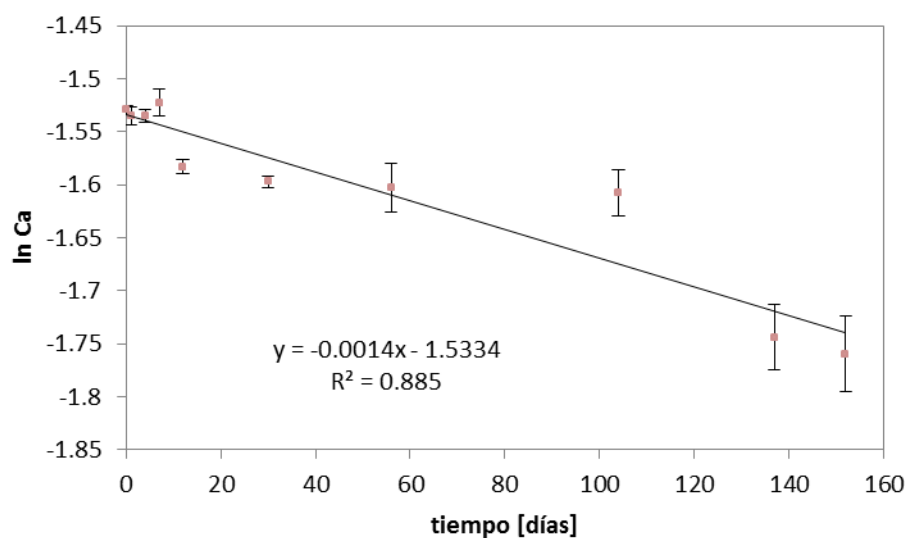


Figura 16: Logaritmo natural de concentración de AA versus tiempo para reacción elemental de orden 1 para tabletas almacenadas al sol.

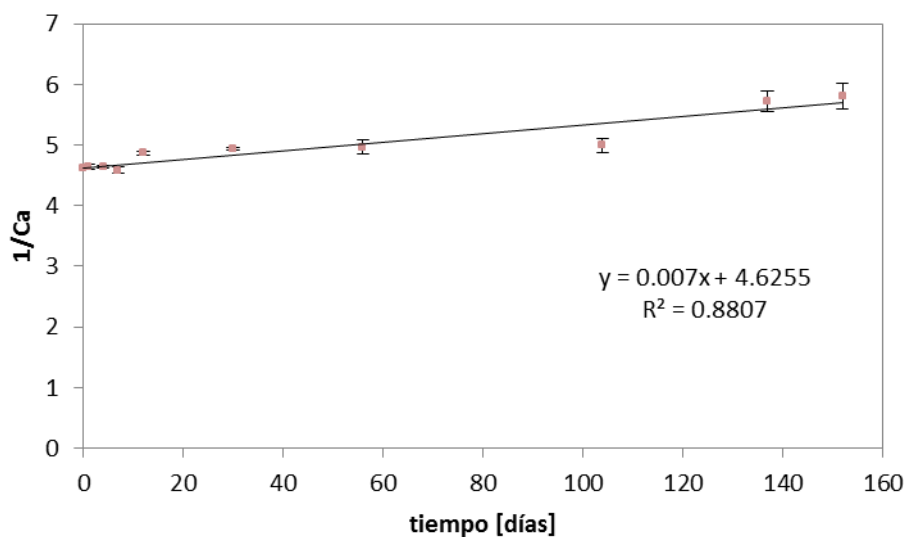


Figura 17: Inversa de la concentración de AA versus tiempo para reacción elemental de orden 2 para tabletas almacenadas al sol.

Para las tabletas efervescentes almacenadas al sol la cinética de degradación que mejor se ajusta es la de orden 0.

Muestras almacenadas en ambiente fresco y oscuro.

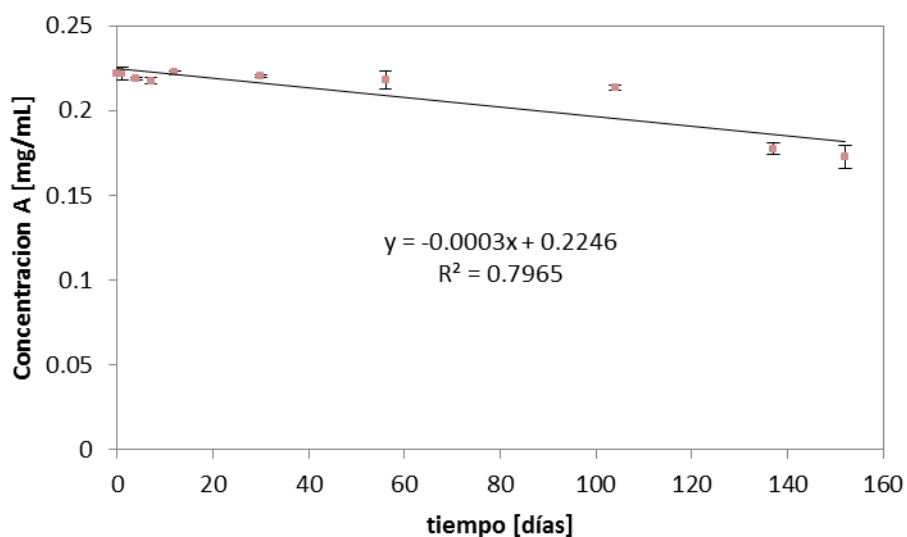


Figura 18: Concentración de AA versus tiempo para reacción elemental de orden 0 para tabletas almacenadas en ambiente fresco y oscuro.

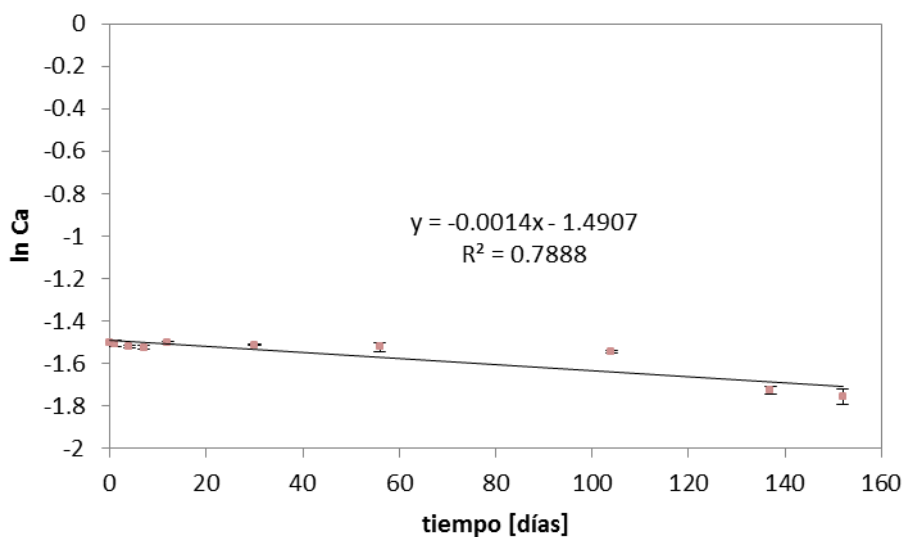


Figura 19: Logaritmo natural de concentración de AA versus tiempo para reacción elemental de orden 1 para tabletas almacenadas en ambiente fresco y oscuro.

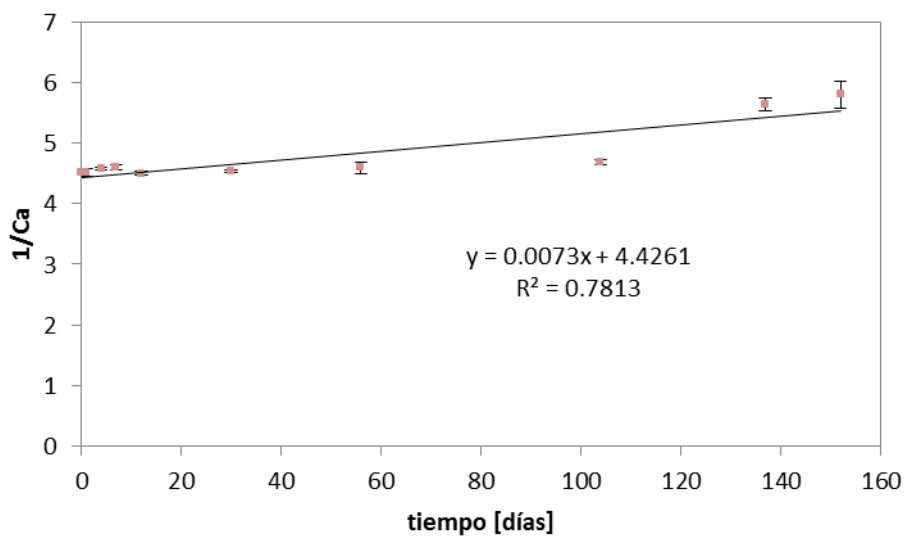


Figura 20: Inversa de la concentración de AA versus tiempo para reacción elemental de orden 2 para tabletas almacenadas en ambiente fresco y oscuro.

Se puede ver que para las tabletas almacenadas en un lugar fresco y oscuro la reacción de orden 0 es la que mejor ajuste da.

Se puede ver que para todos los casos de las muestras, el ajuste a las cinéticas de las reacciones elementales mediante el método integral es bastante bueno para todos los casos. Adicionalmente, debido a que en ninguno de los resultados para determinar si la cinética de degradación es elemental entra en un rango de 1% de error se ha realizado la obtención de la cinética de degradación mediante el método diferencial. Se ha analizado de manera matemática la relación entre la concentración y el tiempo. Se conoce que la cinética de reacción es de la forma

$$-r_A = \frac{dC_A}{dt}$$

Se ha graficado la concentración de AA versus el tiempo y se ha ajustado los datos al polinomio que ha dado el mejor coeficiente de correlación cuadrático, i.e. el más cercano a la unidad. Posteriormente se ha derivado la concentración con respecto al tiempo del polinomio con el mejor ajuste para obtener la expresión de la cinética de degradación. Esta expresión representa la cinética de degradación experimental y se la ha comparado con la cinética de degradación teórica $-r_A = kC_A^n$. Los valores de la constante de velocidad k y el orden de reacción n se han obtenido a través de la función *Solver* incluido en *Microsoft Excel*. Mediante esta función se ha minimizado el valor del error absoluto al variar los valores de k y n . El error absoluto está dado por

$$e_{abs} = \frac{(r_{calc} - r_{exp})^2}{r_{exp}}$$

Los resultados para cada presentación de vitamina C se muestran a continuación. Las tablas de la velocidad de reacción experimental y teórica, así como el error absoluto se encuentran en Anexo C.

Efervescente.

Se ha utilizado los resultados de la concentración de AA de la Tabla 4 para obtener la gráfica con el polinomio de mejor ajuste. Las gráficas se muestran en las Figura 21 y Figura 22.

Muestras almacenadas al sol.

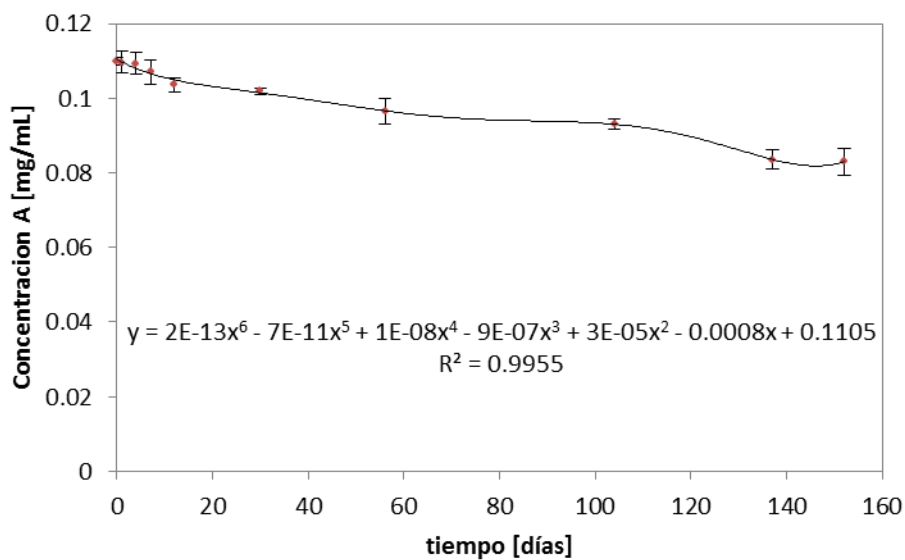


Figura 21: Polinomio ajustado a la concentración de AA versus tiempo para pastillas efervescentes almacenadas al sol.

Se ha derivado el polinomio obtenido en la Figura 21 y se ha obtenido la siguiente expresión para la cinética de degradación

$$-r_A = 1.2 \times 10^{-12} t^5 - 3.5 \times 10^{-10} t^4 + 4.08 \times 10^{-8} t^3 - 2.7 \times 10^{-6} t^2 + 6 \times 10^{-5} t - 0.0008$$

La expresión de la cinética de degradación obtenida es

$$-r_A = 1.601 \times 10^{-3} C_{AA}^{0.399} \left[\frac{mg}{mL * día} \right]$$

Muestras almacenadas en ambiente fresco y oscuro.

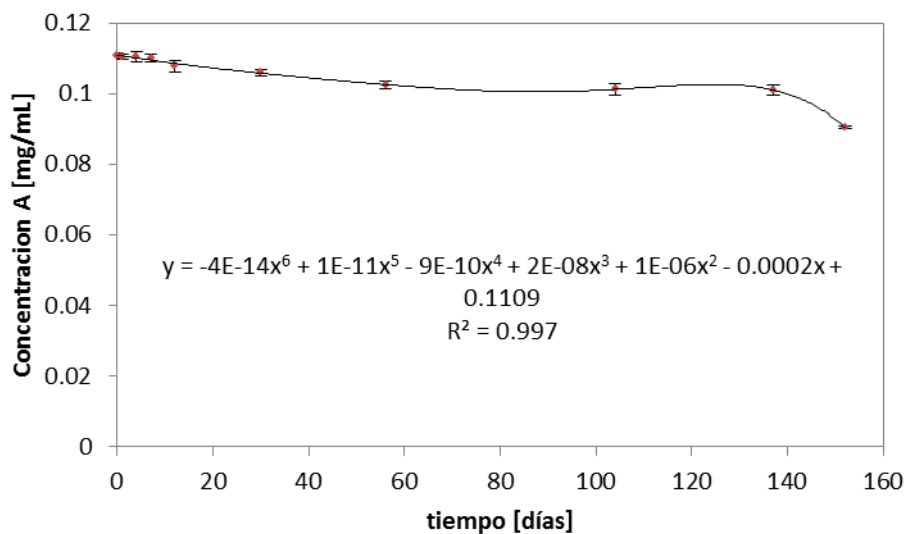


Figura 22: Polinomio ajustado a la concentración de AA versus tiempo para pastillas efervescentes almacenadas en lugar fresco y oscuro.

Se ha derivado el polinomio obtenido en la Figura 21 y se ha obtenido la siguiente expresión para la cinética de degradación

$$-r_A = -2.4 \times 10^{-13} t^5 + 5 \times 10^{-11} t^4 - 3.6 \times 10^{-9} t^3 + 6 \times 10^{-8} t^2 - 0.0002$$

La expresión de la cinética de degradación obtenida es

$$-r_A = 7.39 \times 10^{-6} C_{AA}^{-1.482} \left[\frac{mg}{mL * día} \right]$$

Líquido.

Los resultados de la Tabla 5 se han utilizado para calcular la cinética de degradación de la vitamina C en presentación líquida. Las gráficas se muestran en las Figura 23: Polinomio ajustado a la concentración de AA versus tiempo para presentación líquida almacenada al sol. y Figura 24.

Muestras almacenadas al sol.

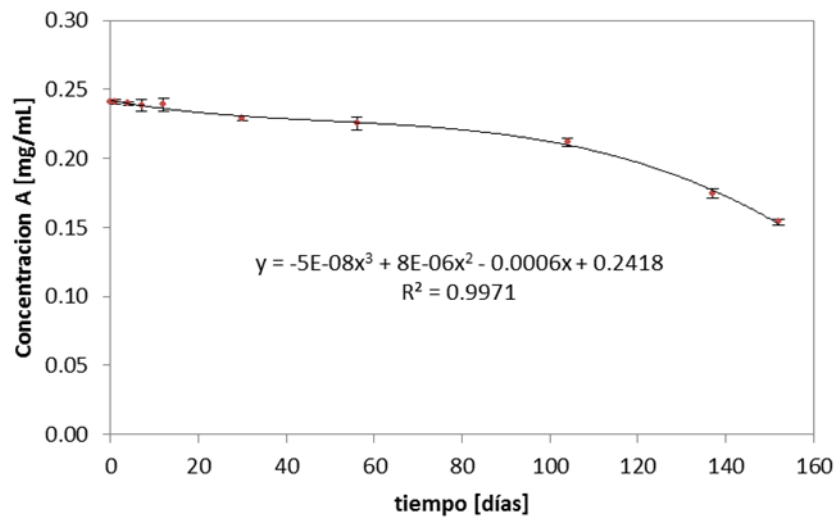


Figura 23: Polinomio ajustado a la concentración de AA versus tiempo para presentación líquida almacenada al sol.

La derivada del polinomio de la Figura 23 obtenida es

$$-r_A = -1.5 \times 10^{-7} t^2 + 1.6 \times 10^{-5} t - 0.0006$$

La expresión de la cinética de degradación obtenida es

$$-r_A = 1.83 \times 10^{-6} C_{AA}^{-3.636} \left[\frac{mg}{mL * día} \right]$$

Muestras almacenadas en ambiente fresco y oscuro.

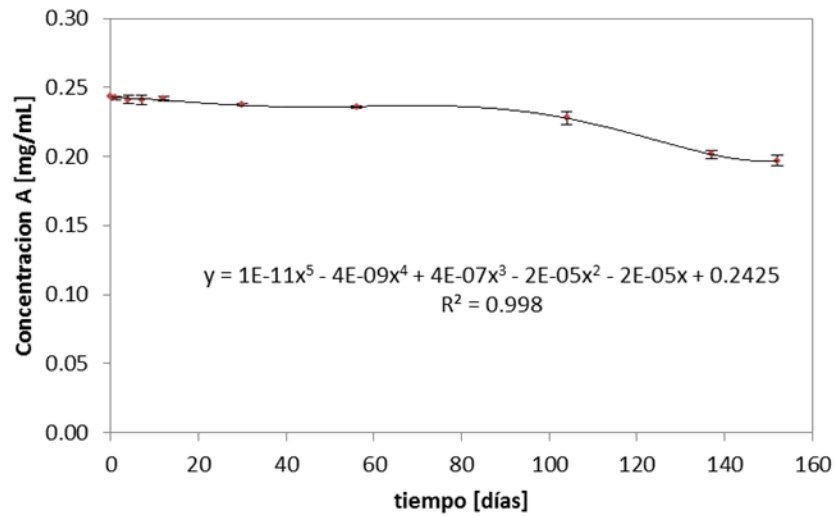


Figura 24: Polinomio ajustado a la concentración de AA versus tiempo para presentación líquida almacenada en lugar fresco y oscuro.

La derivada obtenida del polinomio ajustado de la Figura 24 es

$$-r_A = 5 \times 10^{-11} t^4 - 1.6 \times 10^{-8} t^3 + 1.2 \times 10^{-6} t^2 - 4 \times 10^{-5} t - 2 \times 10^{-5}$$

La expresión de la cinética de degradación obtenida es

$$-r_A = 1.38 \times 10^{-8} C_{AA}^{-6.578} \left[\frac{mg}{mL * día} \right]$$

Tabletas.

La Tabla 6 se ha utilizado para obtener la cinética de degradación para vitamina C en tabletas. Los resultados de las gráficas se muestran en las Figura 25 y Figura 26. C_{AA}

Muestras almacenadas al sol.

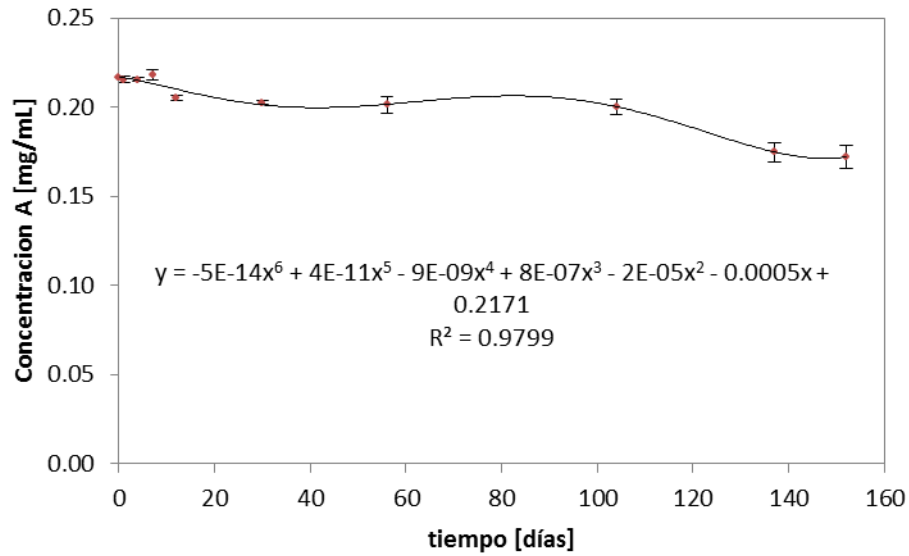


Figura 25: Polinomio ajustado a la concentración de AA versus tiempo para tabletas almacenadas al sol.

Se ha derivado el polinomio obtenido en la Figura 25 y se ha obtenido la siguiente expresión para la cinética de degradación

$$-r_A = -3 \times 10^{-13} t^5 + 2 \times 10^{-10} t^4 - 3.6 \times 10^{-8} t^3 + 2.4 \times 10^{-6} t^2 - 4 \times 10^{-5} t - 0.0005$$

La expresión de la cinética de degradación obtenida es

$$-r_A = 1.999 \times 10^{-1} C_{AA}^{1.929} \left[\frac{mg}{mL * día} \right]$$

Muestras almacenadas en ambiente fresco y oscuro.

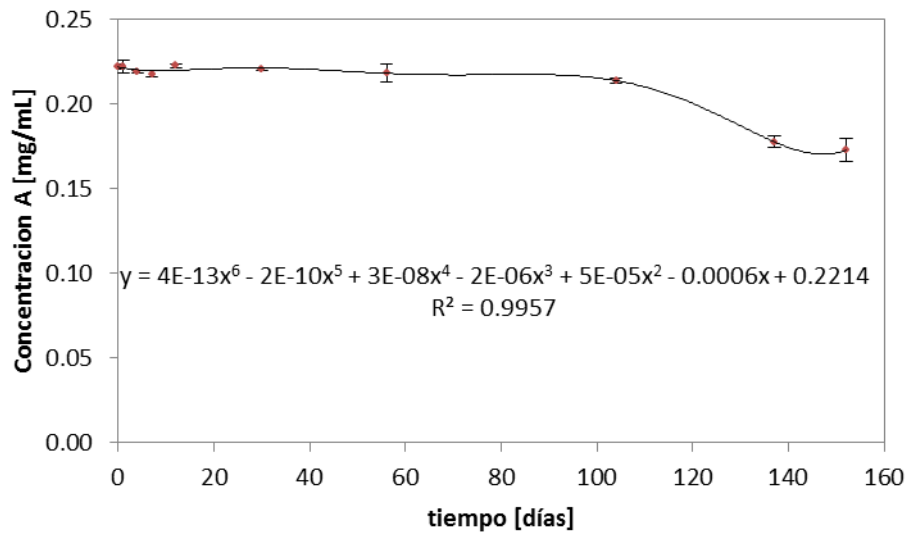


Figura 26: Polinomio ajustado a la concentración de AA versus tiempo para tabletas almacenadas en lugar fresco y oscuro.

La derivada del polinomio de la Figura 26 es

$$-r_A = 2.4 \times 10^{-12} t^5 - 1 \times 10^{-9} t^4 + 1.2 \times 10^{-7} t^3 - 6 \times 10^{-6} t^2 + 1 \times 10^{-4} t - 0.0006$$

La expresión de la cinética de degradación obtenida es

$$-r_A = 3.14 \times 10^{-5} C_{AA}^{-1.437} \left[\frac{mg}{mL * día} \right]$$

En la Tabla 7 se resume los resultados que se han obtenido para la cinética de degradación de la vitamina C en las diferentes presentaciones y almacenamientos.

Tabla 7: Resultados de la cinética de degradación para suplementos vitamínicos almacenados en diferentes ambientes

Muestra	Cinética de degradación [mg/mL*día]	Error absoluto
Efervescente almacenada al sol	$-r_{AA} = 1.601 \times 10^{-3} C_{AA}^{0.399}$	6.96×10^{-3}
Efervescente almacenada en lugar fresco y oscuro	$-r_{AA} = 7.39 \times 10^{-6} C_{AA}^{-1.482}$	5.02×10^{-3}
Líquida almacenada al sol	$-r_{AA} = 1.83 \times 10^{-6} C_{AA}^{-3.636}$	8.22×10^{-4}
Líquida almacenada en lugar fresco y oscuro	$-r_{AA} = 1.38 \times 10^{-8} C_{AA}^{-6.578}$	1.70×10^{-2}
Tableta almacenada al sol	$-r_{AA} = 1.999 \times 10^{-1} C_{AA}^{1.929}$	4.43×10^{-1}
Tableta almacenada en lugar fresco y oscuro	$-r_{AA} = 3.14 \times 10^{-5} C_{AA}^{-1.437}$	1.33×10^{-1}

El método diferencial ofrece un mejor ajuste entre los datos de la concentración de ácido ascórbico y el tiempo que el método integral. Para las muestras que se han almacenado en un ambiente fresco y oscuro y para la muestra líquida almacenada al sol, la cinética de degradación es inversamente proporcional a la concentración (Tabla 7). Es decir, a concentraciones altas la cinética va a ser más lenta y a medida que disminuye la concentración se va a obtener una velocidad más rápida. Estos resultados corroboran los datos obtenidos de concentración para las diferentes muestras (Tabla 4, Tabla 5, Tabla 6) debido a que las concentraciones empiezan a disminuir en los últimos meses de la investigación, lo cual implica que se tiene una degradación lenta al inicio y posteriormente aumenta su velocidad.

Una vez obtenidas las cinéticas de degradación mediante el método diferencial, se ha procedido a predecir la fecha de expiración de cada medicamento en base a las cinéticas obtenidas. La fecha de expiración nos indica que el medicamento posee el 90% de su concentración inicial. Para calcular la fecha de expiración, se utiliza la siguiente expresión

$$t_{90\%} = \frac{0.9^{1-n} - 1}{k * (n - 1)} * C_{AA}^{1-n}$$

Se ha procedido a calcular las fechas de expiración para los medicamentos y los resultados se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8: Fechas de expiración para los diferentes suplementos vitamínicos

Muestra	Concentración Inicial	Fecha de expiración [años]
Efervescente almacenada al sol	1000 [mg]	11.09
Efervescente almacenada en lugar fresco y oscuro	1000 [mg]	9.6E+08
Líquida almacenada al sol	500 [mg]	0.52
Líquida almacenada en lugar fresco y oscuro	500 [mg]	6.97E+10
Tableta almacenada al sol	200 [mg]	5.31E+07
Tableta almacenada en lugar fresco y oscuro	200 [mg]	1.73E+18

Se puede observar en la Tabla 8 que las fechas de expiración sobrepasan la indicada en los medicamentos, las cuales son de dos años, a excepción de las tabletas almacenadas al sol. Debido a que la concentración no se ha degradado tan rápido como se esperaba, se ha

analizado las razones por las cuales esto puede pasar. Adicionalmente, en la Tabla 9 se muestra la razón de degradación entre los medicamentos almacenados en un lugar fresco y oscuro y los almacenados al sol. Es decir, cuanto más se demora en degradarse la vitamina C cuando se la almacena en un lugar fresco y oscuro.

Tabla 9: Razón de degradación para los medicamentos de vitamina C

Muestras	Razón de degradación
Efervescentes almacenadas en lugar oscuro y fresco:almacenadas al sol	$8.65 \times 10^7:1$
Líquido almacenadas en lugar oscuro y fresco:almacenadas al sol	$3.26 \times 10^{10}:1$
Tabletas almacenadas en lugar oscuro y fresco:almacenadas al sol	$1.35 \times 10^{11}:1$

La degradación de la vitamina C en la muestra líquida almacenada al sol no ha sido tan rápida como las presentaciones sólidas. Esto se debe a que el ácido ascórbico en solución no se degrada en presencia de oxígeno. Su degradación está relacionada con la temperatura, pH, luz, concentración y catálisis con metales pesados (Willey, 2007). Para el caso de las muestras efervescentes y en tabletas almacenadas al sol, se obtiene una cinética de degradación directamente proporcional a la concentración como se muestra en la Tabla 7. En estas dos muestras se ha obtenido una degradación más rápida de la vitamina C en el tiempo que se ha realizado la investigación. Las muestras sólidas en condiciones aerobias son afectadas en mayor medida y se produce la oxidación de AA a DHAA (Shephard & et. al, 1999).

La vitamina C en presentación líquida se encuentra dentro de un envase ámbar el cual impide que exista una cantidad significativa de luz que pueda degradar la vitamina C. Sin embargo, se puede observar que la vitamina C almacenada al sol se degrada un poco más rápido que la almacenada en un ambiente oscuro y fresco. Esto tiene sentido puesto que el frasco ámbar permite el traspaso de luz en cantidad mínima.

Por otro lado, a mayor temperatura existe mayor degradación. Esto se debe a la ecuación de Arrhenius que se muestra a continuación

$$k = k_0 e^{-E_a/RT}$$

En los resultados obtenidos se puede observar que las muestras almacenadas al sol tienen una mayor degradación que las muestras almacenadas en un ambiente oscuro y fresco. Esto se debe a que la temperatura de las muestras al sol aumentaba por las mañanas, acelerando la velocidad de degradación.

Presencia de metales.

Puesto que la cantidad de ácido ascórbico presente en los diferentes suplementos vitamínicos disminuye lentamente, se ha analizado la presencia de los metales Zinc (Zn) y Magnesio (Mg). Esto se ha realizado debido a que el ácido ascórbico actúa como un ligando en la presencia de algunos metales, incluyendo Zn y Mg. El ion magnesio se liga a los átomos O-3 y O-1 de los dos aniones ascorbato (Tajmir-Rhia, 1990), mientras que el zinc se liga al anión O-3 y a los grupos O(2)-H (Tajmir-Rhiahi, 1991).

La determinación de metales en los suplementos vitamínicos se ha realizado mediante absorción atómica. Las curvas de calibración del Zinc y Magnesio se muestran en la Figura 27 y Figura 28, respectivamente.

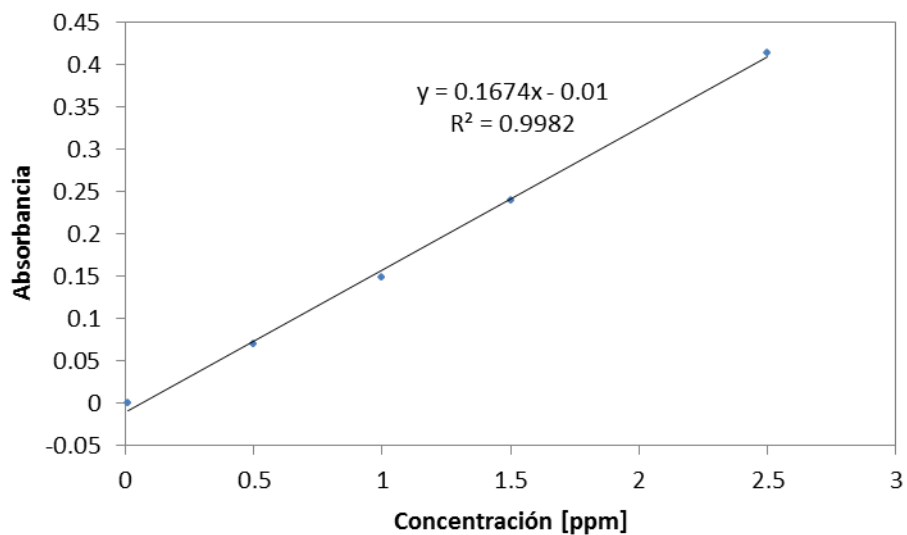


Figura 27: Curva de calibración de Zinc

La ecuación de absorbancia en función de la concentración es

$$A = 0.1674C_{Zn} - 0.01$$

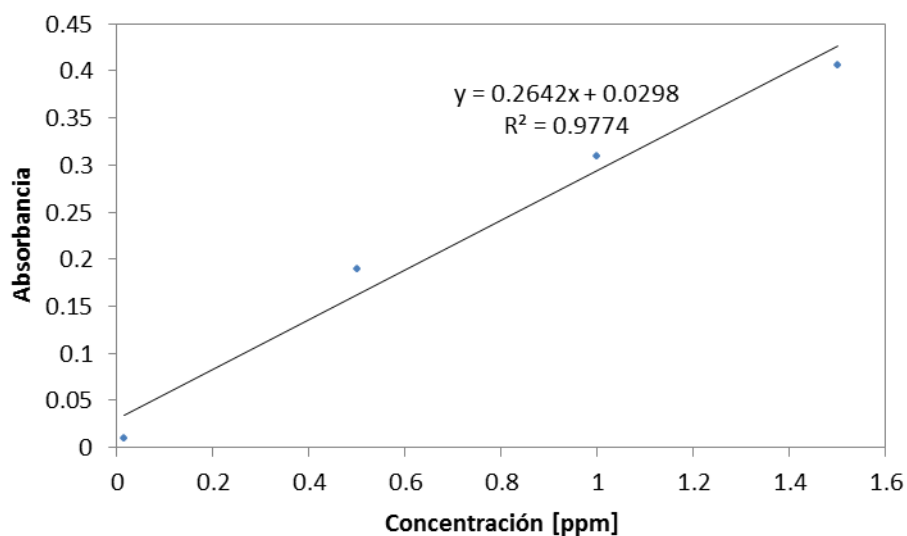


Figura 28: Curva de calibración de Magnesio

La ecuación de absorbancia en función de la concentración es

$$A = 0.2642C_{Mg} + 0.0298$$

Los resultados de la presencia de Zinc y Magnesio para las muestras se muestran en las Tabla 10, Tabla 11 y Tabla 12.

Tabla 10: Concentración de Zn y Mg para pastillas efervescentes

Metal	Zn [ppm]	Mg [ppm]
Efervescente	0.329	0.059
	0.323	0.056
	0.332	0.061
Promedio	0.328	0.0586667
Desviación Estándar	0.0045826	0.0025166

Tabla 11: Concentración de Zn y Mg para vitamina C en líquido

Metal	Zn [ppm]	Mg [ppm]
Líquido	0.018	0.003
	0.022	0.002
	0.023	0.004
Promedio	0.021	0.003
Desviación Estándar	0.0026458	0.001

Tabla 12: Concentración de Zn y Mg para tabletas

Metal	Zn [ppm]	Mg [ppm]
Tabletas	0.025	0.153
	0.024	0.155
	0.017	0.155
Promedio	0.022	0.1543333
Desviación Estándar	0.0043589	0.0011547

Para calcular la concentración de las muestras se despeja las ecuaciones obtenidas de las curvas de calibración en función de la concentración de cada metal. Las mismas se muestran a continuación

$$C_{Zn} = \frac{A + 0.01}{0.1674}$$

y

$$C_{Mg} = \frac{A - 0.0298}{0.2642}$$

Los resultados obtenidos de concentración de Zn y Mg se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13: Concentración de Zn y Mg en los suplementos vitamínicos

Metal	Zn [ppm]	Mg [ppm]
Efervescente	2.01912	0.109261
Líquido	0.18519	-
Tabletas	0.19116	0.47136

Los metales se ligan a los oxígenos de la estructura de la vitamina C. La misma se observa en la Figura 29.

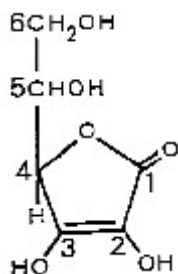


Figura 29: Estructura de L-ácido asórbico

La presencia de Zinc en el suplemento vitamínico crea un ligando entre la vitamina C y el metal en dos aniones a través de los oxígenos O-3, O-2 del primer anión y O-3 y O-1 del segundo anión (Tajmir-Rhiahi, 1991). Esto crea una quelación entre el metal y el ácido asórbico, de manera que se impide la degradación de AA a DHAA.

Por su parte, el magnesio se liga a los oxígenos O-1 y O-3 formando quelación entre el metal y la vitamina C (Tajmir-Rhia, 1990).

Se puede observar que este fenómeno concuerda con las cinéticas de degradación de AA, puesto que las mismas nos indican una lenta degradación de AA.

CONCLUSIONES

En conclusión, se ha logrado obtener la cinética de degradación (Tabla 7) para los diferentes suplementos vitamínicos almacenados en dos ambientes diferentes, expuestos al sol y en un lugar oscuro y fresco, mediante el uso del sistema HPLC. Las cinéticas de degradación para las tabletas y pastillas efervescentes almacenadas expuestas al sol muestran una degradación más rápida en comparación a las almacenadas en un lugar oscuro y fresco. La temperatura y la presencia de oxígeno aceleran la degradación de la vitamina C en los suplementos vitamínicos sólidos. En cuanto a la vitamina C líquida existe poca diferencia entre los dos almacenamientos debido a la dificultad de la vitamina C de oxidarse en solución. La presencia de metales en los suplementos vitamínicos sugiere que existe una forma de complejo de coordinación entre los metales y el ácido ascórbico, la cual puede ser una de las razones por las cuales no se degrada la vitamina C rápido. Se ha encontrado que la fecha de expiración sobrepasa la especificada en los frascos de cada medicamento, a excepción de la de tabletas almacenadas al sol, la cual expira antes de la fecha especificada. Debido a que se esperaba que exista una degradación más rápida de los medicamentos expuestos al sol, se recomienda realizar un estudio más a fondo del cambio de concentración en los próximos 12 meses. Se recomienda realizar dos mediciones más, una a los 6 siguientes meses, y la siguiente a ésta 6 meses después. Por otro lado, se recomienda realizar un estudio sobre el efecto que tienen los metales que son utilizados como excipientes en los medicamentos. Esto es para ver si esta es una de las razones de la lenta degradación del ácido ascórbico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Biesalski, H., & Grimm, P. (2007). *Nutrición: texto y atlas*. Madrid: Médica Panamericana.
- Blakley, D. (2004). *Determination of pharmaceutical expiration date*. US 6810350 B2.
- Buck Scientific. (s.f.). *Model BLC-10/10C/11C Series Isocratic HPLC System. Operator's Manual*. Buck Scientific.
- Carbajal, A. (2003). *Ingestas recomendadas de energía y nutrientes*. Obtenido de <https://www.ucm.es/data/cont/docs/458-2013-07-24-CARBAJAL-IR-2003-ISBN-84-9773-023-2-rev2013.pdf>
- Fogler, S. (2001). *Elementos de ingeniería de las reacciones químicas*. México D.F.: Prentice Hall.
- Gil, A. (2010). *Tratado de Nutrición. Composición y Calidad Nutritiva de los Alimentos*. Madrid: Médica Panamericana.
- Harvard. (2003). *Drug Expiration Dates-Do They Mean Anything?*. Harvard Medical School. Harvard Health Publications.
- Levenspiel, O. (1990). *Ingeniería de las reacciones químicas*. España: Editorial Reverté.
- National Institutes of Health. (2011). *Vitamina C*. U.S. Department of Health & Human Services.
- Nojavan, S., & et. al. (2008). Extraction and quantitative determination of ascorbic acid during different maturity stages of *Rosa canina* L. fruit. *Journal of Food Composition and Analysis*, 300-305.

- Nováká, L., & et. al. (2008). HPLC methods for simultaneous determination of ascorbic and dehydroascorbic acids. *Trends in Analytical Chemistry*, 27(10).
- Oyetade, O., & et. al. (Septiembre de 2012). Stability Studies on Ascorbic Acid (Vitamin C) From Different Sources. *Journal of Applied Chemistry*, 2(4), 20-24.
- Papadoyannis, I., Tsioni, G., & Samanidou, V. (2006). Simultaneous Determination of Nine Water and Fat Soluble Vitamins After SPE Separation and RP-HPLC Analysis in Pharmaceutical Preparations and Biological Fluids. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 3203-3231.
- Shafqat, U., & et. al. (2012). A Simple and Rapid HPLC Method for Analysis of Vitamin-C in Local Packed Juices of Pakistan. *Middle-East Journal of Scientific Research*, 8(12), 1085-1091.

ANEXO A: CROMATOGRAMAS DE ÁCIDO ASCÓRBICO

En esta sección se muestran los cromatogramas característicos del ácido ascórbico, obtenidos para las diferentes mediciones que se realizaron en el sistema HPLC de la curva de calibración y de las muestras.

Curva de Calibración.

Estándares.

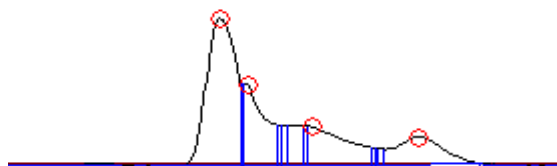


Figura 30: Cromatograma característico de los estándares de AA

Efervescente.

Control

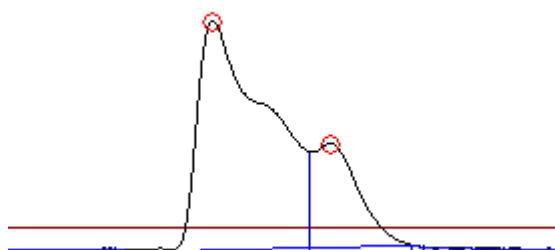


Figura 31: Cromatograma característico de muestras efervescentes de control. Almacenadas al sol.

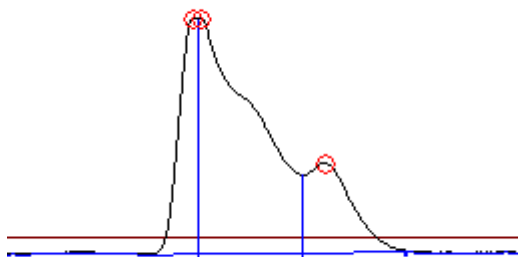


Figura 32: Cromatograma de muestras efervescentes almacenadas al sol

Almacenadas en lugar oscuro y fresco.

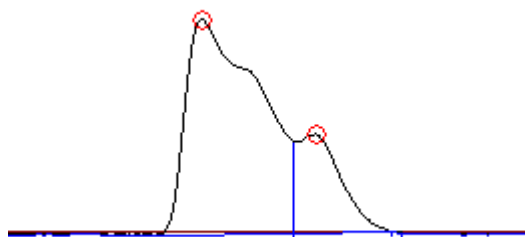


Figura 33: Cromatograma característico de muestras efervescentes almacenadas en lugar fresco y oscuro

Líquido

Control



Figura 34: Cromatograma característico de muestras líquidas de control.

Almacenadas al sol.

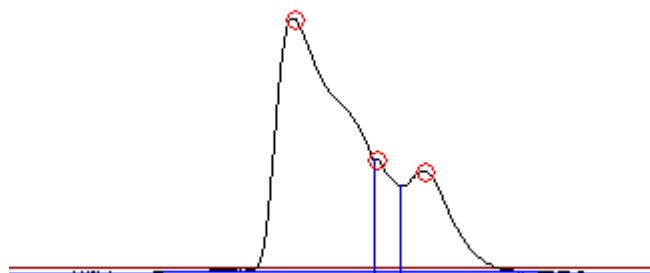


Figura 35: Cromatograma de muestras líquidas almacenadas al sol

Almacenadas en lugar oscuro y fresco.

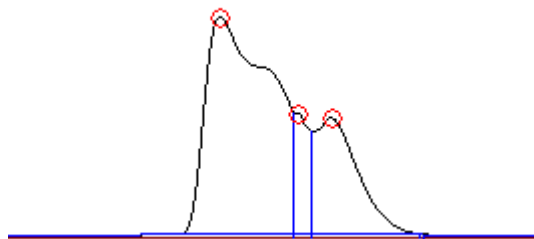


Figura 36: Cromatograma característico de muestras líquidas almacenadas en lugar fresco y oscuro

Tabletas

Control

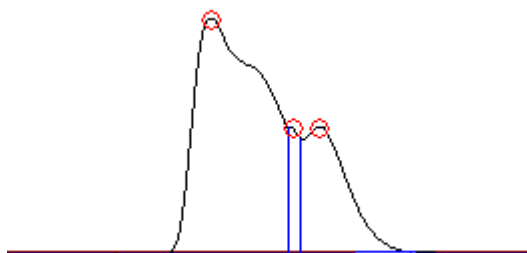


Figura 37: Cromatograma característico de muestras en tabletas de control.

Almacenadas al sol.

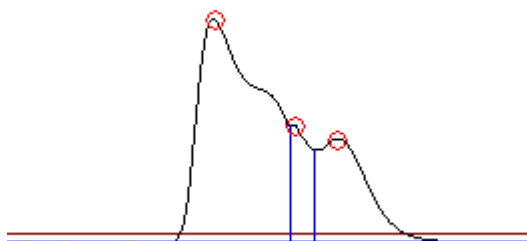


Figura 38: Cromatograma de muestras en tabletas almacenadas al sol

Almacenadas en lugar oscuro y fresco.

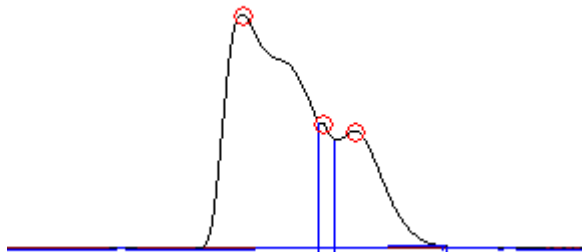


Figura 39: Cromatograma característico de muestras en tabletas almacenadas en lugar fresco y oscuro

ANEXO B: MÉTODO INTEGRAL

En esta sección se resuelve de forma matemática las integraciones de las velocidades de reacción para reacciones de orden 0, 1 y 2.

Orden 0

La cinética de reacción para reacciones de primer orden está dada por

$$-r_A = -\frac{dC_A}{dt} = k$$

Los límites de integración son

$$t = 0 \quad C_A = C_{A_0}$$

$$t = t \quad C_A = C_A$$

Para integrar, se realiza separación de variables y se obtiene la siguiente expresión

$$\int_{C_{A_0}}^{C_A} dC_A = -k \int_0^t dt$$

Al integrar se obtiene la siguiente expresión

$$C_A = C_{A_0} - kt$$

Orden 1

La cinética de reacción para reacciones de primer orden está dada por

$$-r_A = -\frac{dC_A}{dt} = kC_A$$

Los límites de integración son

$$t = 0 \quad C_A = C_{A_0}$$

$$t = t \quad C_A = C_A$$

Para integrar, se realiza separación de variables y se obtiene la siguiente expresión

$$\int_{C_{A_0}}^{C_A} \frac{dC_A}{C_A} = -k \int_0^t dt$$

Integrando se obtiene

$$\ln C_A = \ln C_{A_0} - kt$$

En este caso, se grafica el $\ln C_A$ versus el tiempo t . Al ajustar los datos a la línea de tendencia, si se obtiene una regresión lineal, quiere decir que la reacción es de orden 1. La pendiente va a ser el valor de la constante de velocidad k y sus unidades están dadas por [tiempo⁻¹].

Orden 2

La cinética de reacción para reacciones de primer orden está dada por

$$-r_A = -\frac{dC_A}{dt} = kC_A^2$$

Los límites de integración son

$$t = 0 \quad C_A = C_{A_0}$$

$$t = t \quad C_A = C_A$$

Para integrar, se realiza separación de variables y se obtiene la siguiente expresión

$$\int_{C_{A_0}}^{C_A} \frac{dC_A}{C_A^2} = -k \int_0^t dt$$

Integrando se obtiene la relación de concentración versus tiempo como se muestra a continuación

$$\frac{1}{C_A} = \frac{1}{C_{A_0}} + kt$$

La pendiente es el valor de la constante de velocidad k y sus unidades son [tiempo⁻²]

ANEXO C: MÉTODO DIFERENCIAL

A continuación se muestran los resultados de los cálculos para minimizar el error mediante el método diferencial.

Tabla 14: Resultados del método diferencial para pastillas efervescentes almacenadas al sol

t [días]	C _{AA} [mg/mL]	-r _{Aexp}	-r _{Acalc}	Error absoluto
0	0.1099	8.00E-04	6.63E-04	2.3E-05
1	0.1096	7.43E-04	6.63E-04	8.6E-06
4	0.1093	6.01E-04	6.62E-04	6.2E-06
7	0.1070	4.99E-04	6.56E-04	4.9E-05
12	0.1036	4.05E-04	6.48E-04	0.00015
30	0.1019	5.83E-04	6.43E-04	6.3E-06
56	0.0965	1.52E-03	6.30E-04	0.00052
104	0.0930	4.21E-03	6.21E-04	0.00306
137	0.0836	3.73E-03	5.95E-04	0.00263
152	0.0831	2.43E-04	5.93E-04	0.0005
			Suma	0.00696

Tabla 15: Resultados del método diferencial para pastillas efervescentes almacenadas en lugar fresco y oscuro

t [días]	C _{AA} [mg/mL]	-r _{Aexp}	-r _{Acalc}	Error absoluto
0	0.1099	2.00E-04	1.95E-04	1.27E-07
1	0.1096	1.98E-04	1.96E-04	2.68E-08
4	0.1093	1.91E-04	1.96E-04	1.42E-07
7	0.1070	1.84E-04	2.03E-04	1.88E-06
12	0.1036	1.73E-04	2.13E-04	9.36E-06
30	0.1019	1.49E-04	2.18E-04	3.27E-05
56	0.0965	1.73E-04	2.36E-04	2.36E-05
104	0.0930	4.63E-04	2.50E-04	9.85E-05
137	0.0836	2.03E-03	2.92E-04	1.48E-03
152	0.0831	3.94E-03	2.95E-04	3.37E-03
			Suma	5.02E-03

Tabla 16: Resultados del método diferencial para presentación líquida almacenadas al sol

t [días]	C_{AA} [mg/mL]	-r_{Aexp}	-r_{Acalc}	Error absoluto
0	0.24095	6.00E-04	3.24E-04	1.27E-04
1	0.24065	5.84E-04	3.25E-04	1.15E-04
4	0.23975	5.38E-04	3.30E-04	8.10E-05
7	0.23843	4.95E-04	3.36E-04	5.11E-05
12	0.23890	4.30E-04	3.34E-04	2.13E-05
30	0.22907	2.55E-04	3.89E-04	7.04E-05
56	0.22526	1.74E-04	4.13E-04	3.28E-04
104	0.21170	5.58E-04	5.18E-04	2.90E-06
137	0.17440	1.22E-03	1.05E-03	2.50E-05
152	0.15387	1.63E-03	1.65E-03	2.32E-07
			Suma	8.22E-04

Tabla 17: Resultados del método diferencial para presentación líquida almacenadas en un lugar fresco y oscuro

t [días]	C_{AA} [mg/mL]	-r_{Aexp}	-r_{Acalc}	Error absoluto
0	0.24374	2.00E-05	1.49E-04	8.30E-04
1	0.24226	5.88E-05	1.55E-04	1.57E-04
4	0.24111	1.62E-04	1.60E-04	2.42E-08
7	0.24070	2.47E-04	1.62E-04	2.92E-05
12	0.24193	3.54E-04	1.56E-04	1.10E-04
30	0.23724	5.32E-04	1.78E-04	2.35E-04
56	0.23585	8.15E-04	1.85E-04	4.87E-04
104	0.22780	3.35E-03	2.32E-04	2.90E-03
137	0.20141	6.51E-03	5.22E-04	5.50E-03
152	0.19688	7.87E-03	6.06E-04	6.71E-03
			Suma	1.70E-02

Tabla 18: Resultados del método diferencial para tabletas almacenadas al sol

t [días]	C_{AA} [mg/mL]	-r_{Aexp}	-r_{Acalc}	Error absoluto
0	0.21662	5.00E-04	1.04E-02	1.97E-01
1	0.21543	5.38E-04	1.03E-02	1.78E-01
4	0.21548	6.24E-04	1.03E-02	1.51E-01
7	0.21812	6.74E-04	1.06E-02	1.45E-01
12	0.20532	6.93E-04	9.40E-03	1.09E-01
30	0.20242	3.57E-04	9.15E-03	2.16E-01
56	0.20129	-2.66E-04	9.05E-03	-3.26E-01
104	0.20030	-5.51E-04	8.96E-03	-1.64E-01
137	0.17482	-2.47E-03	6.89E-03	-3.55E-02
152	0.17209	-4.86E-03	6.69E-03	-2.74E-02
			Suma	4.43E-01

Tabla 19: Resultados del método diferencial para tabletas almacenadas en un lugar fresco

y oscuro

t [días]	C_{AA} [mg/mL]	-r_{Aexp}	-r_{Acalc}	Error absoluto
0	0.22198	6.00E-04	2.73E-04	1.78E-04
1	0.22155	5.06E-04	2.74E-04	1.06E-04
4	0.21858	2.89E-04	2.79E-04	2.92E-07
7	0.21755	1.55E-04	2.81E-04	1.02E-04
12	0.22219	7.69E-05	2.73E-04	5.00E-04
30	0.22019	5.21E-04	2.76E-04	1.15E-04
56	0.21793	1.48E-03	2.81E-04	9.67E-04
104	0.21340	1.28E-02	2.89E-04	1.22E-02
137	0.17742	4.67E-02	3.77E-04	4.60E-02
152	0.17255	7.41E-02	3.92E-04	7.33E-02
			Suma	1.33E-01