



Universidad de los Andes
Facultad de Ciencia
Departamento de Química
Laboratorio de Electroquímica



Trabajo Especial de Grado

***DETERMINACIÓN VOLTAMÉTRICA DE METILPARABENO EN PRODUCTOS
COSMÉTICOS***

www.bdigital.ula.ve

Br. Rossi Gabriela Vivas Molina

Tutor: Reynaldo Ortiz

Mérida 2017

DEDICATORIA

A Dios Todopoderoso, quien me dio la fe, la fortaleza, la salud y la esperanza día tras día para terminar satisfactoriamente este trabajo.

A mi madre por su apoyo incondicional, su paciencia, amor, comprensión, sacrificios, por enseñarme desde pequeña a luchar para alcanzar mis metas. Mi triunfo es tuyo brují. Te amo.

A mi hermano, por tus palabras de aliento y siempre estar acompañándome en todo momento.

www.bdigital.ula.ve

AGRADECIMIENTO

A Dios y la Virgen del Valle por acompañarme cada día de mi vida.

A mis padres por su apoyo incondicional, por enseñarme que los grandes logros implican esfuerzo y sacrificio.

A mi casa de estudios la ilustre Universidad de los Andes y a la Facultad de Ciencias, por ser mi segunda casa y brindarme la oportunidad de formarme como un profesional integral.

A todos nuestros profesores, por estar siempre presente en nuestras vidas y compartir sus conocimientos con nosotros.

A todo el grupo del laboratorio de Electroquímica de la Facultad de Ciencias, por abrir sus puertas y darme la oportunidad de seguir adquiriendo conocimientos.

A mi tutor Dr. Reynaldo Ortiz por su valiosa ayuda, apoyo, paciencia, colaboración, y grandiosa solidaridad en el desarrollo y culminación de este trabajo.

A los profesores del jurado, Yelitza Delgado y Jorge Uzcategui quienes con sus sugerencias, observaciones, y colaboración me hicieron fortalecer esta investigación.

A mis amigos Alejandra, Fiorela, Siria, Andrea, Julio, José Luis, Alejandro, Jesús, Eliana, gracias por el apoyo incondicional y amistad brindados durante toda mi carrera.

A mi compañero de vida, Felix Gustavo por su apoyo incondicional y consejos en todo momento.

A quienes siempre me alentaron en todo momento, mi agradecimiento eterno.

A todos, ¡gracias!

RESUMEN

En este trabajo se desarrolló una metodología para la determinación electroquímica de MP mediante la técnica de Voltametría de pulso diferencial, utilizando como electrodo de trabajo un electrodo de carbón vítreo (CV), en buffer fosfato 0,2 M (pH 7), para las tres formulaciones cosméticas de polvos compactos (Wincolor, Ponds, AR). Se estudiaron todas las variables como velocidad de barrido, período de estabilidad, reproducibilidad, e influencia de la concentración en la intensidad de picos anódicos a través de la técnica de Voltametría cíclica. Donde se reflejó un proceso de oxidación irreversible controlado por difusión sobre la superficie electrodo. En el rango de concentración 1×10^{-4} - 1×10^{-3} M, sensibilidad $12,63 \times 10^{-3}$ L·mol⁻¹, el límite de detección $4,04 \times 10^{-4}$ mol·L⁻¹, límite de cuantificación $1,35 \times 10^{-4}$ mol·L⁻¹. Los resultados del análisis fueron correlacionados estadísticamente y por estudios de recuperación de cada uno de los polvos compactos obteniéndose $89,8 \pm 0,8$; $76,0 \pm 4,5$; $69,2 \pm 3,1$ % respectivamente. Este método voltamétrico es fácil de usar, de bajo costo y preciso para la determinación del metilparabeno en productos cosméticos.

Palabras claves: Metilparabeno, Voltametría, cosméticos, recuperación.

INDICE GENERAL

	Página
Dedicatoria	III
Agradecimiento	IV
Resumen	V
Índice General	VI
Índice de Tablas	VIII
Índice de Figuras	IX
Capitulo I	
1.Introducción	1
1.1 Cosméticos	2
1.2 Conservantes	2
1.2.1 Conservantes Antimicrobianos	2
1.2.2 Conservantes Antioxidantes	3
1.3 Parabenos	3
1.3.1 Mecanismo de oxidación de los Parabenos	4
1.3.2 Usos y regulación de los Parabenos	5
1.3.3 Efectos causados el uso de los Parabenos	6
1.4 Estudios electroquímicos y espectroscópicos de los Parabenos	13
Capitulo II. Planteamiento de Investigación	
2.1 Justificación de la investigación	23
2.2 Hipótesis	23
2.3 Objetivos	23
2.3.1 Objetivo General	23
2.3.2 Objetivos Específicos	23
2.4 Metodología	24
2.5 Cronograma de actividades	24
Capitulo III. Técnicas Instrumentales	
3.1 Voltametría	25
3.1.1 Voltametría cíclica	26
3.1.1.1 Sistemas reversibles	28
3.1.1.2 Sistemas irreversibles	28
3.1.1.3 Sistemas Cuasi-reversibles	29
3.2 Voltametría de pulso diferencial VPD	30
3.2.1 Ventajas de la técnica de VPD	33
3.3 Espectroscopia Ultravioleta-Visible	33
3.3.1 Ley de Lambert-Beer	37
3.3.2 Limitaciones de la Ley de Lambert-Beer	38
Capitulo IV. Parte Experimental	
4.1 Reactivos	39
4.1.1 Limpieza del material de vidrio	40
4.2 Materiales y instrumentación	40
Capitulo V. Resultados	
5.1 Procedimiento Experimental	42

	Página
5.1.1 Estudios preliminares	42
5.1.1.1 Voltametría cíclica del electrodo de carbón vítreo	42
5.1.1.2 Comportamiento del electrolito soporte sobre la superficie de CV	43
5.1.1.3 Elección del solvente adecuado para la extracción del MP	44
5.1.1.4 Procedimiento de extracción de MP para los diferentes polvos compactos	47
5.2 Optimización de los parámetros de trabajo	48
5.2.1 Influencia de la velocidad de barrido en la intensidad de corriente	48
5.2.2 Estabilidad y Reproducibilidad	50
5.2.3 Influencia de la concentración de MP en la intensidad de corriente	50
5.3 Curva de calibración sencilla mediante VPD	51
5.4 Curvas de CCAE y análisis de significancia entre las pendientes	52
5.5 Correlación del método propuesto a través de espectroscopia UV-Visible	56
5.6 Análisis de significancia entre los resultados obtenidos por VPD y la técnica UV-Visible	59
5.7 Porcentaje de recuperación obtenido	60
Capítulo VI. Conclusiones y Recomendaciones	
6.1 Conclusiones	65
6.2 Recomendaciones	67
Capítulo VII.	68
7. Referencias	68

www.bdigital.ula.ve

INDICE DE TABLAS

Tabla	Página
I. Tipos de perseverantes utilizados en el mercado, fórmulas estructurales y concentraciones máximas permitidas (CEE).	3
II. Propiedades Fisicoquímicas de los Parabenos	5
III. Especificación de los reactivos a utilizados	39
IV. Características analíticas de las curvas de calibrado obtenidas mediante VPD (figura 42.B).	53
V. Resultados de la regresión lineal para la curva de adición estándar por VPD: $IP= B +M[MP]$	55
VI. Concentraciones encontradas por extrapolación de las CCAE.	56
VII. Resultados de la regresión lineal por UV-Visible para las CCAE: $IP= B +M[MP]$	58
VIII. Concentraciones de MP por UV-Visible encontradas por extrapolación de las CCAE.	59
IX. Resultados del análisis de significancia para los polvos compactos en la determinación de la [MP]	60
X. Resultados de la regresión lineal para las CCAE: $IP= B +M[MP]$ y la concentraciones encontradas por extrapolación para la recuperación.	62
XI. Porcentajes de recuperación obtenidos para el MP en los diferentes polvos compactos analizados	62
XII. Análisis comparativo entre las técnicas de Voltametría de pulso diferencial y la espectroscopia UV-Visible, en la determinación del metilparabeno en productos cosméticos, polvos compactos.	63

INDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Estructura química general del Parabeno (donde R= grupo alquilo (CH ₃ , C ₂ H ₅ , C ₃ H ₇ , C ₄ H ₈))	4
2. Mecanismo electroquímico de oxidación de los parabenos	4
3. Diferentes usos de los Parabenos como conservante.	6
4. Cambios morfológicos inducidos por MP en NHEKs. La F-actina fue marcada por Alexa Fluor® 568 conjugada.	9
5. Activación combinada de MP por la irradiación solar y de la piel esteradas conducen hacia daño oxidativo del ADN.	10
6. Respuesta de Voltametría cíclica para una solución 1mM Metilparabeno en buffer de fosfato (pH 7,0, 0,2 M) (a) Metilparabeno y (b) blanco a una velocidad de barrido de 50 mVs ⁻¹	15
7. Estudiaron el electro oxidación del Metilparabeno 1,0 mM en un rango de pH de:(a) 3,0, (b) 4,2, (c) 5,0, (d) pH 6,0, (e) pH 7,0, (f) pH 8,0, (g) pH 9,2 y (h) 10.4, en una solución tampón de fosfato por Voltametría cíclica.	15
8. Muestra los Voltagrama realizados por el método de Voltametría de onda cuadrada (SWV), utilizando el electrodo de trabajo de Oro, a diferentes concentraciones de Metilparabeno en una solución buffer de fosfato, pH 7 (0,2 M): (a) 0,04 (b) 0,06 (c) 0,08, (d) 0,1 (e) 0,2 (f) 0,4 (g) 0,6 (h) 0,8 y (i) 1,0 mM.	16
9. Espectro UV de metilparabeno 1 Mm en un buffer de fosfato pH 7 (0.2 M) (a) antes de la electrolisis y (b) después de la electrolisis.	17
10. Voltagramas cíclicos obtenidos con electrodo de carbón vítreo en una solución de 0,1 M de buffer de fosfato pH 7, en soluciones 0,25 mM de los diferentes Parabenos (MP, EP, PP, BP, BZP) respectivamente.	17
11. Gráfico de correlación entre los potenciales de oxidación (E°) y potencial de ionización (Ip) para los parabenos, calculado con OO-MP2/def2-TZVPP.	18
12. Voltagrama de pulso diferencial para un electrodo de carbón vítreo (GCE) y una solución buffer de fosfato (PBS, pH=7), en soluciones 200 μM de (a) metilparabeno (MP) y (b) Propilparabeno (PP) a una velocidad de barrido de 100 mV*s ⁻¹	19
13. La Voltametría cíclica de 100,0 M MP a velocidades de barrido de: 10,0; 30,0; 50,0; 70,0; 110,0; 130,0 y 150,0 mV s ⁻¹ , en presencia de 0,2 M PBS (pH = 7,0).	19

14.(a) Se muestra la Voltametría de pulso diferencial del Metilparabeno, en la cual se observa como la corriente de oxidación aumentan con el aumento de la concentración del MP (b) Curva de calibración para el MP	20
15.Respuesta de Voltametría cíclica del electrodo MWCNTs/Hb/CPE en una concentración $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \text{ K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ y 0.1 M KCl a diferentes velocidades de barrido desde 10 hasta 1430 mV/s .	20
16. Muestra los espectros de absorción (a) metilparabeno versus agua destilada, (b) reactivo vs agua destilada, y (c) colorante azoico contra el blanco de reactivo.	21
17. (a) Voltagramas de onda cuadrada de diversas concentraciones de MP en (Co-Ni-Pd) NPS-CNFs/GCE en $0,1 \text{ M PBS}$ a pH 7. Frecuencia: 22 Hz . Amplitud: 50 mV/s . Concentraciones desde $3\text{-}300 \text{ nM}$. (b) Corriente de pico vs concentración de MP.	22
18. Señal de excitación empleada en Voltametría cíclica.	26
19. Voltagrama Cíclico de acuerdo al convenio planteado por la IUPAC	27
20. Voltagrama cíclico para un sistema redox irreversible.	29
21. Voltagrama cíclico para un sistema cuasi-reversible.	30
22. (A)Señal de excitación en VPD y (B) respuesta típica en VPD	31
23. Esquema de un ciclo en una Voltametría diferencial de pulsos.	32
24. Transiciones electrónicas entre orbitales moleculares	34
25. Partes básicas de un espectrofotómetro de absorción.	35
26. Diagrama esquemático del aparato usado para métodos analíticos basados en la absorción de energía radiante (configuración de doble haz).	36
27.Pico máximo de absorción de un espectro UV- Visible	37
28. Absorbancia transmitancia	38
29. Esquema de la celda electroquímica	41
30. Celda y electrodos empleados para el estudio electroquímico: (a) Celda de vidrio de un compartimento (b) Electrodos (c) Electrodo de carbón vítreo empotrado en vidrio.	41
31. (A) Potenciostato/Galvanostato (AutoLab-PGSTAT20) y (B) espectrofotómetro UV-visible Perkin Elmer modelo Lambda 25.	42

32. Respuesta voltamétrica del electrodo de CV en H ₂ SO ₄ 0,5 M. $v = 100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$	43
33. Respuesta de la solución electrolítica utilizando un buffer fosfato 0,2 M pH=7	43
34. Respuesta voltamétrica de la influencia del solvente en la intensidad de oxidación del MP. A-Metanol, B-Etanol, C- Agua, D-Acetonitrilo, y E-Superposición de los solventes utilizados para una solución $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ de metilparabeno.	44
35. Respuesta CCAE de los diferentes solventes utilizados para la extracción del metilparabeno.	46
36. Extracción del metilparabeno de los diferentes polvos compactos	47
37. (A) Voltagramas por la técnica de Voltametría cíclica para una solución $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ de MP con variación de la velocidad de barrido entre $10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ hasta $1500 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, entre -0,2 a 1,6 V sobre el electrodo de CV, en solución reguladora de fosfato 0,2 M (pH=7). (B) I_p vs v (C) I_p vs $v^{1/2}$	49
38. Respuesta de Voltametría cíclica del MP a la velocidad de trabajo $v = 50 \text{ mV/s}$.	49
39. (A) Respuesta voltamétrica de pulso diferencial obtenida para varias repeticiones de la oxidación de MP $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ sobre CV a una velocidad de $v = 50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. (B) I_p vs número de barrido (repeticiones).	50
40. (A) VPD para diferentes concentraciones MP desde 5×10^{-6} a $1 \times 10^{-3} \text{ M}$, en tampón de fosfato 0,2 M de pH=7. (B) curva de calibración para diferentes concentraciones de MP.	51
41. (A) Voltagramas de Voltametría de pulso diferencial (VPD) en un rango de 7×10^{-4} - $1 \times 10^{-3} \text{ M}$, con una Ancho de pulso (Δt) = 20 ms, Altura de pulso (ΔE)= 50 mV y $v = 50 \text{ mV/s}$. (B) curva de calibración sencilla (CCS) del MP.	52
42. (A) Voltagrama de pulso diferencial de los diferentes polvos compactos. (B) curva comparativa entre CCS y CCAE para el MP.	53
43. Curva de calibración sencilla en un rango de concentración 9×10^{-6} - $2,1 \times 10^{-5}$ en un rango de longitud de onda de 200 a 300 nm.	56
44. Espectros de absorción de los diferentes polvos compactos analizados	57
45. Curvas de adición estándar para cada uno de los cosméticos analizados a través de UV-Visible.	58
46. Respuesta UV-Visible y CCAE del % de recuperación de los cosméticos analizados.	61

Capítulo I

1. Introducción

Con vista a descubrir conservantes sustitutivos del ácido salicílico y ácido benzoico, ya que ambos presentaban el inconveniente de ser eficaces únicamente a rangos de pH altamente ácido, T. Sabalitschka sintetizó en la década de 1920 diversos ésteres alquilo y arilo del ácido p-hidroxibenzoico (parabenos) y los propuso como conservantes de alimentos y fármacos. Actualmente, se usan sobre todo en la conservación de productos farmacéuticos y preparaciones cosméticas, se ha reportado su uso en más de 13.200 formulaciones, campos en los que pueden explotarse las principales ventajas de estos productos; es decir, eficacia continuada en un rango de pH neutro a débilmente ácido.^[1]

Sin embargo el uso de los conservantes en cosmética se ha discutido en todo el mundo, el uso de los parabenos se encuentra en cuestionamiento debido a que tienen actividad estrogénica, pueden unirse a receptores estrógenos procedentes de distintas fuentes, algunos estudios realizados revelan la presencia de los mismos en tumores en la mama humana. Según la directiva de la Comunidad Económica Europea (CEE), el uso de esté como conservante en productos cosméticos está permitido hasta una concentración máxima de 0,4% (m/ m) y el 0,8% (m / m) para mezclas de ésteres expresados como ácido p-hidroxibenzoico.^[2]

Existen diferentes métodos para la determinación de Metilparabeno (MP) entre ellos los más comunes son: la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cromatografía líquida de ultra alto rendimiento (UHPLC), electroforesis, cromatografía electrocinética micelar y espectrometría de masas, detección amperométrica, determinaciones voltamétricas y espectroscopia de absorción en la región UV-visible.

En este trabajo se desarrolló una metodología para la determinación electroquímica de MP mediante la técnica de Voltametría de pulso diferencial, utilizando como electrodo de trabajo un electrodo de carbón vítreo, en tres formulaciones cosméticas de polvos compactos, y los resultados se correlacionaron empleando la técnica de espectroscopia UV-visible.

1.1- Cosméticos

Un cosmético es cualquier sustancia o mezcla destinada a ser colocado en contacto con las partes superficiales del cuerpo humano (epidermis, sistema piloso y capilar, uñas, labios externa órganos genitales) o con los dientes y las membranas mucosas de la vía oral con el fin exclusivo o principal de limpiarlos, perfumar, modificar su aspecto, protegerlos, mantenerlos en buen estado o corregir olores corporales. En su formulación típica incluye principios activos, excipientes y aditivos (colorantes, perfume, conservantes, entre otros).^[3]

1.2- Conservantes

Los conservantes son sustancias que se añaden a diversos alimentos y productos farmacéuticos con la finalidad de prolongar su vida útil. Son especialmente utilizados en productos que tienen mayor cantidad de agua, ya que evita la alteración y degradación de microorganismos durante su almacenamiento. Los conservantes se clasifican en dos clases principalmente: antioxidantes y antimicrobianos.^[4]

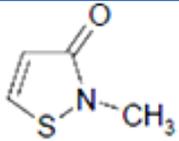
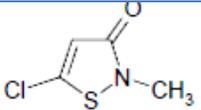
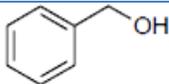
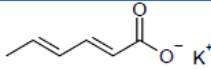
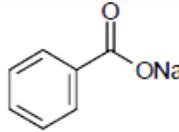
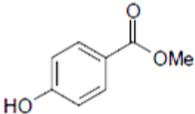
- **Conservantes Antimicrobianos:** Se utilizan para matar o inhibir el crecimiento de microorganismos introducidos durante su fabricación y uso. Estos se clasifican a su vez en dos subgrupos: conservantes anti-fúngicos (ácido benzoico, ácido ascórbico, compuestos fenólicos, tales como metilo, etilo, propilo y butilo (parabenos)) y antibacterianas (sales de amonio cuaternario, alcoholes, fenoles, mercuriales).^[5]
- **Conservantes Antioxidantes:** Son utilizados para evitar el deterioro debido a la oxidación.^[5,6]

Estos se clasifican en tres grupos:

- Antioxidantes verdaderos: Su función es inhibir la oxidación por reacción con los radicales libres de bloqueo, por ejemplo: hidroxianisol.^[6]
- Antioxidantes con agentes reductores: Son sustancias que tienen más bajos potenciales redox que el fármaco. Estos agentes pueden actuar también por reaccionar con los radicales libres. Ejemplo son: el ácido ascórbico, las sales de potasio y sodio de ácido sulfuroso.^[6]
- Antioxidantes sinergistas: tienen poco efecto antioxidante ellos mismos, sin embargo mejoran la acción de los antioxidantes por reacción con iones de metales pesados que catalizan la oxidación. Ejemplo de antioxidantes sinérgicos los ácidos cítrico, lecitina y ácido tartárico.^[6]

Los productos farmacéuticos, detergentes y cosméticos, requieren una protección contra el crecimiento microbiano, lo cual garantiza, la seguridad de su uso y duración ^[7]. El uso de conservantes asegura la calidad de estos productos. Los conservantes más utilizados en el mercado se describen en la tabla I.

Tabla I. Tipos de conservantes utilizados en el mercado, fórmulas estructurales y concentraciones máximas permitidas (CEE) ^[7].

Abreviación Conservante	Nombre IUPAC/ Sinónimo	Fórmula estructural	n° CAS	Cantidad máxima permitida (%m/m)
MI	2-metil-2H-isotiazol-3ona /metilisotiazolina		2682-20-4	0,01
CMI	5-cloro-2-metil-2H-isotiazol-3-ona/ clorometilisotiazolina		26172-55-4	0,0015
BA	Fenilmetanol/ alcohol de bencilo		100-51-6	0,01
PS	2,4-hexadionato de potasio/ sorbato de potasio		24634-61-5	0,2-0,6
SB	Benzoato de sodio/ sal sódica del ácido benzoico		532-32-1	0,1-2,5
MP	4-hidroxibenzoato de metilo /metilparabeno		99-76-3	0,4-0,8

1.3- Parabenos

Son ésteres de ácido 4-hidroxibenzoico, el grupo éster se localiza en la posición de C-4 del ácido. Los ésteres más empleados son: metil-, etilo-, propilo-, butil-, y bencilparabeno. figura 1.^[8] Son polvos cristalinos sin olor ni sabor, de naturaleza higroscópica, estables en el aire, eficaces en un amplio espectro de pH, económicos, sus diferentes estructuras químicas permite que cada parabenos tenga propiedades fisicoquímicas distintas (tabla II), por ejemplo el aumento en la longitud de cadena de alquilo aumenta su resistencia a la hidrólisis.

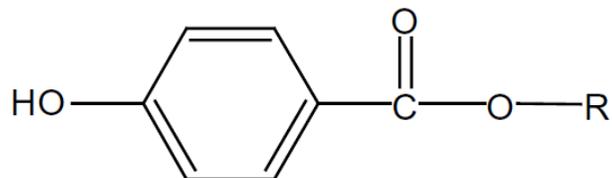


Figura 1. Estructura química general del Parabenos (donde R= grupo alquilo (CH₃, C₂H₅, C₃H₇, C₄H₈))

Los Parabenos fueron utilizados por primera vez como conservantes antimicrobianos a mediados de los años 1920 por Sabalitschka, estos se preparan mediante la esterificación de Fisher, la cual consiste en la formación de un éster por reflujo, en este caso en particular del ácido p-hidroxibenzoico y un alcohol primario o secundario, en presencia de un ácido como catalizador. Los tiempos de reacción comunes varían de 1 a 10 horas a temperaturas de 60 a 110 °C. ^[9]

1.3.1- Mecanismo de oxidación de los Parabenos

La reactividad REDOX de los compuestos fenólicos (Aro), sigue al menos dos mecanismos que pueden ocurrir en paralelo, como se aprecia en la figura 2, una transferencia de átomo de hidrogeno de un solo paso, y una transferencia de un solo electrón y la transferencia de protones. ^[10,11]

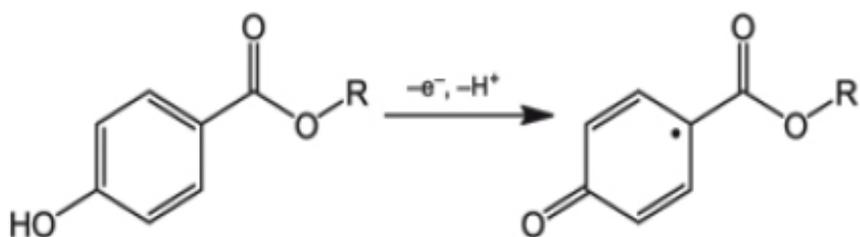
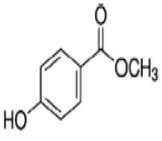
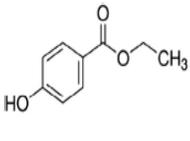
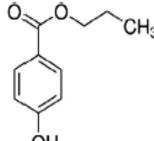
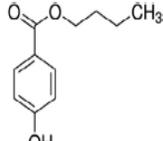


Figura 2. Mecanismo electroquímico de oxidación de los parabenos

Tabla II. Propiedades Fisicoquímicas de los Parabenos ^[12]

Parabenos	MP	EP	PP	BP
Estructura				
Apariencia Física	Polvo cristalino blanco, de olor débil característico, sabor ligeramente ardiente.			
Fórmula Molecular	C₈H₈O₃	C₉H₁₀O₃	C₁₀H₁₁O₃	C₁₁H₁₄O₃
Nombre	Metilparabeno	Etilparabeno	Propilparabeno	Butilparabeno
Peso molecular (g/mol)	152,15	166,17	180,20	194,23
CAS N°	99-76-3	120-47-8	94-13-3	94-26-8
E N°	E218	E214	E216	-----
Punto de fusión (°C)	131	116-118	96-98	68-69
Punto de Ebullición (°C)	270-280	297-298	-----	-----
Índice de refracción (η _a)	1,525	1,505	1,505	-----
pKa	8,17	8,22	8,35	8,37
Solubilidad a 25 °C (%m/m)				
Agua	0,25	0,11	0,04	0,02
Etanol	26	20	29	49
Glycol Propileno	32	41	50	68
Actividad antimicrobiana concentración mínima inhibitoria (%m/m)	0,20	0,12	0,08	0,015

1.3.2 Usos y regulación de los Parabenos

Los parabenos actúan por acción directa sobre la membrana del germen, y por competición con las coenzimas de estos, son eficaces frente a hongos y levaduras pero también frente a bacterias. Por ejemplo el MP y PP son más activos frente a bacterias Gram+, mientras que los parabenos de cadena más larga son efectivos contra Pseudónimas.^[13] La concentraciones que generalmente se formulan de los parabenos se encuentra entre 0,02-0.3 %, las cuales son utilizados en una amplia gama de productos: cosméticos, alimenticios, y farmacéuticos. Se estima que un individuo de 60 Kg está expuesto a 76 mg/día de parabenos; es decir, 1,26 mg/kg/día.^[14]



Figura 3.Diferentes usos de los Parabenos como conservante.

1.3.3 Efectos causados por los Parabenos

A pesar de que los parabenos son utilizados como conservantes desde hace aproximadamente más de 80 años, y las experiencias clínicas no hacen sospechar de estos, están sometidos, al igual que todos los productos de consumo, a continuas evaluaciones. [17]

Los efectos más frecuentemente asociados a los parabenos es la dermatitis de contacto alérgica por el uso de sustancias tópicas que contienen estos conservantes. La capacidad

sensibilizante de los parabenos es baja, sin embargo la mayor tasa de sensibilización la alcanza el MP y la menor, el BP. La actividad estrogénica de estos conservantes ha demostrado ser mayor para aquellos con una mayor longitud de la cadena, es decir; a medida que aumenta la cadena aumenta tanto la difusión percutánea como los efectos estrogénicos, y tras la absorción cutánea no existe paso hepático.^[17] Es por esta una de las razones por las cuales existe tanta controversia sobre su relación con la incidencia de cáncer de mamá, degradación oxidativa del ADN, y la infertilidad.

Uno de los primeros estudios realizados sobre la posible actividad estrogénica de los parabenos fue realizada en 1998 por Edwin J. Routledge y colaboradores ^[18]. Ellos realizaron estudios *in vitro* e *in vivo*, en los cuales confirman que un intervalo de los conservantes los parabenos son débilmente estrogénicos. En un receptor de unión, el BP fue capaz de competir con el 3-Hestradiol para la unión al estrógeno de rata receptor con una afinidad de aproximadamente 5 órdenes de magnitud menor que la de Dietilestilboestrol y entre 1 y 2 órdenes de magnitud menor que el Nonilfenol. Los cuatro parabenos metil, etil, propil y butilparabeno fueron todos débilmente estrogénicos siendo el más potente el butilparabeno, pero 10.000 veces menos potente que el 17- β estradiol. Cuando se administraron oralmente a ratas inmaduras, los parabenos estaban inactivos. Dado su uso en una amplia gama de productos comercialmente disponibles y preparaciones tópicas, los autores sugieren la reevaluación y el posible riesgo a la exposición de los parabenos.

Por otro lado en el 2003, Makino Tsunehisa y colaboradores ^[19] estudiaron los trastornos mamarios y trastornos en el tracto reproductivo femenino causado por los Disruptores endocrinos. Donde las muestras biológicas humanas sometidas para el ensayo fueron principalmente: (a) sangre del cordón umbilical, (b) sangre materna, (c) leche materna, y (d) ascitis. La medida, de las muestras (a) hasta (d) fue tomada simultáneamente de cada caso sujeto, Y también examinaron el gradiente de concentración entre los órganos internos *en vivo* de indicación sujetos individuales. Entre los Parabenos detectados se encontró presencia de metilparabeno en la sangre del cordón umbilical, ya que las mujeres expuestas migraron a través de su sangre a la leche materna y a la sangre del cordón umbilical.

En cuanto a la capacidad de los parabenos de interferir en la fertilidad masculina, existen pocos informes al respecto, sin embargo Oishi S. Lack 2004 ^[20], en sus estudios demuestran un efecto antiespermatogénico en ratas adultas alimentadas con los ésteres PP BP, mientras que con él EP y MP no se demostró ningún efecto; y Kang KS, Che JH, Ryu Dy en el 2002^[21] demostraron también el efecto antiespermatogénico en ratas cuyas madres habían sido alimentadas con butilparabeno.

Luego Ishiwatari, Suzuki, y colaboradores en agosto de 2006^[22], estudiaron los efectos del uso diario del MP en la piel humana. Las concentraciones de MP en el estrato córneo (SC) del antebrazo humano se midieron utilizando el método de copa Y GC MS después de las aplicaciones diarias de formulaciones que contienen MP. El estudio también investigó los efectos de la exposición a MP sobre queratinocitos in vitro. Los queratinocitos humanos normales y los equivalentes de piel se cultivaron en el medio que contiene MP. Se analizaron los siguientes cambios: capacidad de proliferación, células apoptóticas, cambios morfológicos, MRNA y expresiones de la proteína. Después de 1 mes de aplicaciones diarias de formulaciones que contenían MP, el MP permaneció sin metabolizar y persistió ligeramente en el SC. MP disminuyó la capacidad de proliferación de queratinocitos y cambió la morfología celular. MP también disminuyó las expresiones de la hialuronan sintasa 1 y 2 mRNAs y el colágeno tipo IV. Además, MP influyó en la diferenciación epidérmica de la piel equivalente. Estos resultados sugieren que la exposición de MP a través de la aplicación de formulaciones dermatológicas da lugar a la persistencia de MP Y la acumulación en el SC, y que MP podría influir en el envejecimiento y la diferenciación de queratinocitos como se muestra en la figura 4. Donde se muestra el cambio morfológico en NHEKs basado en el período de cultivo y tratamiento de MP. Donde las células se agrandaron y aplanaron, lo que es característico del envejecimiento celular por la adición de MP.

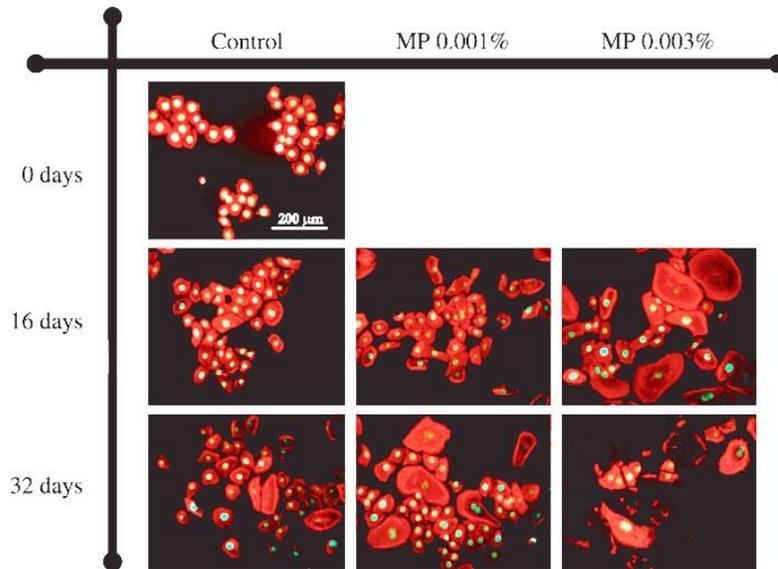


Figura 4. Cambios morfológicos inducidos por MP en NHEKs. La F-actina fue marcada por Alexa Fluor® 568 conjugada.

Mientras que Okamoto Yoshinori, Hayashi T. y colaboradores en el 2008, ^[23] estudiaron la activación del MP por irradiación de la luz solar natural y metabolismo esteárico hacia el daño oxidativo del ADN, para ello utilizaron dos fotoproductos principales, ácido p-hidroxibenzoico (PHBA) y metil 3-Hidroxi parabenos (MP₃OH). Como se muestra en la figura 5, donde se muestra la propuesta de secuencia de activación, en la cual el MP es absorbido percutáneamente y principalmente hidrolizado en PHBA y se excreta a través de la orina. Sin embargo, se produce un metabolito activo, que se produce por hidrolisis del éster metílico MP₃OH, el cual después de la irradiación de luz, reaccionó a su vez con una fracción microsomal (S9) de la piel. En el cual se observó daños distintos en el ADN, como reducción celular, estrés oxidativo en el ADN. Lo que puede causar daño en la piel que involucra carcinogénesis a través la activación de la irradiación solar y esterasas de la piel.

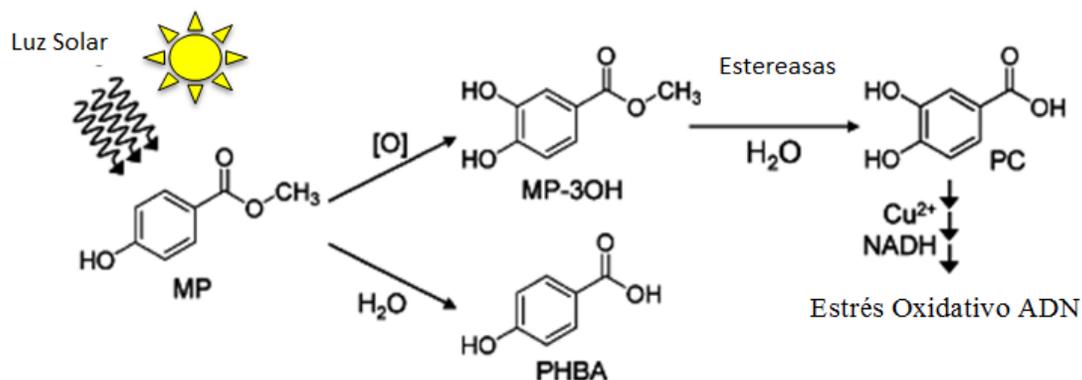


Figura 5. Activación combinada de MP por la irradiación solar y de la piel esterasas conducen hacia daño oxidativo del ADN.

La creciente incidencia de cáncer de mama es una incidencia importante en todo el mundo. Donde los principales agentes causantes del cáncer siguen sin explicarse, recientemente se ha discutido que el uso de cosméticos en especial los usados en las axilas, debido a que estos se aplican con frecuencia en un área directamente adyacente a la mama, lo cual tiene correspondencia con que las observaciones clínicas donde tienen una alta incidencia de cáncer de mama, fibroadenoma, y quistes mama en el cuadrante superior externo de la mama.^[24]

Es de este hecho en particular que Philipaa Darbre, ha venido realizando diversas investigaciones que los grandes fabricantes no comparten entre las más resaltantes que podemos mencionar tenemos^[24, 25, 26, 27, 28, 29]:

Darbre, Aljarrah, Miller y colaboradores en el 2004^[25], estudiaron las concentraciones de parabenos presentes en muestras de 20 tumores de mama humano mediante cromatografía líquida de alta presión seguido de espectrometría de masa. La concentración media de parabenos se encontró que era de $20,6 \pm 4,2$ ng por tejido. Donde la comparación individual de los parabenos se encontró el nivel más alto para el MP con un valor medio de $12,8 \pm 2,2$ ng lo cual representa alrededor del 62% del parabenos. Este estudio demuestra que se pueden encontrar parabenos intactos en el seno, lo que debería abrir camino para obtener más información sobre las cargas corporales de los parabenos y compararlas con tejidos mamarios normales.

Posteriormente en el 2008^[26], se publica una revisión de las investigaciones realizadas en los últimos años desde la publicación del 2004, en la cual se encontró parabeno intacto en los tejidos de cáncer de mama humano. Una de ellas se llevaron a cabo mediciones independientes en la orina humana, y se observó la descomposición por esterases. Esto se realizó a través de estudios no sólo *in vitro* sino también *in vivo* usando sujetos humanos sanos. Donde refleja que los parabenos también poseen andrógenos antagonista, que actúan como inhibidores de las enzimas sulfotransferasa y para poseer actividad genotóxica respectivamente.

En el 2012 Darbre, L. Barr Metaxas, y colaboradores^[27]. Determinaron las concentraciones de cinco ésteres del ácido p-hidroxibenzoico usando HPLCMS / MS, usando tejido mamario humano recolectado de 40 mastectomías para cáncer de mama primario en Inglaterra. Uno o más ésteres de parabeno eran capaces de cuantificarse en 158/160 (99%) de las muestras de tejido y en 96/160 (60%). Dentro de un seno y lugares similares en diferentes senos. Valores medianos globales en nanogramos por gramo de tejido para las muestras de tejido fueron más altos para 160 PP [16.8 (Rango 0 a 2052.7)] y MP [16.6 (rango 0.102,9)] ; los niveles fueron más bajos para n-butilparabeno [5.8 (Rango 0 a 95.4)], etilparabeno [3.4 (Rango 0 a 499.7)] y isobutilparabeno 2,1 (rango de 0 a 802,9). La fuente de parabeno no pudo ser identificada, pero el parabeno se midió en 7/40 pacientes entre 37 a 91 años, los cuales declararon no haber utilizado tantos cosméticos en su vida.

Posteriormente en enero del 2013, Philippa y Amelia K. Charles^[28], también estudiaron de qué manera las células MCF7 de cáncer de mama pueden aumentar su proliferación por la exposición con los cinco parabenos anteriormente analizados, ya sea solo o en combinación. Determinación de concentraciones sin efecto observado (NOEC), las concentraciones más bajo efecto observado (LOEC), CE 50 y CE 100 valores para la estimulación de la proliferación de las células MCF7 por cinco parabenos revelaron que 43/160 (27%) de las muestras de tejido de mama humano contenían al menos un parabeno en una concentración \geq LOEC y 64/160 (40%) $>$ NOEC. Es decir, que los parabenos, solos o en combinación, están presentes en el tejido mamario humano a concentraciones suficientes para estimular la proliferación de células MCF7 *in vitro*, y que las consecuencias funcionales de la presencia de parabeno en el tejido mamario humano debe ser evaluada sobre la base de todos los cinco parabenos y parabeno no solo individualmente.

En el 2014 se hace una revisión sobre las características del cáncer establecidas por Hanahan y Weinberg, considerando la evidencia de que los parabenos pueden contribuir con el desarrollo de células epiteliales en las mamas humanas de cuatro de las seis características básicas propuestas^[29]:

- 1- Los parabenos se encuentran presentes en el 99% de las muestras de tejido mamario, en concentraciones medibles en la mama, por lo que poseen actividad estrogénica.
- 2- Los parabenos pueden inhibir la supresión del crecimiento de células de cáncer de mama. Por hidroxitamoxifeno, ya que a través de la unión al receptor gamma relacionado con el estrógeno puede impedir su desactivación por inhibidores del crecimiento.
- 3- En un rango de 10 nM^{-1} - $1 \text{ }\mu\text{M}$, parabenos dan una evasión dependiente de la dosis aplicada en alto riesgo de donante células epiteliales de mama.
- 4- La exposición a largo plazo (> 20 semanas) a los parabenos conduce a un aumento y actividad invasiva en las células de cáncer de mama humano, es decir; las propiedades que están vinculados al proceso metastásico.

Es importante señalar que actualmente la investigadora Philippa Darbre, se encuentra realizando más investigaciones sobre la influencia de la aplicación de cosméticos en la incidencia del cáncer las cuales serán publicadas en el transcurso de este año.

Sin embargo en Julio del 2016, M. Angeles Lillo, Cydney Nichols y colaboradores^[30]. Ellos evaluaron los efectos fisiológicos que ocasiona la exposición de sustancias químicas que perturban el sistema endocrino (EDC) y generan susceptibilidad al cáncer de mama. Para ello expusieron células MCF-7 de cáncer de mama y un xenoinjerto derivado del paciente (PDX, receptor de estrógeno positivo) a niveles fisiológicos de MP, alrededor de ($4,4 \text{ }\mu\text{g}$ por día de MP) condujeron a un aumento de tamaño del tumor por lo cual el MP se ha pensado para ser un xenoestrógeno; Sin embargo, la exposición in vitro de 10 nM no logró MP aumentar MCF-7 proliferación celular o la inducción de genes canónicos sensibles a los estrógenos (PS2 y del receptor de progesterona), en contraste al tratamiento 17β -estradiol (E2). Las mamasferas derivadas de MCF-7 y PDX mostraron un mayor tamaño y una regulación positiva de marcadores de células ALDH1, NANOG, Oct4 y Sox2 madre cuando se expone a MP; estos efectos no se observaron para MDA-MB- 231 (ERU)N Mamasferas. Como se cree que las células que inician el tumor (TICs) también

son responsables de la quimiorresistencia, las mamasferas se trataron con tamoxifeno o con el fulvestrante anti-estrógeno puro en presencia de MP. En general, estos resultados sugieren que MP aumenta la proliferación de tumores de cáncer de mama a través de la actividad TIC mejorado, en parte a través de la regulación de la NANOG, y que MP aumenta la quimio resistencia modulando la actividad de las células madre.

1.4- Estudios electroquímicos y espectroscópicos para la determinación de Parabenos

Se han descrito varios métodos para la determinación y el estudio del comportamiento REDOX de los parabenos que incluyen, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)^[31,32,33,34,35], cromatografía líquida de ultra desempeño (UPLC)^[36,37], cromatografía líquida de ultra rápido desempeño (UHPLC)^[38], electroforesis capilar^[39,40,41], extracción miscelar y cromatografía de gases^[42], cromatografía de gases con detección de espectrometría de masas^[43,44], electrolisis^[45], espectrofotometría^[46], análisis multivariante^[47], y determinaciones voltamétricas^[45,47,48,49,50,51,52,53,54].

En cuanto a los antecedentes del uso de técnicas electroquímicas, N.Cabaleiro, I. de la Calle, C.Bendicho^[48], muestran la diferentes técnicas para la identificación y cuantificación de parabenos en cosméticos, colocando especial énfasis en la preparación de la muestra (dilución y homogeneización), los autores discuten diferentes técnicas de extracción utilizadas, entre las que podemos mencionar: dispersión de matriz en fase sólida, extracción en fase sólida micro dispersiva, microextracción en fase sólida con fibras, y en fase de extracción de fluido supercritico y a presión respectivamente.

Los autores una vez revisada cada una de las técnicas propuestas por referencias anteriores observan que algunos parabenos requieren calibración por adición estándar, debido a la naturaleza tan compleja de las matrices de las muestras que los contienen, se han reportado deterioros en las columnas cromatografías, por lo tanto se desea utilizar métodos adecuados para la extracción y eliminar interferencias de la matriz, pero sin perder la sensibilidad.

Los nanos materiales pueden contribuir a la consecución de estos objetivos, ya que estos se pueden utilizar en extracción de fase sólida (SPE), microextracción e incluso filtración. Nano materiales han mostrado una gran capacidad de extraer una variedad de

compuestos ya que sus superficies recubiertas con moléculas funcionales, polímeros partículas de mejorar la eficiencia y selectividad de preconcentración.

Keerti M. Naik, Sharanappa T. Nadibewoor ^[49], estudiaron un método electroanalítico para la determinación de parabenos en productos farmacéuticos y muestras de orina por medio de Voltametría cíclica, barrido lineal y Voltametría de onda cuadrada, utilizando un electrodo de Oro como electrodo de trabajo. La dependencia de la corriente sobre el pH, la concentración y la velocidad de barrido fueron investigadas, el pH óptimo fue de 7, en un rango de concentración de 0,04 a 1 mM, la corriente medida por voltamperometría de onda cuadrada presenta una buena propiedad lineal como una función de la concentración de MP con límite de detección 1,71 M y límite de cuantificación 5,70 M. Además, la reproducibilidad (RSD de 1,06%), la precisión (RSD de 1,27%) y exactitud (98,05 a 103,4%) del método se comprobaron también. A continuación se presentan las respuestas obtenidas:

En la figura 6, los autores atribuyen el pico anódico irreversible alrededor de 0,929 V, a la oxidación del MP y la presencia de un pequeño el pico catódico, correspondientes a la reducción de óxidos de Oro.

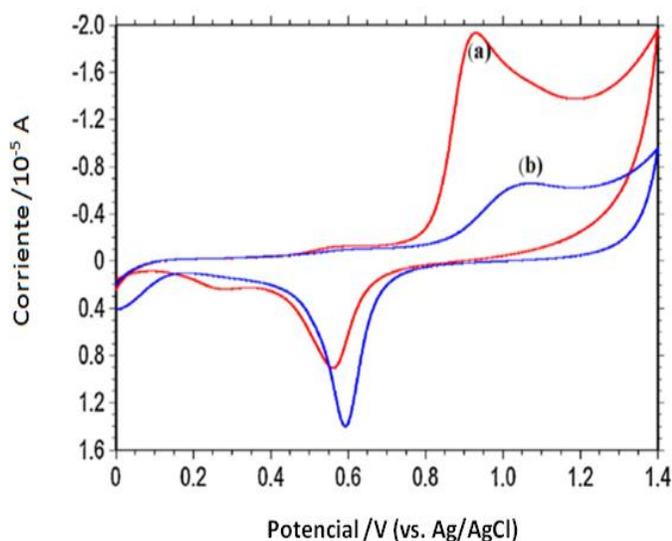
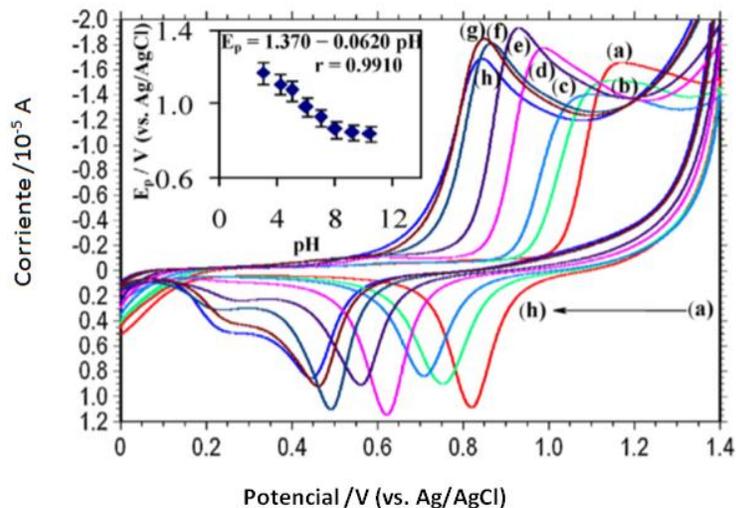


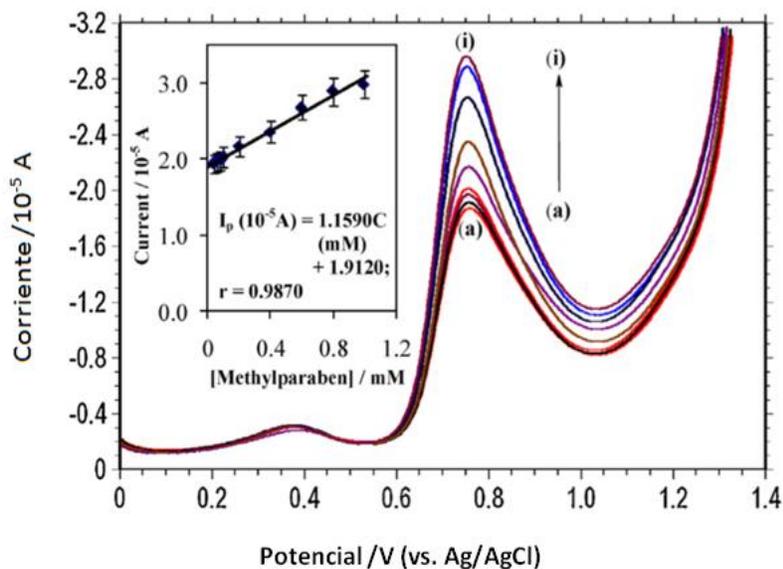
Figura 6. Respuesta de Voltametría cíclica para una solución 1mM MP en buffer de fosfato (pH 7.0, 0,2 M) (a) MP y (b) blanco a una velocidad de barrido de 50 mVs⁻¹.

Figura 7. Estudiaron el electro oxidación del MP 1,0 mM en un rango de pH de:(a) 3,0, (b) 4,2, (c) 5,0, (d) pH 6,0, (e) pH 7,0, (f) pH 8,0, (g) pH 9,2 y (h) 10,4, en una solución tampón de fosfato por Voltametría cíclica.



Se puede observar que el electrodo puede verse afectado por el pH del medio. Puesto que los picos de oxidación bien definidos aparecieron entre pH 3,0 y 10,4. Con el aumento de pH de la solución, el pico de potencial lineal desplaza a valores menos positivos y la relación lineal entre E_p y el pH.

Figura 8. Muestra los Voltagramas realizados por el método de Voltametría de onda cuadrada (SWV), utilizando el electrodo de trabajo de Oro, a diferentes concentraciones de MP en una solución buffer de fosfato, pH 7 (0,2 M): (a) 0,04 (b) 0,06 (c) 0,08, (d) 0,1 (e) 0,2 (f) 0,4 (g) 0,6 (h) 0,8 y (i) 1,0 mM. En los cuales se aprecia que la corriente de pico aumenta linealmente con el aumento de la concentración en ese intervalo de concentraciones.



Estos autores también realizaron una electrólisis durante 2 horas, en la cual estudiaron el comportamiento de MP 1mM en tampón de fosfato (0,2 M) a pH=7, antes y después de la electrólisis a través de espectroscopia UV con un pico máximo de absorción de 255,1 nm; como se puede observar en la Figura 9.

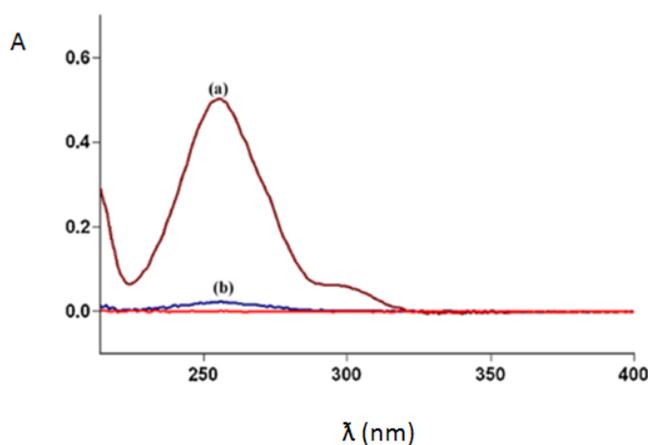


Figura 9. Espectro UV de MP 1 Mm en un buffer de fosfato pH 7 (0.2 M) (a) antes de la electrólisis y (b) después de la electrólisis.

Por otro lado, Eric de S. Gil, Carolina H. Andrade ^[50], también estudiaron el comportamiento REDOX de los parabenos y sus análogos por medio de Voltametría cíclica y química computacional, para ello utilizaron un electrodo de carbón vítreo, como electrodo

de trabajo. Los resultados figura 10, reflejan un solo pico anódico irreversible alrededor de 0,8 V, el proceso de oxidación muestra formas quinoínodica con gran dependencia del patrón sustituyente respectivamente.

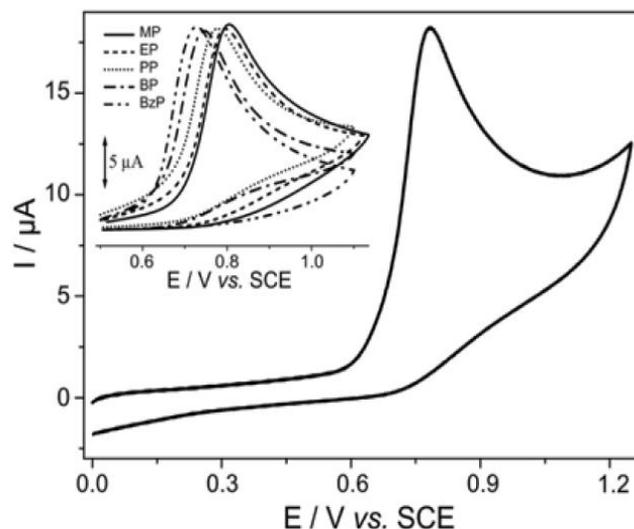


Figura 10. Voltagramas cíclicos obtenidos con electrodo de carbón vítreo en una solución de 0,1 M de buffer de fosfato pH 7, en soluciones 0,25 mM de los diferentes Parabenos (MP, EP, PP, BP, BzP) respectivamente. Los autores atribuyen los potenciales de pico anódico hacia valores menos positivos con el aumento de la longitud de la cadena en el sustituyente, debido a al carácter donador de electrones de los grupos alquilo, lo que facilita la oxidación.

A través de la química computacional estos autores pudieron estimar teóricamente la correlación entre los potenciales de oxidación (E°) y potenciales de ionización (IP), los cuales se muestran en la Figura 11, se observa una disminución en IP y E° con el aumento de la longitud de la cadena alquilo de los compuestos de parabenos, por ende el BzP y BP, son más fácilmente oxidados que el PP, PE y MP.

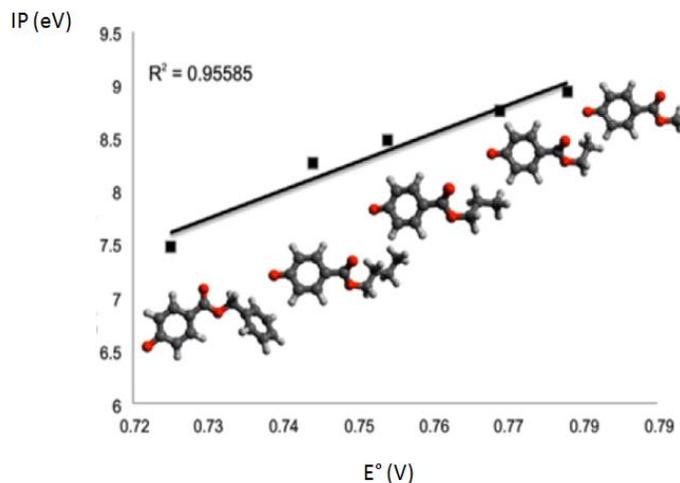


Figura 11. Gráfico de correlación entre los potenciales de oxidación (E°) y potencial de ionización (Ir) para los parabenos, calculado con OO-MP2/def2-TZVPP.

Otro estudio realizado sobre una superficie de un electrodo de carbón vítreo, fue realizado por Mohs en Saeed Behpoor, Masoum Azadeh Lalifar ^[51], ellos llevaron a cabo estudios electroquímicos de MP y PP mediante Voltametría cíclica (VC), cronocoulometría (CHC), Voltametría de barrido lineal (VSL) y calibraciones multivariante en productos cosméticos. Se realizó un diseño giratorio (CCRD) y la metodología de superficie de respuesta (RSM) los cuales se utilizaron para la optimización simultánea de parámetros efectivos sobre las respuestas voltamétricas de los dos analitos. Los valores óptimos de pH, velocidad de barrido, potencial de paso y altura de pico fueron: 7; 0,062 s⁻¹; 0,009 V y 0,07 V. La resolución se logró mediante mínimos cuadrados parciales. A continuación se muestran en la figuras 12 y 13, los resultados obtenidos en el estudio de optimización del método propuesto, donde se encontró que el método era aplicable para el análisis de rutina (pruebas de recuperación) de los conservantes en un producto cosmético.

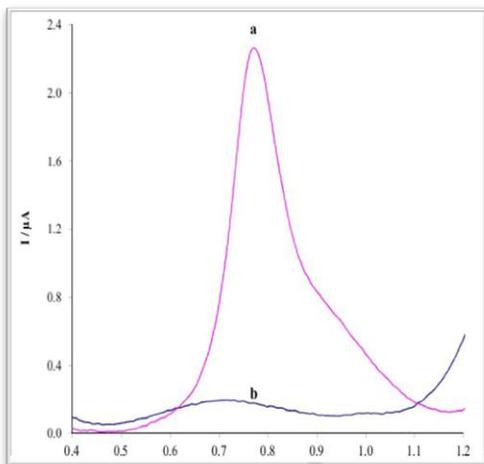


Figura 12. Voltagramas de pulso diferencial para un electrodo de carbón vítreo (GCE) y una solución buffer de fosfato (PBS, pH=7), en soluciones 200 μ M de (a) MP y (b) PP a una velocidad de barrido de 100 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$

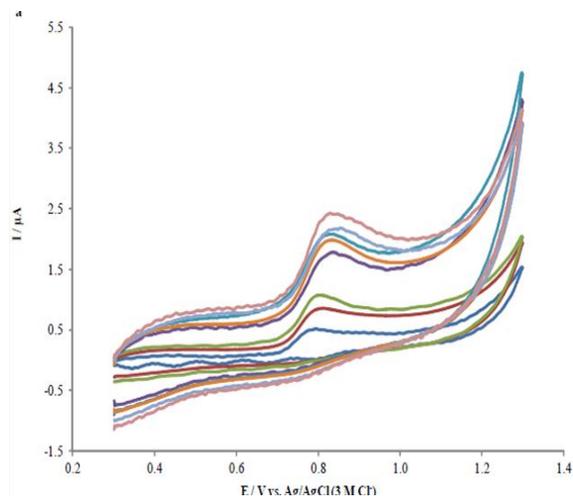


Figura 13. La Voltametría cíclica de 100,0 MP a velocidades de barrido de: 10,0; 30,0; 50,0; 70,0; 110,0; 130,0 y 150,0 mV s^{-1} , en presencia de 0,2 M PBS (pH = 7,0).

En ambas figuras se puede apreciar las respuestas de Voltametría de pulso diferencial (VPD), para la oxidación electroquímica de MP y PP en el electrodo de carbón vítreo, en el cual sólo muestran un pico en VPD. Por ende para poder determinar ambos compuestos se debe resolver sus picos y esto sólo se puede lograr acoplado la Voltametría con métodos quimiométricos.

Por otro lado, A. Hajian, J.Ghods, A.Afraz ^[52], describen el desarrollo de un biosensor para la determinación de MP, este biosensor se fabricó con pasta de carbono modificado con hemoglobina y nanotubos de carbono de múltiples paredes en presencia de peróxido de hidrogeno. El biosensor propuesto por estos autores, permitio determinar un rango de concentraciones de MP entre 0,001-0,013 mM, con limite de detección de 0,000025 mM, y sensibilidad de 0,00026 mA/mM . En la figura 14 se muestra la respuesta de voltametría de pulso diferencial del MP, la cual se obtuvo mediante la adición sucesiva de MP a la solución de tampón fosfato.

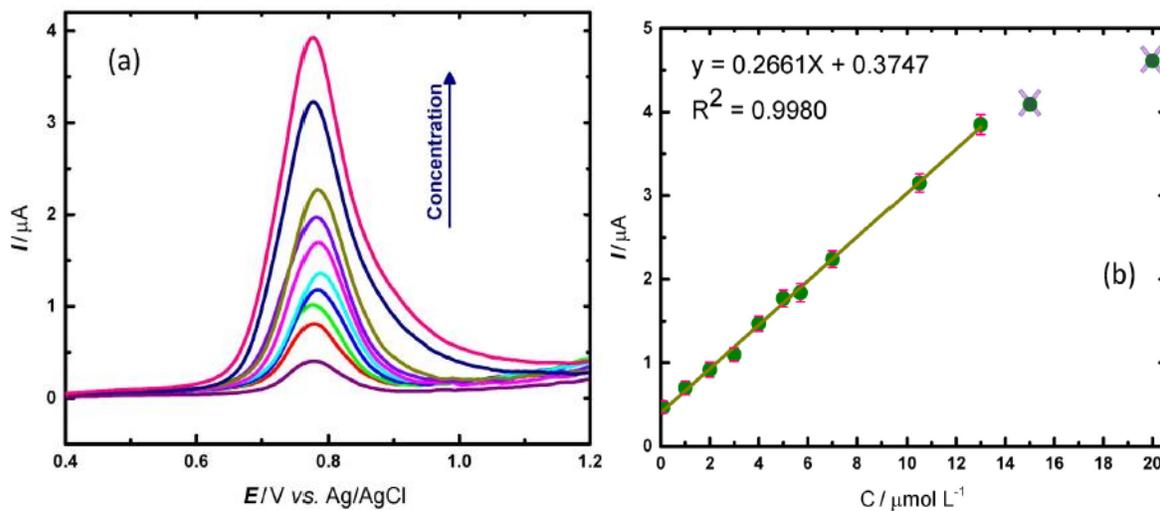


Figura 14. (a) Se muestra la Voltametría de pulso diferencial del MP, en la cual se observa como la corriente de oxidación aumentan con el aumento de la concentración del MP (b) Curva de calibración para el MP, donde se observa que las corrientes de pico son dependientes linealmente de la concentración de MP en rango investigado (0,001-0,013 mM).

En la figura 15, se ve la respuesta del biosensor expuesto a diferentes velocidades de barrido en un rango entre 10 hasta 1430 mV/s, en el cual se observa que la intensidad de corriente tiene un comportamiento lineal con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido respectivamente.

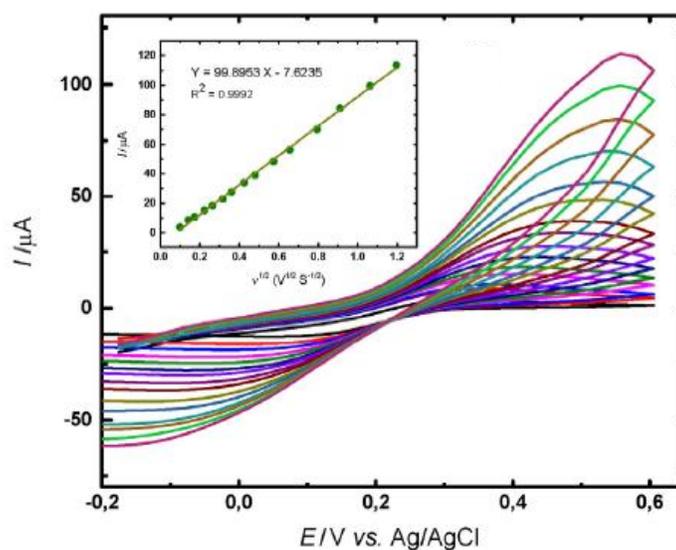


Figura 15. Respuesta de Voltametría cíclica del electrodo MWCNTs/Hb/CPE en una

concentración $1.0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ and 0.1 M KCl a diferentes velocidades de barrido desde 10 hasta 1430 mV/s .

En cuanto a los estudios espectrofotométricos, Saadiyah A. Dhahir, Huda.J. Hussein ^[53], utilizaron un método espectrofotométrico simple, económico y sensible para la determinación de MP puro y en dos muestras de jarabe ketofen y cyprodien, por medio de un proceso de diazotización de la muestra en el cual se utiliza, nitrito de sodio en medio ácido (HCl) a 5°C , seguido de un acoplamiento con ácido orto-amino benzoico para formar un complejo de acoplamiento oxidante de color naranja, estabilizado y medido en 442 nm obteniéndose los espectros de absorción de la figura 16, correspondientes al MP y al colorante azoico formado el cual obedece la ley de Beer, en un rango de concentraciones de $0,001\text{-}0,009 \text{ mg/mL}$, una absorptividad molar de $1,6 \cdot 10^6 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, sensibilidad de $0,00000095 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-1}$, el límite de detección (LOD) $0,0000065 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, y el límite de cuantificación fue de $0,00002 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$.

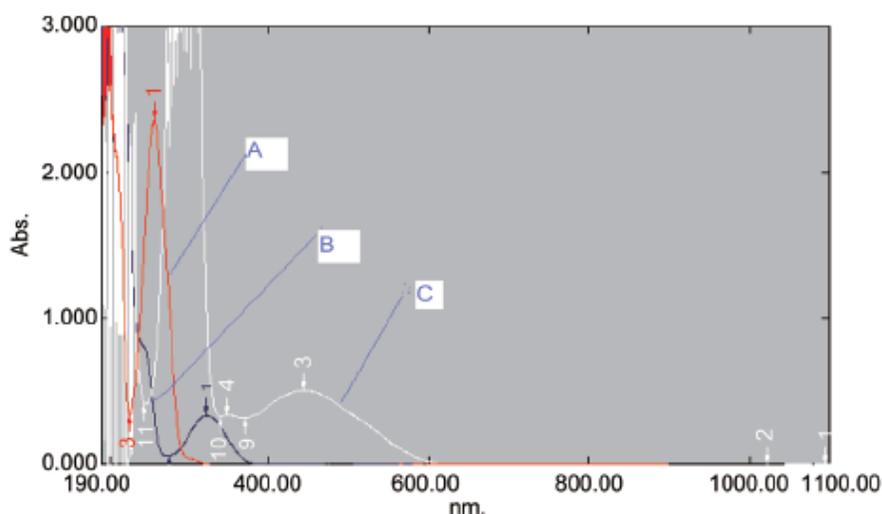
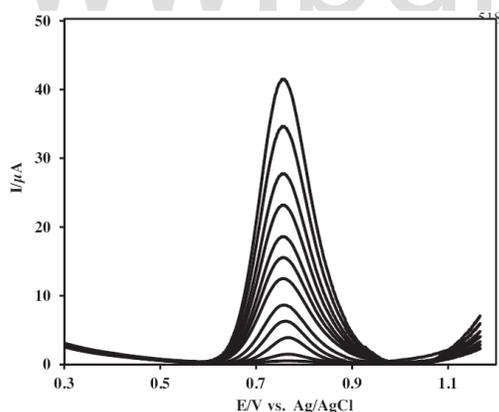


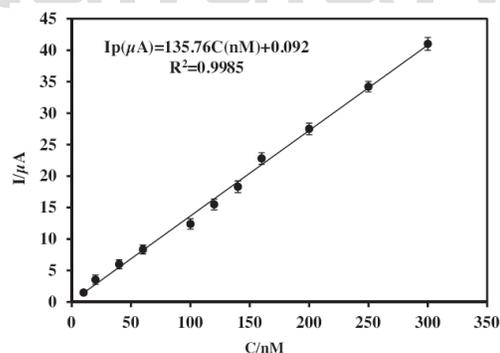
Figura 16. Muestra los espectros de absorción (a) metilparabeno versus agua destilada, (b) reactivo vs agua destilada, y (c) colorante azoico contra el blanco de reactivo.

Actualmente uno de los últimos estudios publicados en agosto del 2016 por, Aysegul Kutluay, Sehriban Duzmen y colaboradores ^[54], realizaron la de determinación voltamétrica de MP y su comportamiento con el ADN, usando una nueva plataforma basada en nanofibras de carbono y nanopartículas de cobalto, níquel y paladio, en muestras farmacéuticas, cosméticas y de orina. Utilizando el método de difracción (XRD) y la

espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR). El electrodo propuesto, (Co-Ni-Pd) NPs-CNFs / GCE, y se le aplicó al electrodo una reacción de MP. En comparación con otros electrodos, la plataforma voltamétrica propuesta (Co-Ni-Pd) NPs-CNFs / GCE, la cual exhibe mejor actividad electrocatalítica para el MP con un pico bien definido alrededor de 0,786 V. En la figura 17, se muestra los Voltagramas obtenidos del MP en un rango de concentraciones de 0,000003 a 0,0003 mM en una solución buffer de fosfato pH 7,0; donde se observa que las corrientes máximas fueron lineales con respecto a las concentraciones. La ecuación de regresión fue $I_{pa}(A) = 135,76 C(nM) + 0,002$ con un coeficiente de correlación de 0,9985. El límite de detección (LOD) se calculó como 1,2 nM. El electrodo propuesto presentaba buena reproducibilidad (RSD de 1,06%), alta precisión (RSD de 1,27%) y excelente precisión (98,05-103,4%) para MP. La plataforma de detección propuesta (Co-Ni-Pd) NPs-CNFs / GCE, se aplicó con éxito para cuantificar la MP en varios fármacos, cosméticos y muestras de orina. Una cuantificación tan sensible de MP hace este procedimiento de gran interés para el análisis de muestras para la atención sanitaria pública. Además, se demostró que la MP podría unirse al ADN, figura 18 a través de la intercalación con una constante de unión de $1,56 (\pm 0,25) \times 10^4$.



A



B

Figura 17. (a) Voltagramas de onda cuadrada de diversas concentraciones de MP en (Co-Ni-Pd) NPS-CNFs/GCE en 0,1 M PBS a pH 7. Frecuencia: 22 Hz. Amplitud: 50 mV/s. Concentraciones desde 0,000003-0,0003 mM. (b) Corriente de pico vs concentración de MP.

Capítulo II

2. PLANTEAMIENTOS DE INVESTIGACIÓN

2.1 JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

El metilparabeno se utiliza en todas las categorías de formulación de productos cosméticos, se ha reportado su uso en más de 13.200 formulaciones distintas. La investigación propuesta busca, mediante la aplicación de las técnicas electroanalíticas y espectroscópicas, presentar una metodología electroanalíticas como método alternativo, simple, de bajo costo, sensible y selectivo para el análisis de distintos productos cosméticos que contengan este conservante.

2.2 HIPÓTESIS

El metilparabeno en su estructura posee grupos funcionales electroquímicamente activos a la reacción de oxidación, lo cual permite desarrollar un método electroquímico para su determinación en diversas preparaciones cosméticas de polvos compactos.

2.3 OBJETIVOS

2.3.1 Objetivo general

Desarrollar una metodología para la determinación de Metilparabeno en productos cosméticos basada en el uso de la Voltametría.

2.3.2 Objetivos específicos

- Analizar el comportamiento del sistema por Voltametría cíclica, elección del electrodo de trabajo y la ventana de potencial de trabajo.
- Estudiar la respuesta de oxidación electroquímica del MP.
- Optimizar los parámetros inherentes al método de análisis propuesto.
- Aplicar la metodología propuesta en diversas presentaciones comerciales de productos cosméticos específicamente polvos compactos.
- Determinar los parámetros de calidad analíticos: precisión, límite de cuantificación, límite de detección y sensibilidad
- Contrastar el método propuesto, con una técnica de referencia basada en espectroscopia UV-Visible.
- Realizar estudios de recuperación del MP.

2.4 METODOLOGÍA

- Revisión bibliográfica continúa.
- Estudio de oxidación electroquímica del MP por Voltametría cíclica.
- Análisis preliminar del sistema en estudio: elección del electrodo de trabajo, electrolito soporte, y ventana de potencial.
- Examinar la técnica voltamétrica y la modalidad a utilizar (Voltametría de pulso diferencial).
- Consolidar y optimizar los parámetros instrumentales.
- Elaboración de curvas de calibración.
- Análisis de tres (3) presentaciones comerciales de polvos compactos.
- Correlación del método propuesto con una técnica de referencia basada en espectroscopia UV-visible.

2.5 CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Revisión Bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X		
Entrenamiento en equipo y estudios preliminares del sistema electroquímico	X	X								
Preparación del seminario I	X	X								
Presentación del seminario I							X			
Optimización de los parámetros experimentales	X	X								
Estudio electroquímico del sistema en investigación		X	X	X	X	X				
Presentación del seminario II								X		
Defensa de tesis										X

Capítulo III.

3. TÉCNICAS INSTRUMENTALES

El estudio electroquímico se fundamenta básicamente en la observación de los procesos REDOX originados en una celda electroquímica, que se define como un sistema compuesto de fases conductoras de carga cuyo funcionamiento se basa en la generación de energía eléctrica o para la formación o descomposición de un compuesto químico deseado, en donde el interés de estudio es la actividad generada en la interfase que se da cuando un electrodo entra en contacto con una solución que posee un elemento electroactivo, a dicho electrodo se le asigna el nombre de “**electrodo de trabajo**” y el control de dicho proceso electroquímico se lleva a cabo de un potencial o corriente aplicada y un electrodo que genera un interface de composición bien definida y estable, el cual se denomina “**electrodo de referencia**”. [55]

Las técnicas que fundamentan al estudio electroquímico son las Técnicas Voltamperométricas, las cuales se basan en la respuesta corriente-potencial de un electrodo polarizable inmerso en una solución denominada analito. En estas técnicas, se estudian los cambios de corriente, como una función del potencial aplicado a través de la celda electrolítica. El proceso involucra la electrólisis de una o más especies electroactivas, permitiendo observar con mayor detalle la reacción de la especie electroactiva en el electrodo y mecanismo de transferencia de masa.

3.1 Voltametría

Históricamente, la Voltametría se desarrolló a partir de la polarografía en 1922 por el químico checoslovaco Jaroslav Heyrovsky. Posteriormente Matherson y Nichols desarrollaron los métodos de barrido rápido de potencial, Voltametría de barrido lineal y Voltametría cíclica, técnicas que fueron descritas teóricamente por Randles y Sevcik, lo cual constituyó un avance importante en el desarrollo de los métodos electroanalíticos. Actualmente se han desarrollado numerosas técnicas voltamétrica de gran sensibilidad con grandes aplicaciones en diversas áreas de la ciencia y la tecnología. [56]

La Voltametría, se basa en aplicar una señal de excitación a un electrodo de trabajo situado en una celda electroquímica que contiene un medio electrolítico. Dicha señal es sencillamente un potencial variable y la respuesta del electrodo es una intensidad de corriente determinada. La velocidad de oxidación y reducción del analito está limitado por la velocidad de transferencia de masa del analito a la superficie del electrodo. Dentro de las principales aplicaciones de la Voltametría tenemos:

- Procesos de oxidación y reducción en diversos medios.
- Procesos de adsorción en superficies.
- Mecanismos de transferencia de electrones en superficies de electrodo modificadas químicamente.

Dependiendo del tipo de señal de excitación se originan las diferentes técnicas voltamétrica: Voltametría de barrido lineal, Voltametría cíclica, Voltametría de pulso normal, Voltametría de pulso diferencial, Voltametría de onda cuadrada, Voltametría de preconcentración y redisolución.

3.1.1 Voltametría cíclica ^[57,58]

La variación de un potencial en un electrodo estacionario colocado en una disolución no agitada está provocada por una señal de forma triangular. El potencial se varía linealmente desde E_0 hasta E_f , cuando se ha alcanzado este valor el sentido de barrido se invierte y el potencial vuelve a su valor original E_0 figura 18, este ciclo de excitación puede ser repetido cuantas veces lo requiera la experiencia.

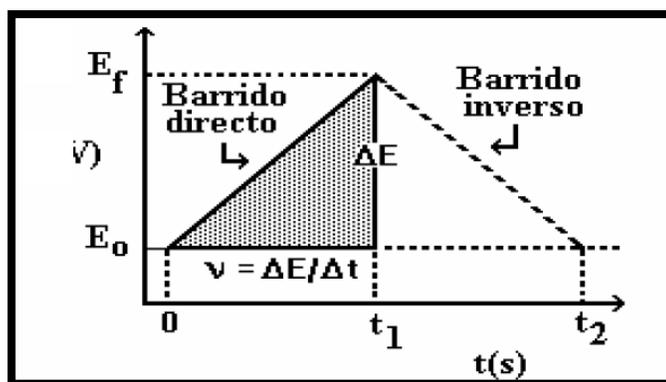


Figura 18. Señal de excitación empleada en Voltametría cíclica.

El intervalo de potenciales seleccionado para un experimento dado es aquel donde ocurre la oxidación o la reducción de la especie en estudio. El registro de la respuesta a la perturbación, se obtiene al graficar la corriente leída al potencial asociado, en una curva del tiempo $E=f(i)$, está se denomina Voltagramas o voltamperograma el cual se puede apreciar en la siguiente figura:

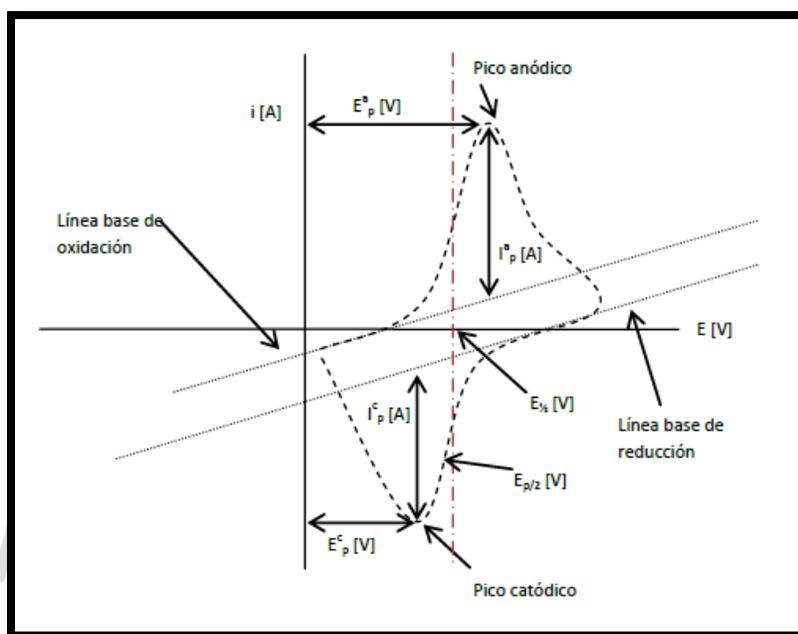


Figura 19 . Voltagramas Cíclico de acuerdo al convenio planteado por la IUPAC

Los parámetros más importantes de un Voltagramas cíclico son:

1. Intensidad de corriente de pico anódica (I_p^a)
2. Intensidad de corriente de pico catódica (I_p^c)
3. Potencial de pico catódico (E_p^c)
4. Potencial de pico anódico (E_p^a)

Esta técnica es una de las más utilizada para analizar y estudiar el comportamiento redox de las especies, de las reacciones químicas en que participan (mecanismos de reacción, reacciones químicas acopladas), en la determinación de parámetros termodinámicos y el estado o limpieza del electrodo utilizado.

A continuación se explica con detalle los procesos y criterios de reacciones en un sistema electroquímico:

3.1.1.1 Sistemas Reversibles^[57]

La velocidad de transferencia electrónica es más grande que la velocidad de transferencia de masa y por lo tanto, se mantiene el equilibrio Nernstiano en la superficie del electrodo figura 19. Este tipo de proceso se encuentra regido por la ecuación de Randles- Sevcik:

$$I_p = 2,69 * 10^5 n^{3/2} A C_0 D_0^{1/2} v^{1/2} \quad (ec. 1)$$

Dónde:

- n : es el número de electrones transferidos
- A : es el área superficial del electrodo (cm^2)
- C_0 : concentración de la especie electroactiva (mol/cm^3)
- D_0 : coeficiente de difusión de la especie electroactiva (cm^2/s)
- v : velocidad de barrido en (mV/s)

Los criterios que se deben cumplirse para que un sistema sea considerado reversible son los siguientes:

- $\Delta E_p = E_p^C - E_p^A = \frac{59}{n} \text{ mV} \quad (ec. 2)$

- $|E_p - E_{p/2}| = \frac{56,6}{n} \text{ mV} \quad (ec. 3)$

- $\frac{I_p^A}{I_p^C} = 1 \text{ si } C_0^A = C_0^C \quad (ec. 4)$

- $I_p \propto v^{1/2} \quad (ec. 5)$

- E_p es independiente de v

3.1.1.2 Sistemas irreversibles^[57]

Este tipo de procesos ocurre cuando la transferencia electrónica es insuficiente como para mantener el equilibrio de Nernst en la superficie del electrodo, por lo que la forma del Voltagramas varía, como se puede apreciar en la figura 20

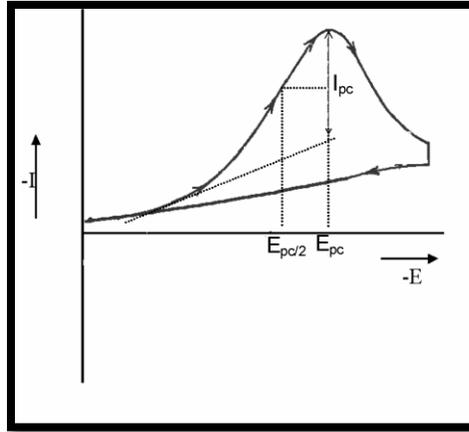


Figura 20. Voltograma cíclico para un sistema redox irreversible.

Para especies irreversibles la ecuación de Randles-Sevcik se modifica debido a la corrección de términos cinéticos:^[57]

$$I_p = 2,69 * 10^5 \alpha^{1/2} A C_0 D_0^{1/2} \nu^{1/2} \quad (ec. 6)$$

Donde, α es el coeficiente de transferencia electrónica.

Para un sistema irreversible se deben cumplir los siguientes criterios:

- $|E_p - E_{p/2}| = \frac{47,7}{\alpha} \text{ mV} \quad (ec. 7)$

- $i_p^A \propto \nu^{1/2} \quad (ec. 8)$

- No existen picos inversos

- E_{pc} independiente de $\nu^{1/2}$

- E_{pc} se desplaza $\frac{30 \text{ mV}}{\alpha c n c}$

3.1.1.3 Sistemas cuasi-reversibles^[57]

Matsuday y Ayabe, definieron el término cuasi-reversible para las reacciones que muestran limitaciones cinéticas de electro transferencia (proceso de transferencia electrónica muy lento), el voltograma característico de un sistema cuasi-reversible se muestra en la figura 21.

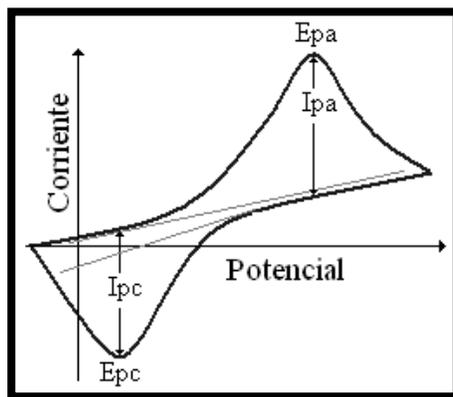


Figura 21. Voltagramas cíclico para un sistema cuasi-reversible.

Si el proceso es cuasi-reversible se debe cumplir:

$$I_p = 2,69 * 10^5 n^{\frac{1}{2}} A C_0 D_0^{\frac{1}{2}} v^{\frac{1}{2}} (K, \alpha) \text{ (ec. 9)}$$

Donde, K depende de la variación de (Λ, α) vs Λ a diferentes valores de α .

- $\frac{I_p^A}{I_p^C} = 1$ si $\alpha_c = \alpha_A = 0,5$ (ec. 10)
- $\Delta E_p > \frac{59}{n} mV$ (ec. 11)
- E_p^C se desplaza hacia valores negativos cuando incrementa v

3.2 Voltametría de Pulso Diferencial (VPD)^[58,59]

Es una de las técnicas electroanalíticas con mayor popularidad alrededor de 1970. La señal de excitación impuesta al electrodo de trabajo consiste en un tren de pulsos de forma escalonada en el que el potencial inicial que se aplica varía gradualmente con el tiempo y la corriente que se registra en función del tren de pulsos de potencial aplicado es el resultado de la diferencia de las corrientes que se miden antes de la aplicación del pulso y al final del pulso.

En esta técnica no se utiliza un barrido lineal de potencial. En lugar de ello, se aplica una rampa de potencial con las siguientes características:

- La aplicación de un potencial constante durante un intervalo de tiempo relativamente amplio ($0,5 \leq t[s] \leq 4,0$).
- Después de este tiempo, se impone un nuevo pulso de potencial ($10 \leq t[mV] \leq 100$) superior al anterior por un intervalo de tiempo muy pequeño ($5 \leq t[ms] \leq 100$).
- Al término de este tiempo se regresa a un potencial superior al de inicio para comenzar otro nuevo ciclo.

En la figura 22 se muestra la rampa de potencial aplicada para esta técnica con respecto a línea de avance de potencial, y la respuesta típica de esta Voltametría.

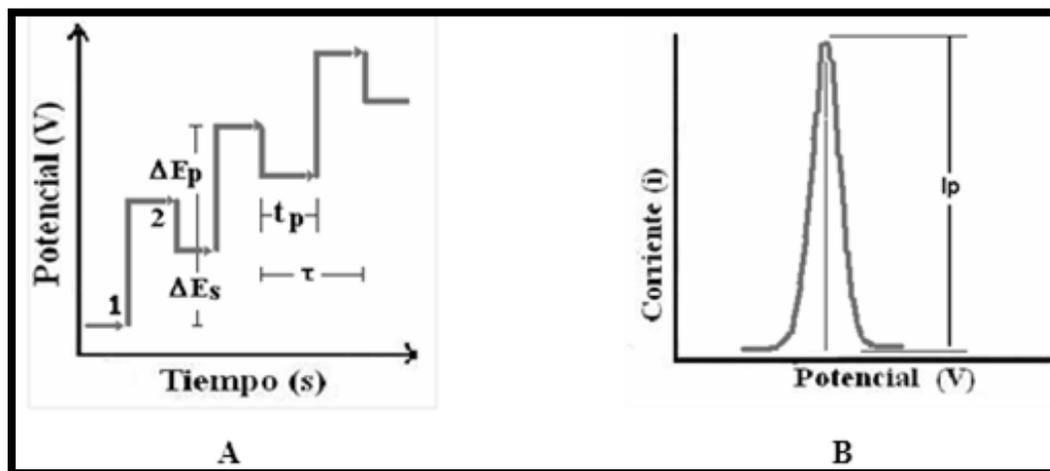


Figura 22. (A) Señal de excitación en VPD y (B) respuesta típica en VPD

La disminución de la línea base en el voltamperograma se entiende como el resultado de las diferentes velocidades de respuesta entre la corriente capacitiva y la farádica con respecto al potencial aplicado. Cuando un potencial base es mucho menor al requerido para que se lleve a cabo la reacción electroquímica, la electrólisis presente es despreciable, por lo que la corriente obtenida es prácticamente debida a la carga de la doble capa. Después de un tiempo t' , el potencial es cambiado bruscamente a un valor E , mayor al anterior, lo cual provoca que tanto la corriente capacitiva como la faradéica aumenten; sin embargo, durante el tiempo que dura el pulso, la corriente no faradéica disminuye de forma muy rápida en comparación con la corriente debida a la reacción electroquímica. Esto provoca que en las cercanías del fin del pulso la mayor parte de la corriente observada justo antes del pulso y aquella justo antes de que termine el aporte de la corriente capacitiva. Este proceso se puede describir mediante la siguiente figura 23:

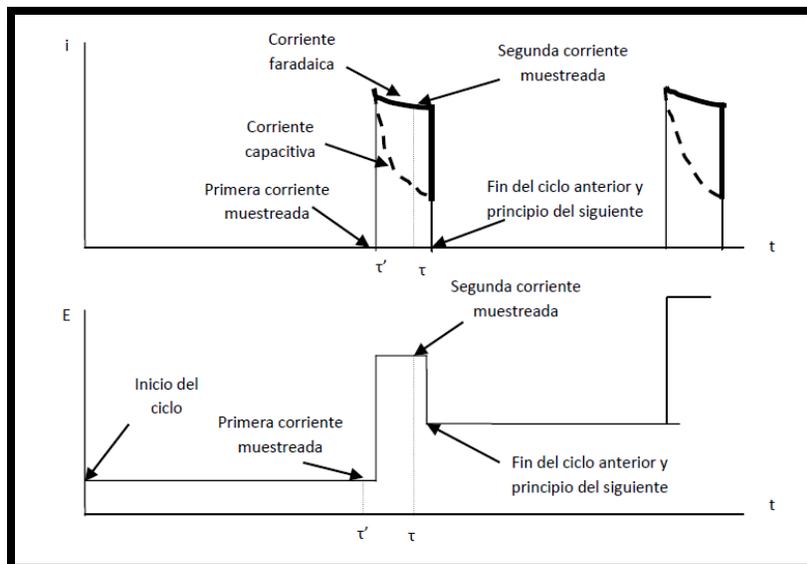


Figura 23. Esquema de un ciclo en una Voltametría diferencial de pulsos.

Una respuesta típica de este tipo de Voltametría figura 22.B, en donde se observan tres zonas principales que se asocian a diferentes etapas en la reacción electroquímica:

1. Cuando el potencial aplicado es muy inferior al $E0'$ de la reacción electroquímica al igual que el pulso de potencial aplicado, como consecuencia de esto no se genera un aumento considerable en la corriente.
2. Cuando el potencial aplicado se encuentra alrededor de $E0'$, el pulso de potencial sí favorece la reacción electroquímica por lo que se genera un brusco aumento del valor absoluto de la corriente.
3. Una vez que se llega a valores de potencial donde la reacción electroquímica se lleva a cabo en su máxima velocidad, la corriente generada es prácticamente constante a cualquier potencial, por lo que en el Δi se presenta un valor constante y cercano a cero.

Dicho proceso se encuentra regido por la expresión teórica, según Parry y Osteryoung como:

$$I_p = \frac{nFACD^{1/2}}{\pi^{1/2}(t'-t)^{1/2}} \frac{(1-\theta)}{(1+\theta)} \quad (\text{ec.12})$$

$$\Theta = \exp [nF (\Delta E_p)/2RT] \quad (\text{ec.13})$$

$$E_p = E_{1/2} - (\Delta E_p/2) \quad (\text{ec. 14})$$

Donde:

- **n** : número de electrones transferidos
- **A** : área superficial del electrodo (cm^2)
- **D**: coeficiente de difusión de la especie electroactiva (cm^2/s)
- **C**: concentración de la especie electroactiva (mol/cm^3)
- **t'** : tiempo de la primera corriente muestreada por pulso (s)
- **t** : tiempo de la segunda corriente muestreada por pulso (s)

3.2.1 Ventajas de la Voltametría Diferencial de Pulso ^[60]

Los valores de corriente se miden solamente al final del período

Se maximiza mediante el uso de un pulso de potencial

Se pueden discriminar entre las corrientes de carga y las corrientes faradaicas y se eliminan la mayor parte de la corriente de fondo

Tiene alta sensibilidad y límites de detección entre 1×10^{-7} y 1×10^{-8} M y picos agudos por lo que es selectivo

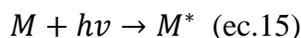
Permite discriminar los efectos de adsorción sobre la superficie del electrodo

3.3 Espectroscopia ultravioleta-visible (UV-VIS) ^[61,62]

La espectrofotometría de absorción molecular ultravioleta visible, comúnmente llamada espectrofotometría UV-VIS, tiene una larga y continua historia en el campo de la química analítica. Esta técnica está basada en la medición de absorción de radiación UV o visible por determinadas moléculas. Las características de este tipo de espectroscopia se pueden aplicar a sistemas orgánicos e inorgánicos, límites de detección bajos, selectividad de

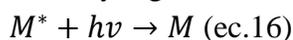
moderada a alta, buena exactitud, permite mediciones y adquisición de datos simples. [61]
 La radiación correspondiente a estas regiones del espectro electromagnético provoca transiciones electrónicas a longitudes de ondas características de la estructura molecular de un compuesto. La absorción de radiación UV-Visible proviene de los electrones de la especie, atómica o molecular y se puede considerar que es un proceso en dos etapas:

- Excitación electrónica, de acuerdo con la ecuación

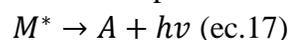


- ✓ Relajación de la especie excitada, M^* , cuyo tiempo de vida media es normalmente de muy corta duración (10^{-8} - 10^{-9} s), que puede ocurrir por uno o varios mecanismos:

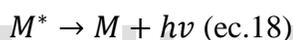
- a- Relajación con generación de calor y regeneración de la especie:



- b- Relajación con descomposición de la especie o reacción fotoquímica,



- c- Relajación con emisión de radiación fluorescente o fosforescente,



Las transiciones electrónicas posibles pueden ser tres:

- ✓ Electrones π , σ (enlazantes) y n (no enlazantes); para especies moleculares.
- ✓ Electrones d y f , para iones y complejos.
- ✓ Electrones de transferencia de carga.

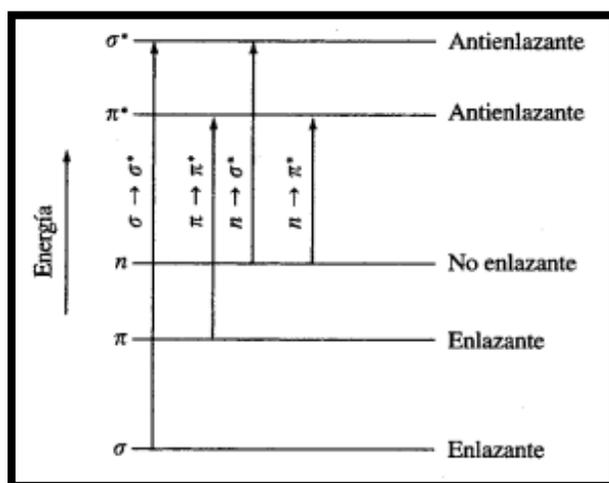


Figura 24. Transiciones electrónicas entre orbitales moleculares

La espectroscopia UV-Visible permite la identificación proximal de los grupos funcionales en una molécula, proporciona información sobre el tamaño y la estructura de la parte conjugada de la molécula. Es un método bastante selectivo para el análisis cuantitativo de compuestos cuyos enlaces producen absorción.

El instrumento utilizado para realizar espectroscopia de UV-Visible se denomina espectrofotómetro figura 25, el cual tiene una fuente que emite todas las frecuencias de luz UV. La luz pasa a través de un monocromador, que utiliza una red de difracción o un prisma para dispersar la luz descomponiéndola en un amplio espectro y seleccionar una longitud de onda. Esta única longitud de onda de luz se divide en dos haces, un haz pasa a través de la celda de muestra y el otro a través de la celda de referencia (disolvente). El detector mide constantemente la relación intensidad entre el haz de referencia y el haz de la muestra. Mientras el espectrofotómetro explora las longitudes de onda en la región UV, un registrado hace el gráfico (espectro) de la absorbancia de la muestra en función de la longitud de onda.

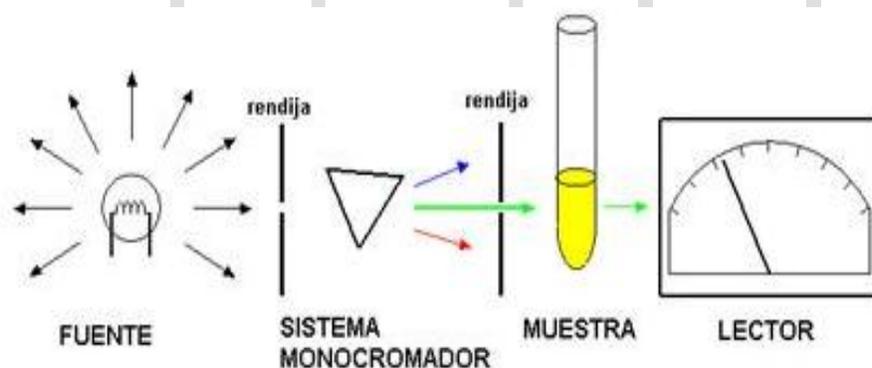


Figura 25.Partes básicas de un espectrofotómetro de absorción.

La fuente de luz en un espectrofotómetro por lo general es una lámpara de tungsteno de bajo voltaje, la cual emite en forma continua una región del espectro, la intensidad de esa radiación varía de forma gradual con la longitud de onda. Los monocromadores tiene como componentes principales una ranura de entrada, un elemento que dispersa la luz en sus longitudes de onda componentes (en general una red de difracción), y una ranura de salida que permite seleccionar la longitud de onda deseada, la cual permite que sólo una banda estrecha de éstas pueda pasar a través de la muestra.^[63]El detector es un fototubo que

se utiliza para convertir la señal luminosa en señal eléctrica, y así transmitir informaciones al procesador de señal, el cual permite efectuar lecturas de transmitancia y absorbancia. En los espectrofotómetros de doble haz, la luz de un solo o de dobles monocromadores se enfoca a través de una referencia y compartimiento de muestra. La intensidad de estos dos haces de luz es medida por cualquiera de los dos detectores, y el haz de la muestra se compara con el haz de referencia proporcionalmente. Esta proporción puede ser alimentada a un metro o directamente en un instrumento registrador.

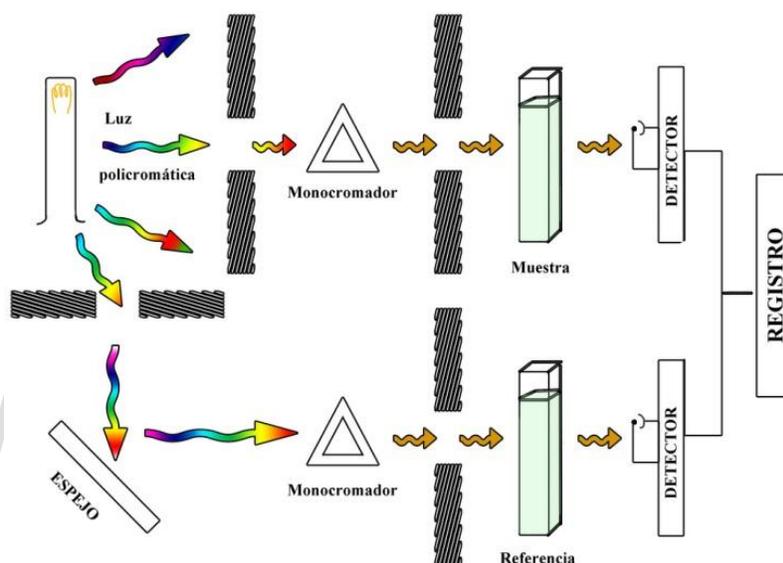


Figura 26.Diagrama esquemático del aparato usado para métodos analíticos basados en la absorción de energía radiante (configuración de doble haz).

El procedimiento para llevar a cabo cualquier análisis cuantitativo a través de la espectroscopia UV- Visible es: ^[61]

- 1- Seleccionar la longitud de onda para la medición: Si se desea la más alta sensibilidad se elige una longitud de onda correspondiente a un pico máximo.

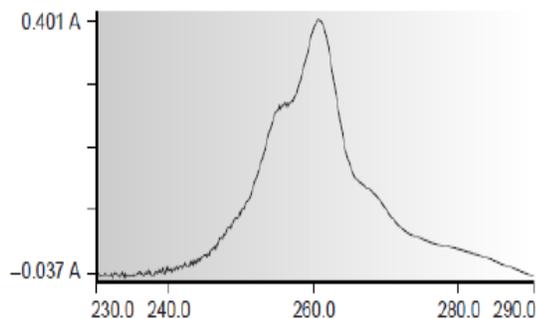


Figura 27. Pico máximo de absorción de un espectro UV- Visible

- 2- Se debe verificar el cumplimiento de la ley de Lambert-Beer: Existen variables que influyen en la absorbancia como por ejemplo: el tipo de disolvente, pH de la solución, temperatura, sustancia interferentes.
- 3- Selección del rango de concentraciones para la medición con menor error.

3.3.1. Ley de Lambert-Beer^[64]

La Ley de Lambert-Beer, considera la relación entre la potencia de la luz incidente y la de la transmitida, en función tanto de la longitud de paso óptico como de la concentración de la especie absorbente, esta ley permite corregir la dependencia de la concentración y otros factores operacionales al comparar distintos compuestos y sirve como base de todas las determinaciones cuantitativas prácticas. Esta ley combinada puede expresarse matemáticamente como:

$$\log \frac{P_o}{P} = kbc \quad (ec. 19)$$

Donde k es una constante de proporcionalidad, b la longitud de paso óptico y c la concentración. La cantidad $\log (P_o/P)$ se define como absorbancia y se representa por el símbolo A , así:

$$A = a \times b \times c \quad (ec. 20)$$

Siendo a una constante de proporcionalidad llamada absortividad, la cual es un coeficiente característico de la sustancia absorbente a cada longitud de onda. La magnitud de a dependerá de las unidades empleadas para b y c .

Cuando la concentración se expresa en moles por litro y la longitud de la celda en centímetros, la absortividad se llama absortividad mola y se designa como ϵ y tiene unidades de $\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, entonces la absorbancia es:

$$A = \epsilon \times b \times c \text{ (ec. 21)}$$

Por otro lado tenemos que al incidir sobre la materia un haz de luz electromagnética este sale con menor energía que la que entro por lo tanto la materia absorbe energía, por ende podemos relacionar la absorbancia con la transmitancia de la siguiente manera:

$$A = \text{Log } 1/T \text{ (ec. 22)}$$

$$\% T = 100.I/I_0 \text{ (ec. 23)}$$

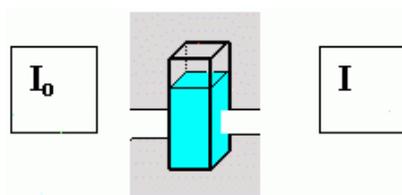


Figura 28.Absorbancia transmitancia

3.3.2 Limitaciones propias de la ley de Beer^[65]

- Es una ley limite (<0.01 M)
- A concentraciones mayores >0.01 M la distancia promedio entre las especies disminuye hasta el punto en que cada una afecta la distribución de carga de sus vecinas alterando la capacidad de absorción a una λ
- Desviaciones químicas: Asociaciones, disociaciones o reacciones del analito generando una molécula con diferente ϵ
- Desviaciones instrumentales: radiación policromática, y radiación parásita.

Capítulo IV

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1- Reactivos

Los reactivos utilizados se pueden apreciar en la tabla III, sin tratamiento previo. Todas las soluciones fueron preparadas con agua ultrapura 18 M Ω y desgasificadas con N₂ antes de cada experimento por 5 min.

Tabla III. Especificación de los reactivos a utilizados

Nombre	Formula	Marca	Pureza (%)
Metilparabeno	C ₈ H ₈ O ₃	Merck	99,9
Ácido Sulfúrico	H ₂ SO ₄	Fluka	98
Fosfato monobásico de potasio	KH ₂ PO ₄	Merck	98
Fosfato dibásico de sodio	Na ₂ HPO ₄	Scharlau	99
Metanol	CH ₃ OH	Fluka	99,9
Ácido 2-aminobenzoico	C ₇ H ₇ NO ₂	Merck	98
Nitrito Sódico	NaNO ₂	Merck	99,9
Hidróxido de Sodio	NaOH	Riedel-de Häen	98
Ácido Clorhídrico	HCl	Riedel-de Häen	98
Nitrógeno	N ₂	AGA	UAP
Cloruro de potasio	KCl	J.T Baker	99
FORMULACIONES COSMETICAS			
WINCOLOR		10 g	
AR		10 g	
PONDS		10 g	

3.1.1 Limpieza del material de vidrio

La limpieza del material se realizó, lavándolo con agua y jabón, posteriormente se sumergió en una solución de HNO_3 15% durante una noche, luego se lavó con abundante agua destilada y finalmente, se curó con agua ultrapura $18 \text{ M}\Omega$.

3.2 MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

La celda electroquímica fue montada con un sistema de tres electrodos convencional, como se representa en la figura 29, como electrodo de trabajo, se utiliza un el electrodo de carbón vítreo (CV), cuidadosamente pulido a espejo con alúmina $0,3 \mu\text{m}$, y sometido a ultrasonido por 5 minutos y lavado con agua ultrapura de $18 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$. Un electrodo de Ag/AgCl (KCl sat) como referencia, y un alambre de platino como el contraelectrodo, el cual fue previamente flameado para su limpieza, como se aprecian en la figura 30.

Todos los experimentos electroquímicos se realizaron en un buffer fosfato $0,2 \text{ M}$ ($\text{pH}=7$) a temperatura ambiente. Usando un sistema electroquímico modular Potenciostato/Galvanostato (AutoLab-PGSTAT20), y la para el análisis por medio de la técnica de espectroscopia UV-Visible, se utilizó un espectrofotómetro Marca Perkin-Elmer modelo lambda 25 de doble haz, acoplado a un sistema computarizado y controlado mediante el software *UV WinLab*, los cuales se aprecian en la figura 31.

En cuanto a las graficas y análisis estadístico se llevaron a cabo mediante la ayuda de OriginPro versión 8.0, y Microsoft Excel 2012.

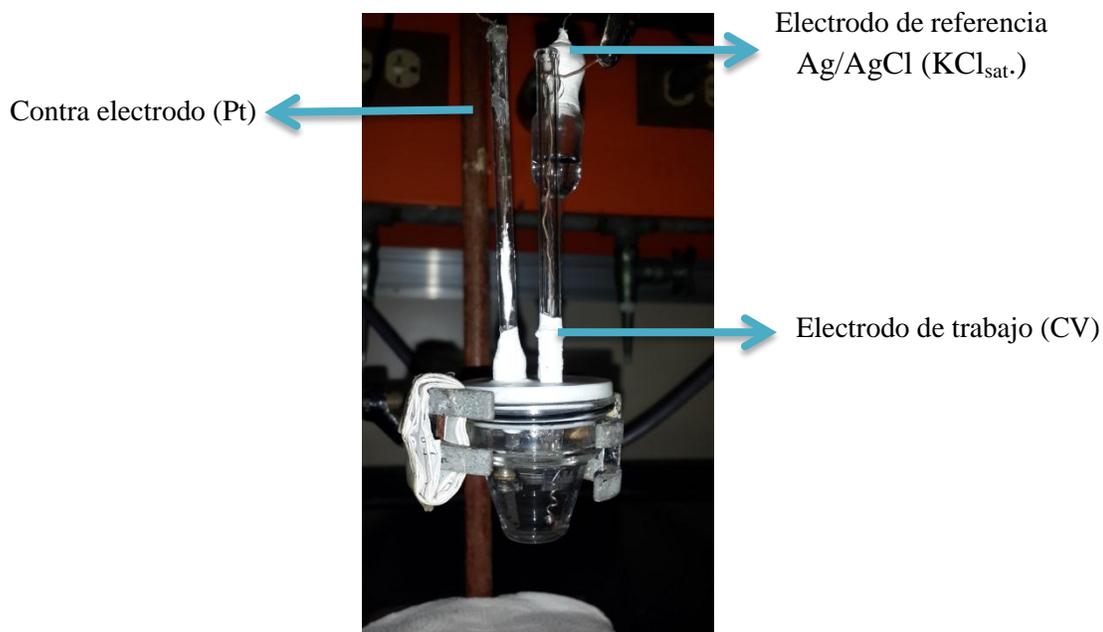


Figura 29. Esquema de la celda electroquímica



A

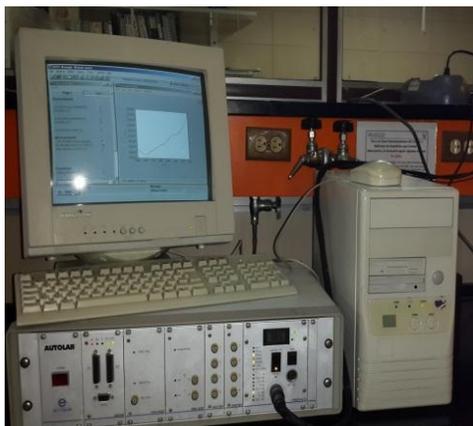


B



C

Figura 30. Celda y electrodos empleados para el estudio electroquímico: (a) Celda de vidrio de un compartimiento (b) Electrodos (c) Electrodo de carbón vítreo empotrado en vidrio.



A



B

Figura 31. (A) Potenciostato/Galvanostato (AutoLab-PGSTAT20) y (B) espectrofotómetro UV-visible Perkin Elmer modelo Lambda 25.

CAPITULO V

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Procedimiento experimental

5.1.1. Estudios preliminares

5.1.1.1. Voltametría cíclica del electrodo de Carbón Vítreo

Con el fin de confirmar el funcionamiento adecuado y limpieza del electrodo de trabajo, para la determinación MP, se realizó un estudio de Voltametría cíclica, para ello se sumergió el electrodo de trabajo, electrodo de carbón vítreo en una solución 0,5 M de ácido sulfúrico H_2SO_4 . La figura 32, muestra la respuesta voltamétrica característica de este sistema luego de realizar 45 barridos de potencial, a una velocidad $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ en una ventana de potencial de -1,2 a 1,5 V vs Ag/AgCl. Esta respuesta concuerda con la reportada para este electrodo en este medio ^[33]. Donde se aprecian ondas reversibles de oxidación y reducción de los grupos funcionales tipo quinonas-hidroquinona de la superficie del carbón vítreo entre aproximadamente -0,25 y 0,25 V, y una onda de reducción con E_p a -0,85 V que se atribuye a la reducción de iones hidrogeno.

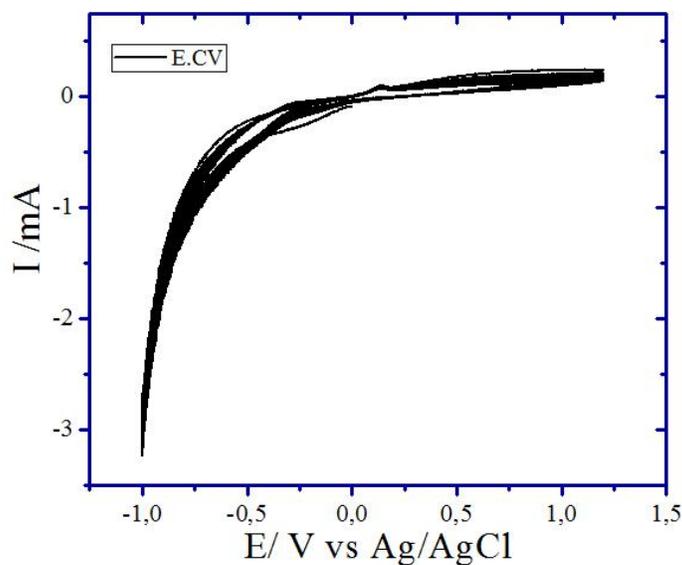


Figura 32. Respuesta voltamétrica del electrodo de CV en H_2SO_4 0,5 M. $v = 100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$

5.1.1.2. Comportamiento del electrolito soporte sobre la superficie del electrodo de CV

Para asegurarnos que el electrolito soporte seleccionado según referencias bibliográficas [49,50,51,52] es el idóneo para nuestro sistema electroquímico se realizó un Voltametría cíclica en una ventana de potencial desde 0,4-1,4 V. Donde se observa la respuesta Figura 33, en la cual no vemos ninguna señal apreciable solo la descomposición del medio electrolítico al final con corrientes muy pequeñas.

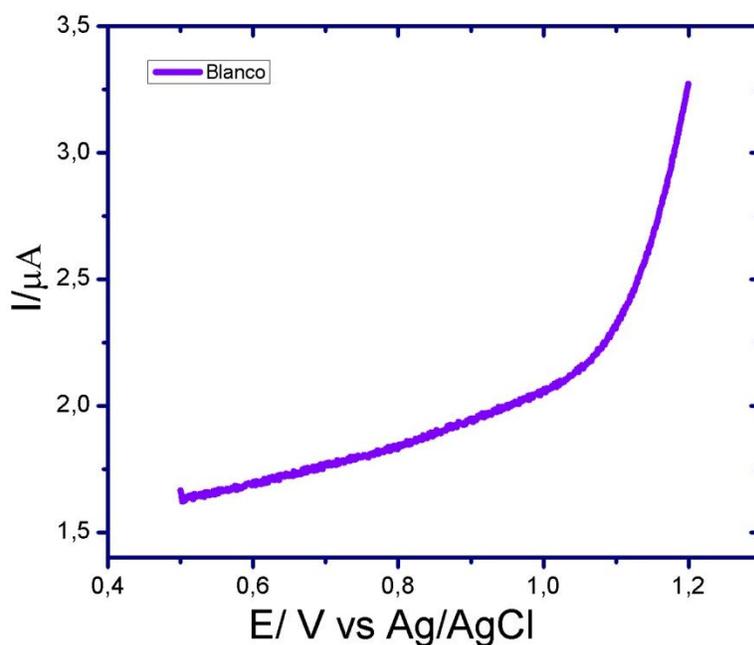
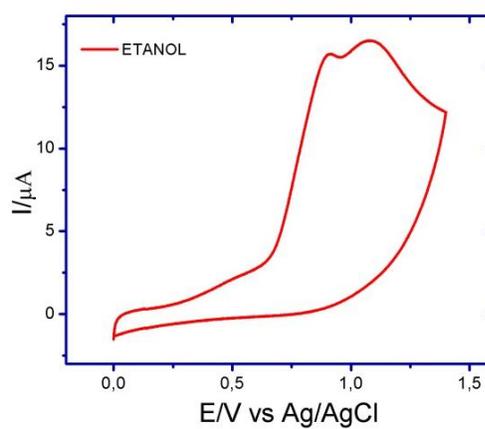
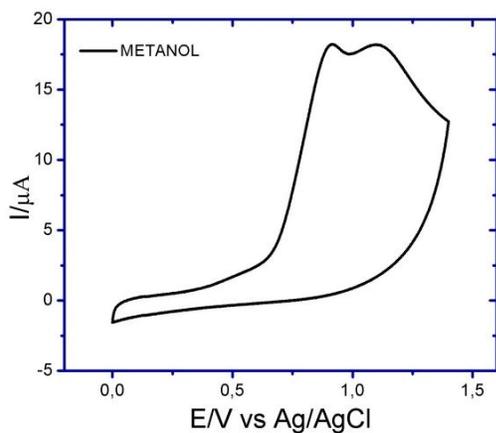
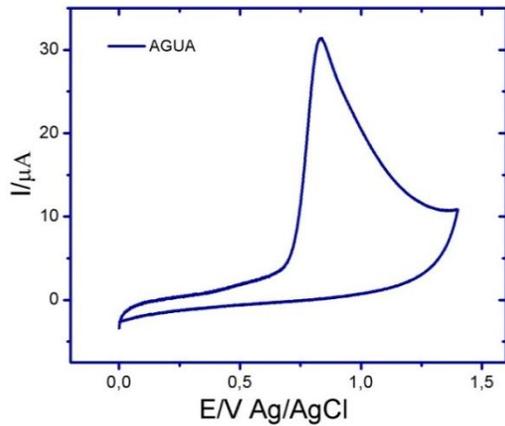


Figura 33. Respuesta de la solución electrolítica utilizando un buffer fosfato 0,2 M pH =7

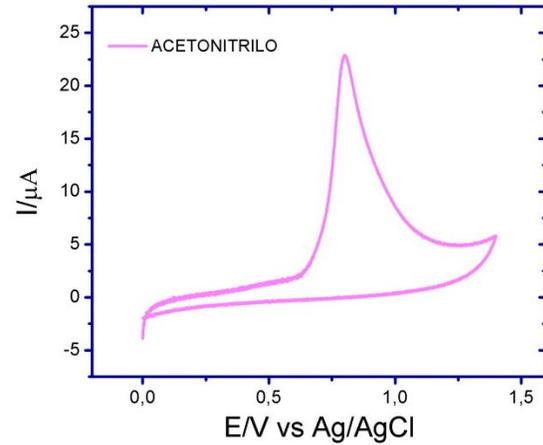
5.1.1.3 Elección del solvente adecuado para la extracción del MP en los polvos compactos

Como se ha descrito anteriormente el MP es soluble en agua, y algunos solventes orgánicos comunes; sin embargo para los estudios electroquímicos solo se pueden emplear solventes polares con alta constante dieléctrica y miscibles en agua, por lo cual es para fines de este trabajo se estudio la influencia del solvente usado en la extracción, sobre la intensidad de corriente de oxidación del sistema electroquímico se estudió por Voltametría cíclica, en una ventana de potencial -0,2-1,6 V, a una velocidad de barrido de 50 mV/s. Se prepararon soluciones patrones de MP, en diferentes solventes: metanol, etanol, acetonitrilo y agua; y se diluyeron hasta una concentración 1mM en el electrolito soporte, obteniéndose las diferentes respuestas mostradas en la figura 34. Se observa en las figuras 34.A y 34.B, que en presencia de metanol y etanol, aparecen dos picos de oxidación irreversibles, el pico más pequeño representa a la oxidación del MP, el cual no está bien definido y el otro pico se puede atribuir a la oxidación del alcohol, posteriormente se puede apreciar la respuesta en presencia de solamente agua y acetonitrilo figura 34.C y 34.D, en las cuales se observa solamente un pico agudo bien definido, atribuible a la oxidación del MP. Por otro lado, al superponer todos los Voltagramas figura 34.E, se observa que la máxima intensidad de corriente corresponde al agua pura como solvente.

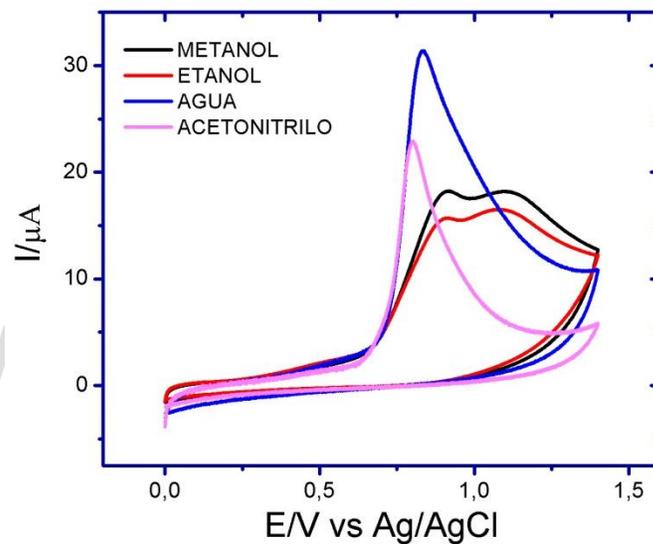




C



D



E

Figura 36. Respuesta voltametrica de la influencia del solvente en la intensidad de oxidación del MP, en un buffer fosfato 0,2 M (pH=7). A-Metanol, B-Etanol, C- Agua, D- Acetonitrilo, y E- Superposición de los solventes utilizados para una solución 1mM de MP.

Luego se realizo la extracción del MP en diferentes muestras de cosméticos, específicamente polvos compactos, tomando en cuenta que los polvos además de este conservante tiene otros excipientes como: dióxido de titanio, talco, óxidos de hierro, perfumes, los cuales pueden interferir en las determinaciones. Se tomaron en cuenta varios aspectos previos entre los que tenemos:

- 1- En la figura 34, se aprecian las respuestas de oxidación en los diferentes solvente utilizados en la preparación de la solución patrón de MP, donde el agua parece ser el mejor candidato ya que no interfiere en el proceso de oxidación y es de bajo costo. Se

procede a realizar la extracción en agua y metanol por medio del esquema propuesto en la figura 36, y se comparo dicha respuesta con la del patrón presentando la misma respuesta electroquímica.

- 2- Posteriormente se realizaron curvas de adición estándar por ambos solventes, partiendo inicialmente de $7,0000 \pm 0,0001$ g del cosmético, en el cual se noto que se salía del rango lineal por ello se fueron variando las cantidades de polvo desde: $3,5000 \pm 0,0001$ g, $1,9005 \pm 0,0001$ g, hasta $0,7266 \pm 0,0001$ g donde se aprecio un rango lineal bastante aceptable. Y se lograron determinar las concentraciones de MP presentes, en agua $2,02 \times 10^{-4}$ M y en metanol $1,76 \times 10^{-4}$ M como se puede apreciar en la Figura 35. Al comparar las concentraciones obtenidas con los diferente solventes, y tomando en cuenta lo anteriormente descrito se eligió como solvente para la extracción el agua ya que esta es de bajo costo, no toxica, no volátil, y reduce los posibles errores electroquímicos.

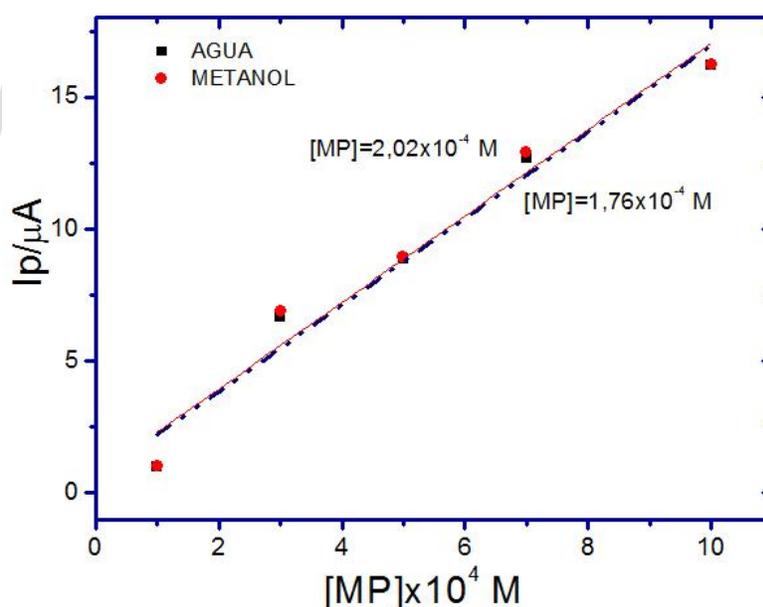


Figura 35. Respuesta CCAE de los diferentes solventes utilizados para la extracción del MP.

- 3- Para comprobar la correcta extracción de MP en este solvente se realizo una extracción al precipitado en el solvente y se llevo al espectrofotómetro de doble haz donde no se

observa ninguna señal de absorción, lo que nos ratifica que por medio de agua se logra extraer cuantitativamente el MP.

5.1.1 4 Procedimiento de extracción del MP para las diferentes muestras de polvos compactos:

Se pesaron $0,7266 \pm 0,0001$ g de cada polvo compacto de diferentes marcas previamente pulverizados, los cuales se disolvieron en 25 mL de agua, y fueron llevados a baño ultrasónico durante 1 hora, agitando ocasionalmente, se dejó reposar y posteriormente se centrifugo durante 25 min. Se filtró, y se transfirió a un matraz aforado de 50 mL y se disolverán a un volumen final con una solución buffer de fosfato 0,2 M ^[49] (pH=7, electrolito soporte) respectivamente.

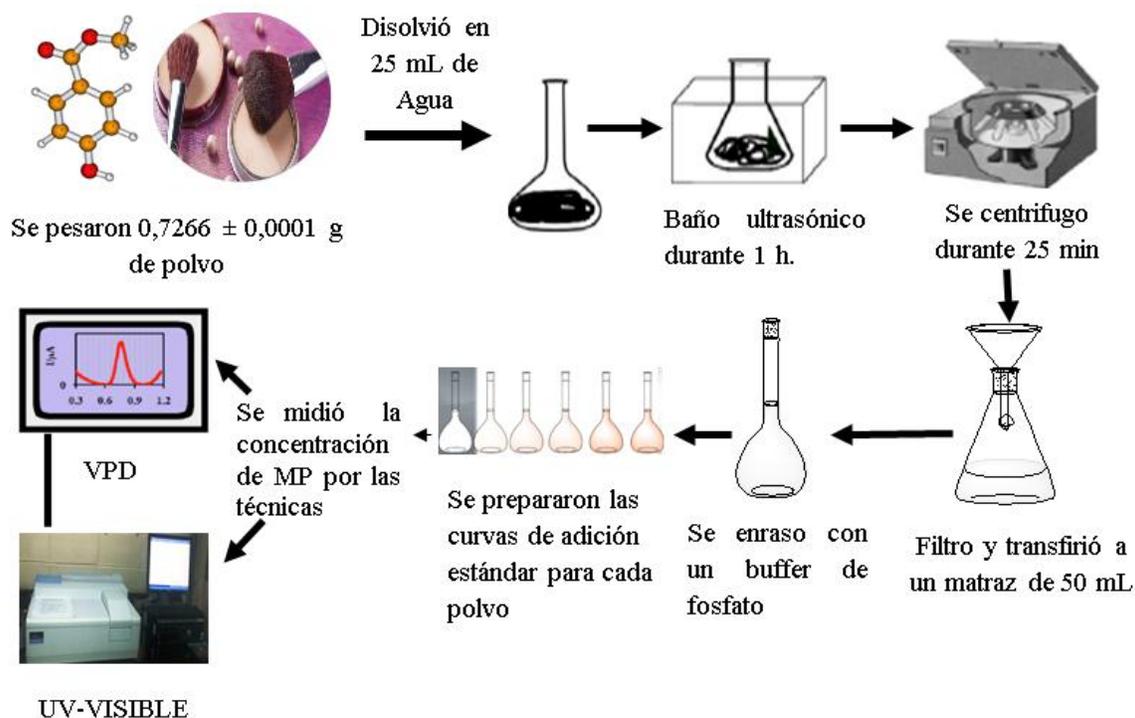


Figura 36. Extracción del MP de los diferentes polvos compactos

5.2. Optimización de los parámetros de trabajo

5.2.1 influencia de la velocidad de barrido

Los efectos de la velocidad de barrido se lograron estudiar mediante la técnica de Voltametría cíclica, en una ventana de potencial desde -0,2 a 1,6 V, con una solución de MP mM, en las siguientes velocidades de barrido: 10 a 1500 mV.s⁻¹; sobre el electrodo de CV. En la figura 37.A se puede observar que no existe ningún pico de reducción en la exploración inversa del MP; por lo cual sugiere que se trata de un proceso de oxidación irreversible.^[50] Consecutivamente la figura 37.B, muestra la variación de la intensidad de pico en función de la velocidad de barrido, dicha variación no es lineal, se puede apreciar que alrededor de 50 mV.s⁻¹, comienza a incrementarse el error en la medida de intensidad de pico, por ende a mayores velocidades de barrido existe mayor incertidumbre en la medida de las corrientes de pico y este error se puede trasladar a las determinaciones. Por tal motivo se selecciona esta velocidad de barrido para las determinaciones, tomando en cuenta que esta velocidad es lo suficientemente alta para realizar una medida en menos de 1 minuto y los picos de oxidación del MP son intensos y bien definidos, ver figura 38.

La curva representada en la figura 37.C, muestra como las corrientes de pico de oxidación (I_p) del MP aumentan linealmente con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido (v^{1/2}). Esta dependencia es lineal según la ecuación:

$$I_p \text{ (mA)} = 1,99617 \times 10^{-4} v^{1/2} - 9,358 \times 10^{-6} \quad (R^2 = 0,996) \text{ (ec.24)}$$

Dicha relación verifica o sugiere que el proceso electroquímico que ocurrió sobre la superficie electrodoica es principalmente controlado por difusión, siendo este un caso ideal para las mediciones cuantitativas.

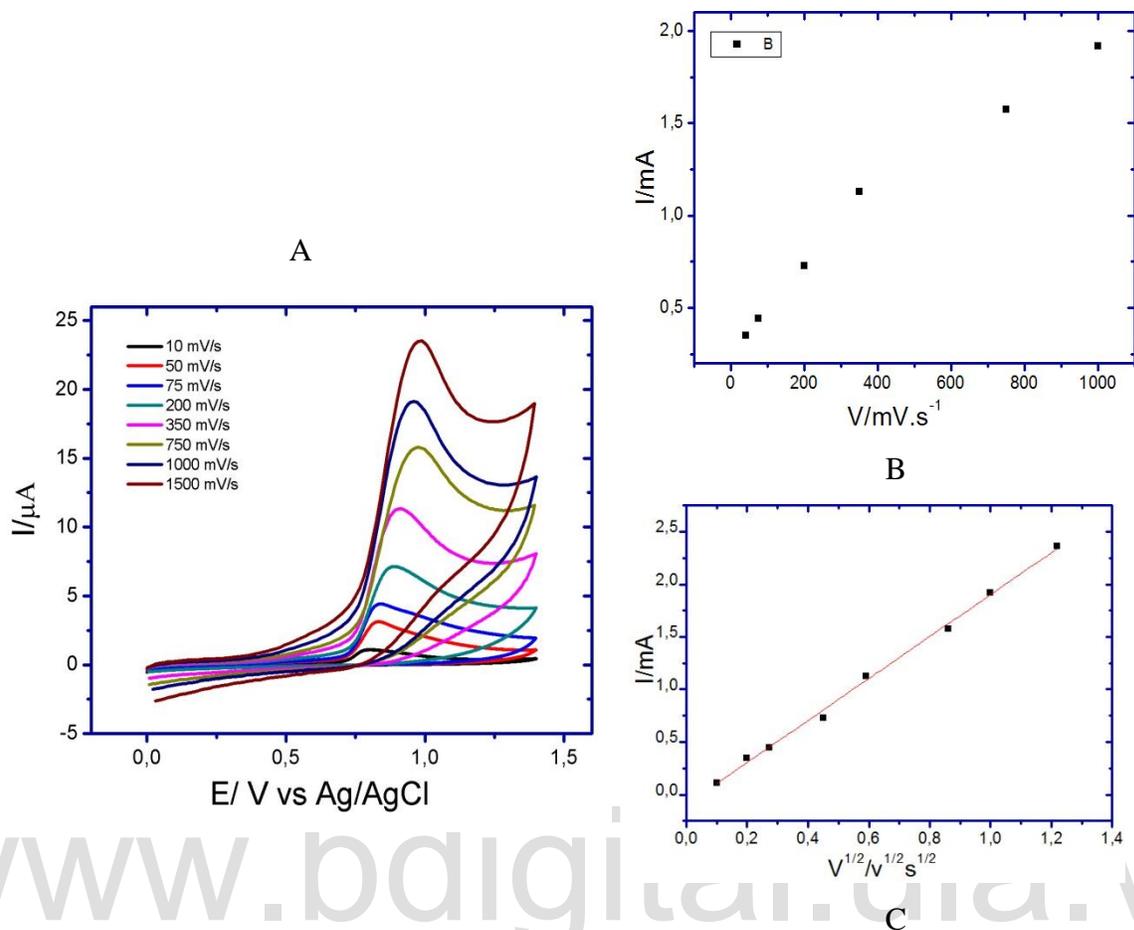


Figura 37.- (A) Voltagramas por la técnica de Voltametría cíclica para una solución 1×10^{-3} M de MP con variación de la velocidad de barrido entre $10 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ hasta $1500 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$, entre $-0,2$ a $1,6$ V sobre el electrodo de CV, en solución reguladora de fosfato $0,2$ M (pH=7). **(B)** I_p vs v **(C)** I_p vs $v^{1/2}$.

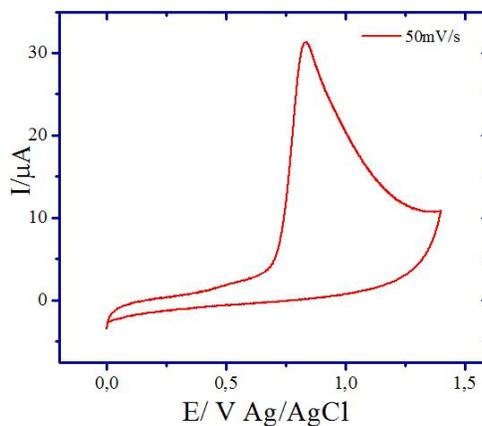


Figura 38. Respuesta de Voltametría cíclica del MP a la velocidad de trabajo $v = 50 \text{ mV/s}$

5.2.2. Estabilidad y Reproducibilidad

La estabilidad del electrodo de trabajo CV también fue estudiada después de almacenamiento a temperatura ambiente y al cabo de varias semanas, donde se observó la misma respuesta del electrodo. En la figura 39, se muestra la superposición de la respuesta voltamétrica para la oxidación de una solución de MP 1 mM sobre CV de distintas experiencias, se observa una alta reproducibilidad en las intensidades de pico, en el gráfico inserto de I_p obtenido en distintos barridos.

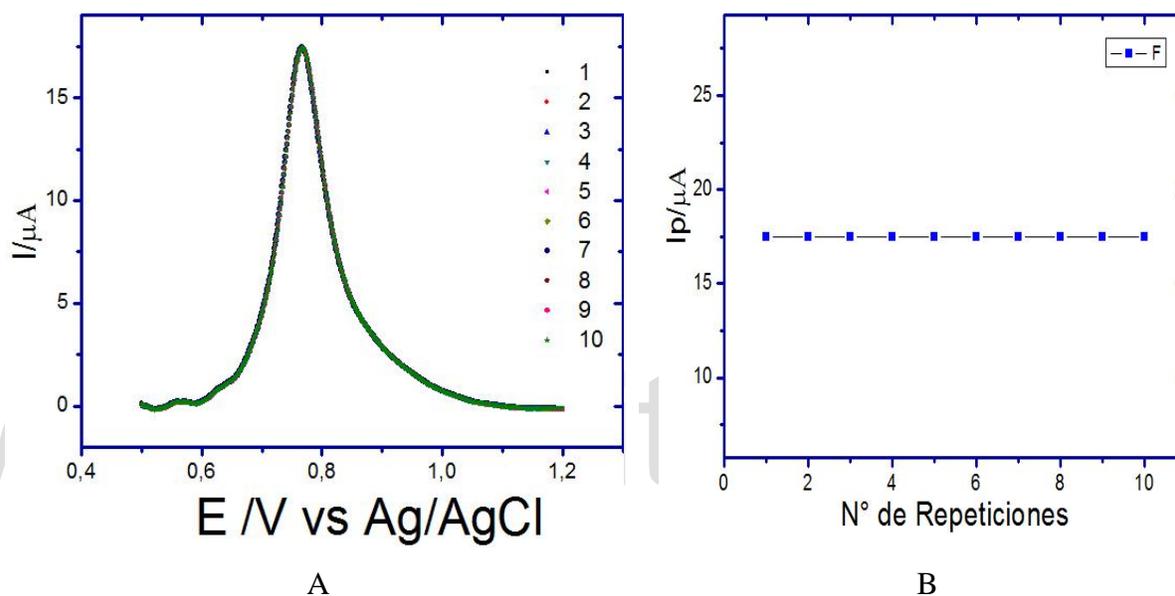


Figura 39. (A) Respuesta voltamétrica de pulso diferencial obtenida para varias repeticiones de la oxidación de MP 1×10^{-3} M sobre CV a una velocidad de $v = 50 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$. (B) I_p vs número de barrido (repeticiones).

5.2.3. Influencia de la concentración de MP en la intensidad de corriente.

Para estudiar la influencia de la concentración de MP sobre la intensidad de los picos anódicos se realizó experimentos de VPD bajo las condiciones anteriormente definidas, y barridos en soluciones desde 5×10^{-6} - 1×10^{-3} M. Los resultados correspondientes se presentan en la figura 40, es obvio que las corrientes de oxidación del MP aumentan con el aumento de la concentración de MP^[66,67]; sin embargo se puede observar que a concentraciones 1×10^{-5} - 5×10^{-6} M figura 40, no se observan picos oxidación, debido a que estos valores de concentración no se pueden determinar mediante esta técnica. Por tal

motivo se seleccionó para el desenvolvimiento de este trabajo una zona lineal en un rango de concentraciones que va desde 1×10^{-4} - 1×10^{-3} M, respectivamente con el fin de poder determinar la concentración de MP en otros cosméticos donde se encuentre. Una vez estimado este rango lineal se procedió a realizar las curvas calibración sencilla y de adición de estándar dentro de este intervalo de concentraciones.

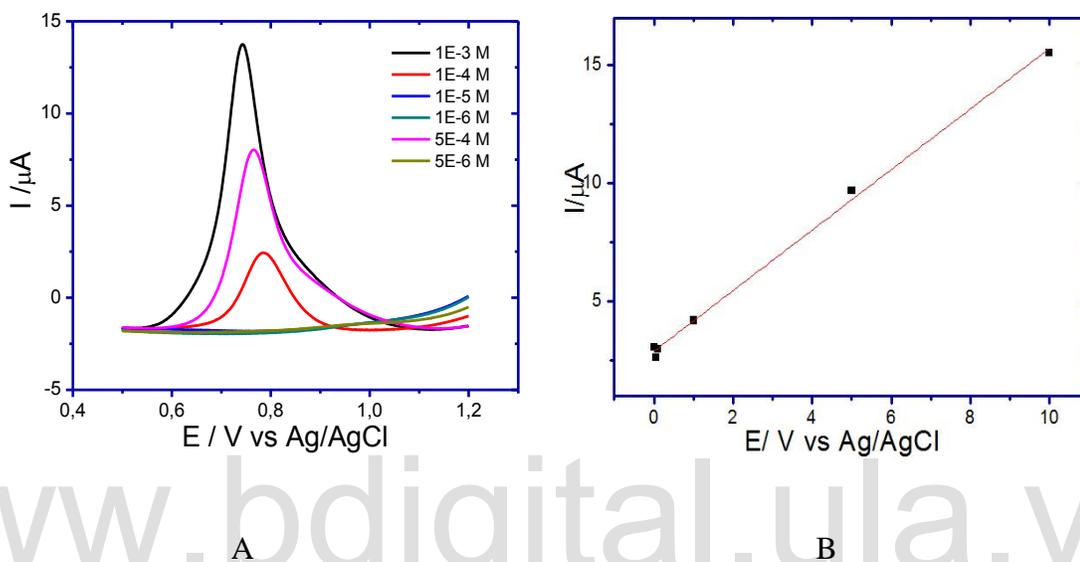


Figura 40. (A) VPD para diferentes concentraciones MP desde 5×10^{-6} a 1×10^{-3} M, en tampón de fosfato 0,2 M de pH=7. (B) curva de calibración para diferentes concentraciones de MP.

5.3 Curva de calibración sencilla mediante Voltametría de pulso diferencial (VPD)

Se preparó una solución patrón de MP de concentración nominal 1mM, la cual fue tratada mediante dilución a distintas concentraciones en un rango de 1×10^{-4} hasta 1×10^{-3} M utilizando como electrolítico soporte, una solución buffer de fosfato 0,2 M, para realizar una curva de calibración sencilla (CCS), en la figura 41.A. Se muestra el Voltagramas obtenido y en la figura 41.B, se puede observar la curva de CCS obtenida sobre el electrodo de CV.

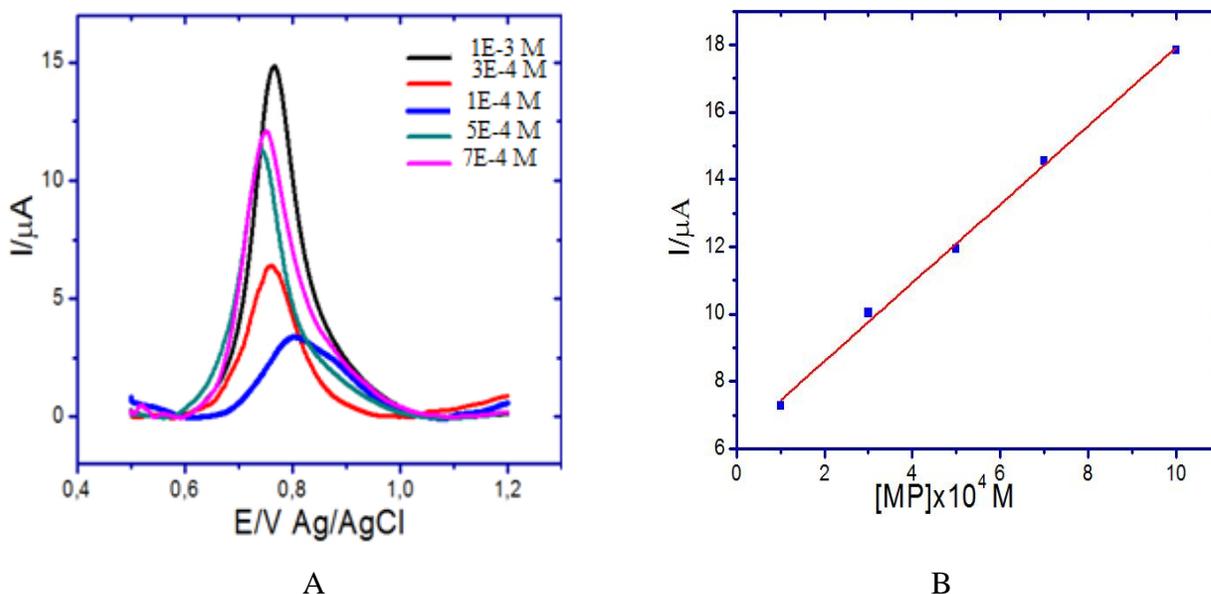


Figura 41. (A) Voltagramas de Voltametría de pulso diferencial (VPD) en un rango de 7×10^{-4} - 1×10^{-3} M, con una Ancho de pulso (Δt) = 20 ms, Altura de pulso (ΔE)= 50 mV y $v = 50$ mV/s. (B) curva de calibración sencilla (CCS) del MP.

5.4- Curva de calibración por adición de estándar (CCA) y análisis de significancia entre las pendientes de la curva de calibración sencilla. Determinación de MP

Una vez realizada la extracción del MP, por la metodología anteriormente descrita se procedió a determinar si existen interferencia de matriz en las condiciones analizadas, para ello se realizaron curvas de calibración de adición de estándar, para ello se preparó una solución de concentración nominal de 1mM tomando en cuenta que la cantidad declarada por el fabricante es de 0,4% m/m^[52]. Por otro lado se preparó una solución patrón 1 mM, las cuales posteriormente se prepararon 5 soluciones con un volumen fijo de 5 mL de solución de muestra de cosmético y volúmenes variables desde 5 mL hasta 20 mL con incrementos de 5 mL de solución patrón y todo llevado a 25 mL respectivamente, las concentraciones de estándar variaron entre 1×10^{-4} a 1×10^{-3} M. En la figura 42-A, se muestra los Voltagramas obtenidos para cada polvo, y en la figura 42-B, se detona la curva de calibración de adición estándar CCAE, superpuesta por la curva de calibración sencilla CCS. Aunque se puede observar buena correlación lineal existe una diferencia apreciable en el valor de la pendiente de la recta, con respecto a la curva de calibración sencilla.

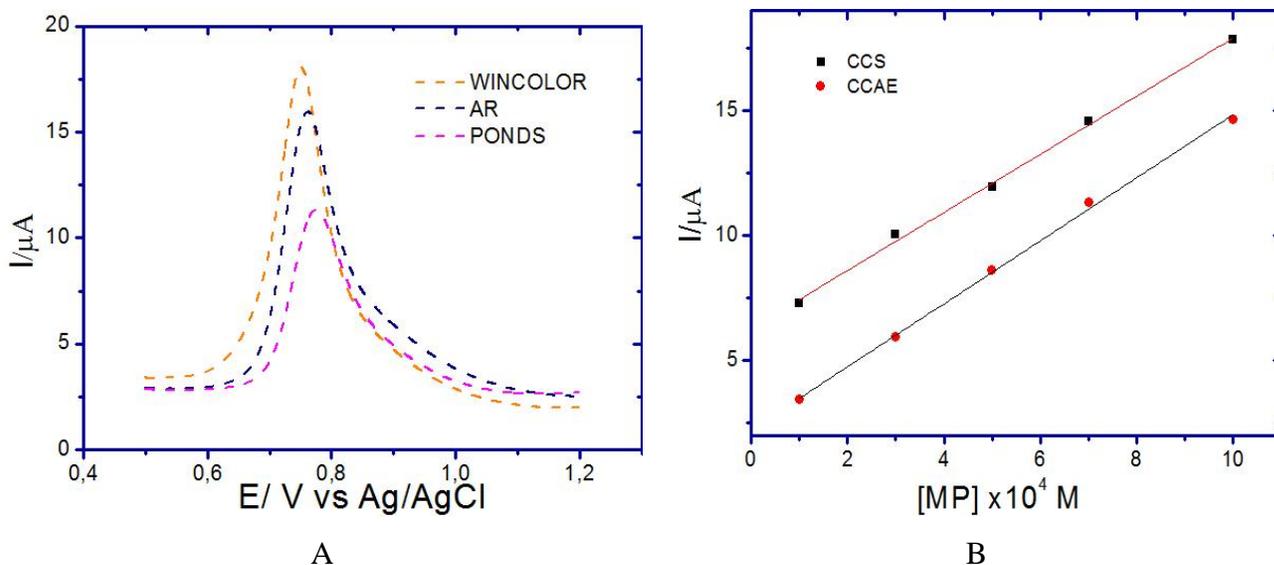


Figura 42.(A) Voltagramas de pulso diferencial de los diferentes polvos compactos. (B) curva comparativa entre CCS y CCAE para el MP.

Los criterios cuantitativos de la ecuación de la recta obtenidos por regresión lineal son: la pendiente (m) y su desviación estándar (S_m), el corte en la ordenada (b) y su desviación estándar (S_b), los cuales permiten obtener los parámetros de calidad como son la sensibilidad, la precisión de la técnica, necesarias para determinar los límites de detección y de cuantificación, los cuales se definen como ^[68]:

$$\text{Límite de Detección (LOD)} = 3S_b / m \text{ (ec.2)}$$

$$\text{Límite de cuantificación (LOQ)} = 10S_b/m \text{ (ec.3)}$$

En la tabla IV se puede apreciar los parámetros de calidad obtenidos a partir de la curva de calibración sencilla y la desviación estándar del blanco obtenida experimentalmente.

Tabla IV. Características analíticas de las curvas de calibrado obtenidas mediante VPD (figura 42.B).

Tipo de Curva	R	Sensibilidad (m) $\times 10^3$ $L \cdot mol^{-1}$	S_m $\times 10^4$	Intercepto (b) $\times 10^6$ $mol \cdot L^{-1}$	S_b $\times 10^7$	LOD $\times 10^5$ $mol \cdot L^{-1}$	LOQ $\times 10^4$ $mol \cdot L^{-1}$
Sencilla	0,997	11,64	3,19	6,27	1,94	4,99	1,66
Adición Estándar	0,998	12,63	2,81	2,22	1,70	4,04	1,35

Para determinar si las diferencias entre las pendientes de la CCS y las curvas de CCAE son estadísticamente significativas, se realizó la prueba de hipótesis (t-Student)^[68].

En la cual:

1. Se define el problema H_0 y H_a : como la hipótesis e hipótesis nula :

$$H_0: \bar{X} = \mu$$

$$H_a: \bar{X} \neq \mu$$

Donde, \bar{X} : valor de la pendiente de la curva de adición estándar y μ : valor de la pendiente de la curva de calibración sencilla.

2. Nivel de confianza 95 % ($\alpha=0,05$).
3. Valor crítico estadístico (valor tabulado en función del nivel de confianza y los grados de libertad):

$$t_{\text{crítico}} = t(\alpha, \sigma) = t(0,05; 3) = 3,18$$

4. Valor del estadístico experimental:

$$t_{\text{exp.}} = \frac{|\mu - \bar{X}| \times \sqrt{n}}{s} \text{ (ec.25)}$$

Donde,

n es el número de mediciones y

s es la desviación estándar de la pendiente de la curva de adición estándar.

Por lo tanto $t_{\text{exp.}} = 6,105$.

Para los tres polvos compactos figura (42) los valores de t_{exp} calculados son:

$$t_{\text{Ponds}} = 7,55; t_{\text{AR}} = 6,09 \text{ y } t_{\text{Wincolor}} = 6,10$$

5. Mediante el análisis estadístico de las pendientes de la curva de calibración sencilla y la curva del método de adición estándar, se realiza la comparación entre t_{exp} y $t_{\text{crítico}}$:

Para determinar la existencia de interferencias de la matriz en la determinación de CS, se realiza el análisis estadístico, donde se observa que $t_{\text{exp}} > t_{\text{crítico}}$, ($6,10 > 3,18$); por lo tanto se

comprueba la hipótesis nula H_0 , lo que indica que con un nivel de confianza del 95 %, la diferencia entre \bar{X} y μ es significativa, ya que el valor de t_{exp} se encuentra muy por encima del rango establecido; este resultado implica que bajo las condiciones de trabajo, existe interferencias de matriz que afectan las mediciones, por lo tanto se debe aplicar solo la curva de calibración por adición de estándar para las determinaciones. Tomando en cuenta este precedente en la tabla IV, se representa cada una de las curvas CCAE realizadas por VPD para cada uno de los cosméticos.

Tabla V. Resultados de la regresión lineal para la curva de adición estándar por VPD: $IP = B + M[MP]$

Cosmético	Sensibilidad $\times 10^3$ ($L \cdot mol^{-1}$)	S_m $\times 10^4$	$B \times 10^6$ ($mol \cdot L^{-1}$)	$S_b \times 10^7$	R^2
Wincolor	12,63	2,81	2,22	1,70	0,998
Ponds	16,74	6,75	3,79	4,09	0,994
AR	15,77	6,78	1,07	4,12	0,993

Con estos datos se procedió a encontrar la concentración de MP en las diversas formulaciones cosméticas de polvos compactos, obteniéndose los resultados que se muestran en la tabla VI, donde se muestra la concentración extrapolada y el % de metilparabeno presente en cada cosmético.

El error de la concentración extrapolada S_{XE} fue calculado mediante la expresión

$$S_{XE} = \frac{S_{y/x}}{b} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\bar{y}^2}{b^2 \sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad (\text{ec.26})$$

Donde, $S_{Y/X}$ es el error aleatorio en Y

$$S_{Y/X} = \sqrt{\sum (X_i - \bar{X})^2} * Sb \quad (\text{ec.27})$$

n = número de puntos experimentales, $y = IP$, $x = [MP]$

El intervalo de error se expresa para un límite de confianza del 95 %, donde el valor tabulado para 3 grados de libertad es $(0,05; 3) = 3,18$

Tabla VI. Concentraciones encontradas por extrapolación de las CCAE.

Cosmético	[CMP] Nominal $\times 10^3$ M	[CMP] Obtenida $\times 10^4$ M	LC \pm ($S_{re} \times 3,18$) $\times 10^4$	% m/m MP (muestra)
Wincolor		9,00	2,44	0,92
Ponds	1	2,27	0,93	0,24
AR		3,39	0,85	0,35

5.5 Correlación del método a través por espectroscopia UV-Visible

Inicialmente se planteó realizar la correlación por espectroscopia UV-Visible, según el procedimiento descrito por Saadiyah A y colaboradores [53]. Sin embargo este procedimiento fue cambiado debido a la inestabilidad del complejo formado. Se procedió a preparar una curva de calibración sencilla a partir una solución patrón de MP en metanol 1×10^{-4} M, y a partir de esta se prepararon 6 soluciones en un rango: 1×10^{-6} - $2,1 \times 10^{-5}$ M y se midió la absorbancia en un intervalo de 300 a 200 nm de longitud de onda, usando como blanco metanol, obteniéndose máximos de absorbancia a 256 nm figura 14. Cada espectro se midió tres (3) veces y con los promedios de los máximos se construyó la curva de calibración sencilla mostrada en la figura 43.

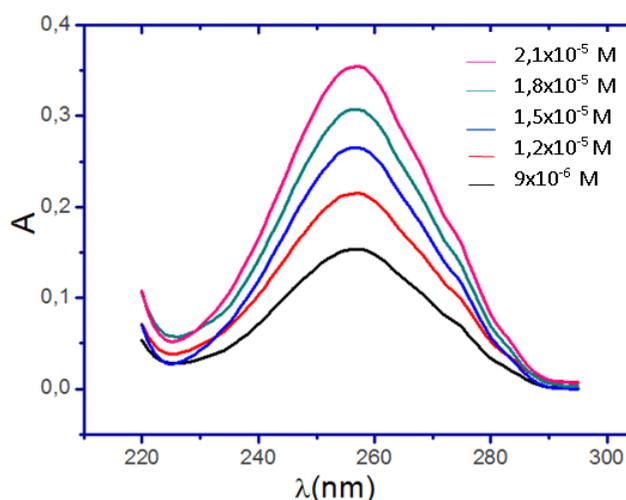


Figura 43. Curva de calibración sencilla en un rango de concentración 9×10^{-6} - $2,1 \times 10^{-5}$ M en un rango de longitud de onda de 200 a 300 nm.

Posteriormente se procedió a realizar la curva de calibración por adición estándar utilizando el mismo procedimiento descrito en la figura 36, pero utilizando como solvente metanol, y preparando una solución patrón de metilparabeno 1×10^{-4} M, se utilizaron volúmenes fijos de muestra de 0,25 mL y variando volúmenes desde 2 hasta 5 mL en intervalos de 0,75 mL de patrón y llevados a un volumen de 25 mL. En la figura 44, se muestra las absorciones obtenidas para cada una de los polvos compactos analizados.

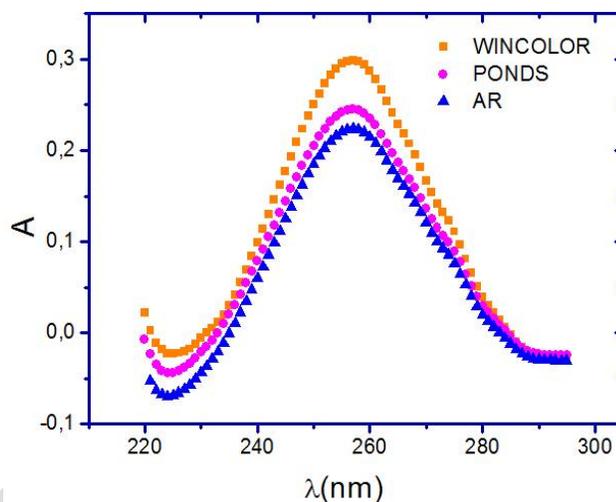


Figura 44. Espectros de absorción de los diferentes polvos compactos analizados.

Una vez obtenidas se realizó la prueba de t-Student para comparar la curva de calibración sencilla con la curva de calibración de adición estándar por esta técnica obteniendo:

$$t_{\text{exp}} > c_{\text{crítico}}$$

$$9,50 > 3,18$$

Por lo tanto se comprueba la hipótesis nula H_0 , lo que indica que con un nivel de confianza del 95 %, la diferencia entre \bar{X} y μ es significativa, ya que el valor de t_{exp} se encuentra muy por encima del rango establecido; este resultado nos ratifica que debemos utilizar la curva de adición estándar para correlacionar el método por espectroscopia UV-Visible ya que existen interferencias de matriz. En la figura 45, se muestra el resultado de cada una de las curvas que se obtuvieron al promediar los máximos de los espectros medidos (cada espectro se midió tres veces).

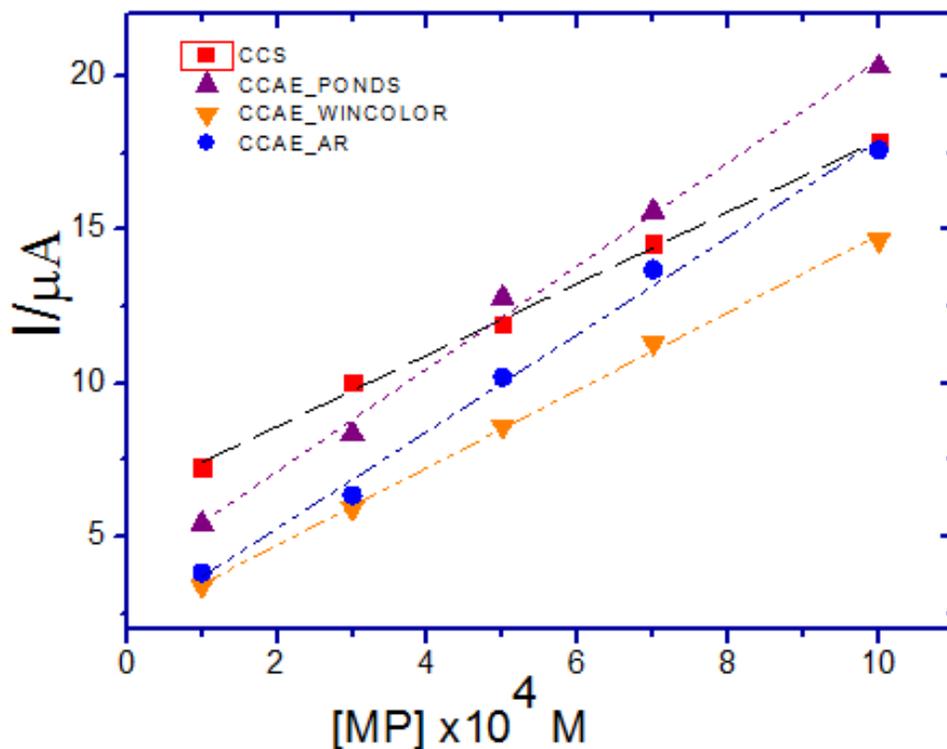


Figura 45. Curvas de adición estándar para cada uno de los cosméticos analizados a través de UV-Visible.

En la tabla VII se muestran las características de la regresión lineal para CCAE por UV-Visible de cada polvo respectivamente.

Tabla VII. Resultados de la regresión lineal por UV-Visible para las CCAE: $IP = B + M[MP]$

Cosmético	Sensibilidad $\times 10^3$ ($L \cdot mol^{-1}$)	S_m	B ($mol \cdot L^{-1}$)	$S_b \times 10^3$	R	LOD $\times 10^6$ $mol \cdot L^{-1}$	LOQ $\times 10^6$ $mol \cdot L^{-1}$
Wincolor	12,74	748,96	0,12	10,66	0,990	2,51	8,37
Ponds	16,14	444,60	-0,05	6,33	0,996	1,18	3,92
AR	17,89	370,61	-0,05	5,28	0,998	0,89	2,95

Por otro lado, en la tabla VIII se muestran los resultados de la concentración de MP obtenidos por la extrapolación de cada una de las curvas obtenidas para cada muestra de cosmético, y el porcentaje de MP presente en cada cosmético.

Tabla VIII. Concentraciones de MP por UV-Visible encontradas por extrapolación de las CCAE.

Cosmético	[CMP] Nominal $\times 10^4$ M	[CMP] Obtenida $\times 10^4$ M	LC \pm ($S_{re} \times 3,18$) $\times 10^4$	% m/m MP (muestra)
Wincolor	1	9,14	3,44	0,95
Ponds	1	2,87	0,83	0,30
AR	1	2,66	0,75	0,28

5.6 Análisis de significancia entre los resultados obtenidos por la técnica de Voltametría de pulso diferencial (VPD) y la técnica de espectroscopia UV-Visible.

Los resultados de un método analítico nuevo se pueden contrastar mediante comparación con los obtenidos utilizando un segundo método, en muchas ocasiones de referencia. Si las dos muestras tienen desviaciones estándar, que no difieren significativamente, se puede calcular una estimación conjunta de la desviación estándar, s , a partir de las dos desviaciones estándar individuales s_1 y s_2 respectivamente.^[68]

Para decidir si existe diferencia entre las dos medidas, \bar{x}_1 y \bar{x}_2 es significativa, es decir contrastar la hipótesis nula, $H_0: \mu_1 = \mu_2$, se calcula el t estadístico:

$$t_{exp} = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \text{ (ec.27)}$$

Donde s se calcula a partir de:

$$s^2 = \frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{(n_1 + n_2 - 2)} \text{ (ec.28)}$$

Y tiene $n_1 + n_2 - 2$ grados de libertad.

De acuerdo a los criterios obtenidos y mostrados en las tablas V y VII, se determinaron los t_{exp} para los polvos compactos en estudio como se puede observar en la tabla IX.

Tabla IX. Resultados del análisis de significancia para los polvos compactos en la determinación de la [MP].

Formulación	$t_{crítico}$ (Límite de confianza del 95%)	$t_{experimental}$
Wincolor	2,26	0,20
Ponds	2,26	1,09
AR	2,26	1,51

Los grados de libertad calculados es 9, para un límite de confianza de 95% el $t_{crítico}=2,26$; al compararlo con los valores de $t_{experimental}$, se rechaza la hipótesis nula $H_0: \mu_1=\mu_2$; es decir la diferencia entre ambos métodos no es significativa para el análisis de estos productos cosméticos.

5.7 Porcentaje de recuperación obtenido de polvos compactos

Al desarrollar un método totalmente nuevo en una matriz no muy estudiada puede ocurrir que no existan materiales de referencia ni otros métodos validados para comparar o correlacionar el método en desarrollo. Entonces se hace necesario el empleo de ensayos de recuperación [69,70,71]. Estos consisten en añadir una cantidad de analito conocida a una matriz que simule a la muestra, analizarla y ver la cantidad de analito que se recupera. Se deben ensayar al menos tres niveles de concentración, uno bajo, otro medio y otro alto. A veces, cuando no es posible preparar una matriz similar a la muestra se realizan los ensayos sobre la propia muestra. Se calcula el porcentaje de recuperación como:

$$\%Recup = \frac{Y-X_i}{X_o} \times 100 \text{(ec.29)}$$

Donde:

Y: concentración de la muestra más el patrón añadido.

Xi: concentración inicial de la muestra

Xo: concentración del patrón añadido

Para preparar las soluciones y la curva de adición estándar respectiva al porcentaje de recuperación de ambos métodos (VPD y UV-Visible), se pesaron $0,7266 \pm 0,0001\text{g}$ del polvo compacto, siendo esta la cantidad utilizada en la extracción del MP en cada uno de los polvos compactos (Wincolor, Ponds, y AR), y se le añadieron cantidades del analito desde $(0,0067; 0,0017; 0,0025) \pm 0,0001\text{g}$ respectivamente, utilizando el método de la figura 36, obteniéndose las respuestas mostradas en la figura 46, donde se muestra el promedio de tres mediciones para cada una de las concentraciones estudiadas, y sus % de recuperación obtenidos, tabla XI.

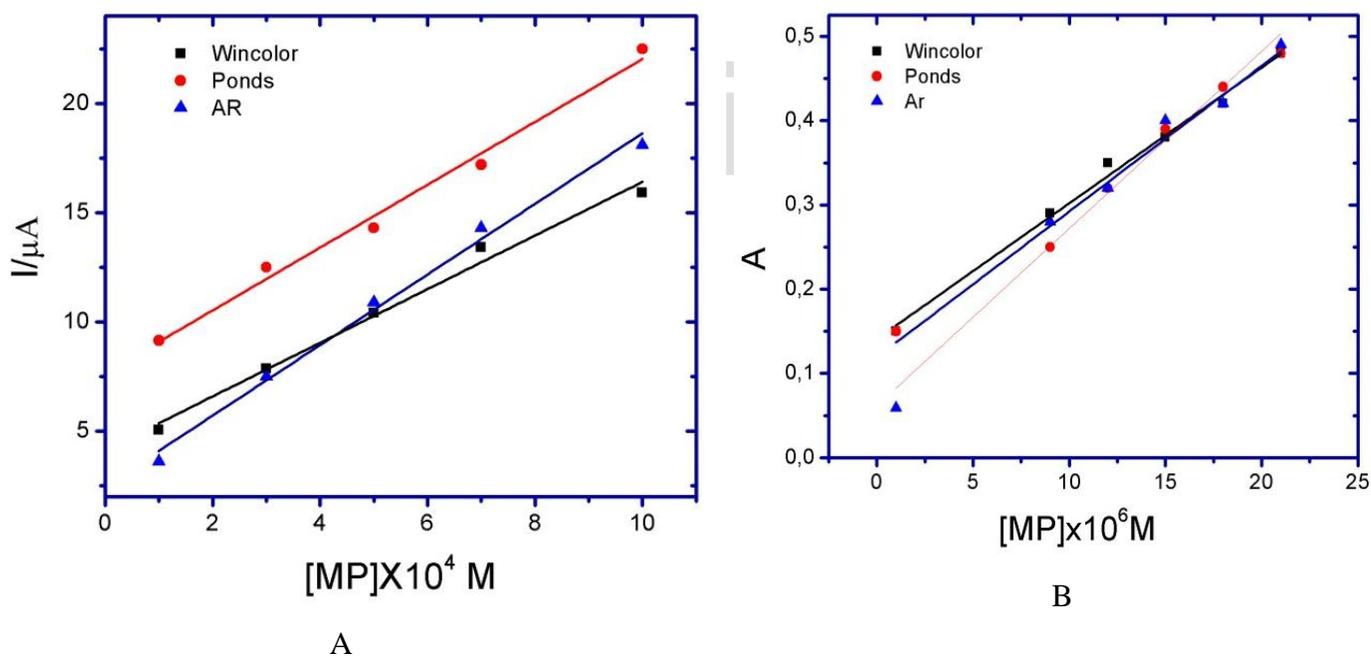


Figura 46. CCAE del porcentaje de recuperación por VPD (A) y UV-Visible (B) de los cosméticos analizados.

Tabla X. Resultados de la regresión lineal para las CCAE: $IP = B + M[MP]$ para la recuperación por VPD y UV-Visible.

Cosmético Por VPD	Sensibilidad $\times 10^3 (L.mol^{-1})$	S_m $\times 10^4$	$B \times 10^6$ $(mol.L^{-1})$	$S_b \times 10^7$	R
Wincolor	12,27	7,52	4,14	4,56	0,985
Ponds	14,38	8,54	1,14	5,18	0,986
AR	16,15	7,95	1,83	4,82	0,991
Cosmético Por UV-Visible	Sensibilidad $\times 10^3$ $(L.mol^{-1})$	S_m	B $(mol.L^{-1})$	$S_b \times 10^3$	R
Wincolor	16,11	659,34	0,27	9,39	0,992
Ponds	17,27	1027,89	0,08	14,63	0,982
AR	21,03	1586,50	0,10	22,59	0,972

Tabla XI. Porcentajes de recuperación obtenidos para el MP en los diferentes polvos compactos analizados.

Parámetros del % de recuperación por VPD				
Cosmético	X_i $\times 10^4 M$	X_0 $\times 10^4 M$	$Y_{(1)}$ $\times 10^3 M$	% Recuperación
Wincolor	9,00	8,81	1,69	89,8 \pm 0,8
Ponds	2,27	2,23	0,39	76,0 \pm 4,5
AR	3,39	3,28	0,56	69,2 \pm 3,1
Parámetros del % de recuperación por UV-Visible				
Wincolor	9,14	8,81	1,67	92,2 \pm 0,9
Ponds	2,87	2,23	0,46	78,7 \pm 3,7
AR	2,66	3,28	0,49	69,8 \pm 3,6

Al observar los valores obtenidos en la tabla XI, se observa que los porcentajes de recuperación tanto por la técnica de VPD como para espectroscopia UV-Visible, presentan buena concordancia entre ambas técnicas, lo que corrobora lo estimado estadísticamente (t-student), donde no se observo diferencia significativa entre ambos métodos; sin embargo, este método debe ser validado para poder que cumpla con los niveles de aceptación es establecidos por las normas nacionales e internacionales relacionadas con la calidad de un método analítico para la determinación de MP en diferentes productos cosméticos.

Una vez desarrollado ambos métodos y desarrollar su correlación estadísticamente se hizo un resumen comparativo entre ambas técnicas utilizadas en la determinación del conservante MP, en polvos compactos, el cual se puede apreciar en la tabla XII.

Tabla XII. Análisis comparativo entre las técnicas de Voltametría de pulso diferencial y la espectroscopia UV-Visible, en la determinación del metilparabeno en productos cosméticos, polvos compactos.

Parámetros	Voltametría de pulso diferencial (VPD)	Espectroscopia UV-Visible
Intervalo de Concentración	Para el análisis de estándares ($10^{-4}M$), ya que por debajo de esta concentración por este método no puede ser determinado.	Se pueden determinar concentraciones en el orden $10^{-6} M$
LOD	En el rango de $10^{-5} M$.	Está en el rango de $10^{-6}M$, bastante adecuado para ser detectado.
Sensibilidad	El valor obtenido fue de $2,81 \times 10^{-4} L \cdot mol^{-1}$ dicho es aceptable y se encuentra entre el rango de concentraciones establecido.	El valor $16,14 \times 10^3 L \cdot mol^{-1}$, siendo mucho mayor que el obtenido para VPD, lo que implica que los mismos cambios en concentración generan una mayor respuesta instrumental.
Selectividad	Permite seleccionar la ventana de potencial donde me aseguro que solo ocurre la oxidación del MP	No puedo garantizar que el pico de absorción sea debido solo al del MP.
Tiempo de análisis	El tiempo requerido es largo, debido a que requiere un tiempo previo para la limpieza del electrodo.	El tiempo necesario es mucho menor con respecto a la VPD, ya que sólo se debe colocar la muestra en la celda, y tiempo de respuesta del equipo para proporcionar los espectros de absorción es corto.

Parámetros	Voltametría de pulso diferencial (VPD)	Espectroscopia UV-Visible
Toxicidad	Todos los experimentos electroquímicos se llevaron a cabo en agua por lo que estos no producen ningún tipo de riesgo o daño al operador o al ambiente.	El solvente utilizado, metanol es tóxico, su exposición extensa podría causar daños irreversibles, por lo que se debe tener las precauciones y seguridad requerida en su manipulación.
Costos	<p>✓ Reactivos</p> <p>Se requiere mayor cantidad de reactivos ya que se deben preparar blancos, estándares y muestras que requieren un electrolito soporte.</p> <p>✓ Instrumentación</p> <p>Las celdas y electrodos que se emplean para esta técnica son de bajos costos las celdas y electrodos utilizados se pueden construir de manera manual en el laboratorio.</p>	<p>Sólo se requiere de un solo reactivo como solvente para los estándares y muestras.</p> <p>Los costos para esta técnica son mayores debido a que los componentes ópticos tienen un valor bastante elevado y no existen posibilidades de construir las celdas.</p>

www.bdigital.ula.ve

Capítulo VI. Conclusiones y recomendaciones

6.1. Conclusiones.

Una vez analizados los resultados obtenidos durante el desarrollo experimental de esta investigación, y reafirmando las bases teóricas consultadas podemos concluir:

1. Se logro desarrollar una metodología voltamétrica para la determinación de MP en productos cosméticos, polvos compactos.
2. Bajo las condiciones de trabajo seleccionadas, se construyeron curvas de calibración sencilla y adición estándar mediante la técnica de VPD, en las cuales se estudio el comportamiento lineal en el rango de concentraciones del MP seleccionado, donde se demuestra que las pendientes de dichas curvas presentan diferencias significativas, lo cual confirma que el método electroquímico propuesto presenta efecto matriz por parte de los componentes que constituyen la muestra.
3. El método de análisis electroquímico propuesto es simple, rápido y de bajo costo, con un límite de detección de 1×10^{-4} M para determinación de MP en cosméticos.
4. Al observar el contenido real del MP presente en cada polvo compacto se detona como en una marca en particular, sobrepasa el valor de concentración máxima permitida por la directiva CEE (0,4% m/m), mientras que las otras marcas están por debajo de este valor por lo que sugiere que existe interferencia en la matriz de estas muestras en particular, para lo cual no se logra extraer toda la cantidad de MP presente.
5. Los porcentajes de recuperación obtenidos muestran una gran concordancia entre ambas técnicas, sin embargo se observa que los valores obtenidos se encuentran por debajo del valor aceptable para un método analítico preciso, por lo que se debe llevar a cabo un análisis más riguroso.
6. Al llevar a cabo la correlación de ambos métodos se observa que no existe diferencia significativa para el rango de concentraciones analizadas de MP. Por ende el método podría ser propuesto para llevar a cabo el control de calidad de este tipo de

conservante en los productos cosméticos, polvos compactos de la marca Wincolor en particular, para otras marcas se debe realizar una validación más estricta.

7. Al observar la alta cantidad de MP presente en los polvos compactos analizados, los cuales son bastantes comerciales en el mercado, se ve con gran preocupación la exposición prolongada a este conservantes en la población femenina.

www.bdigital.ula.ve

6.2.Recomendaciones

1. Procurar la continuidad de esta investigación, ya que contribuye de manera importante y fundamental al control de calidad de los productos a los que estamos expuestos en el día a día, y que nos afectan a largo plazo en nuestra salud.
2. Validar este método para la determinación de este conservante en otros productos cosméticos, utilizando las normas oficiales para la validación de una metodología analítica.
3. Analizar la influencia de la degradación y manipulación de los polvos compactos, desde el proceso de fabricación hasta su uso, debido a que este tipo de conservante a pesar de ser estable a altas temperaturas su comportamiento se puede ver afectado por los rayos UV.
4. Realizar un plan de concientización en el uso de cosméticos.

www.bdigital.ula.ve

Capítulo VII

Bibliografía

- [1]. Luck, E & Pager, M. "Conservación química de los alimentos: Características, usos, efectos". Segunda edición. Editorial Acribia, S.A Zaragoza, España (2000). págs. 66-69.
- [2]. Bagher M, Shamsipur M, Dehdashtian S. "Development of a selective and sensitive voltammetric sensor for propylparaben based on a nonosized molecularly imprinted polymer-carbon paste electrode". Materials science and engineering. 2014; 36:102-107.
- [3]. Regulation (EC) No. 1233/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products. <http://eur-lex.europa.eu/legalcontent/EN/TXT/?uri=celex:32009R1223> . Fecha de revisión: 16 de marzo del 2016.
- [4]. Commission Regulation (EU) No. 358/2014 of 9 April 2014 amending Annexes II and V to Regulation (EC) No. 1233/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products. <http://eur-lex.europa.eu/legalcontent/EN/TXT/?uri=celex:32014R0358>. Fecha de revisión: 16 de marzo del 2016.
- [5]. Commission Decision of 9 February 2006 amending Decision 96/335/establishing an inventory and a common nomenclature of ingredients employed in cosmetic products (2006/257/EC). <http://eur-lex.europa.eu/legalcontent/EN/TXT/?uri=celex%3A32006D0257>. Fecha de revisión: 16 de marzo del 2016.
- [6]. García E. "Niveles de fármacos y disruptores endocrinos en aguas fluviales y potables Españolas. Riesgos ecotoxicológicos y para la salud pública". Tesis doctoral. Universidad Rey Juan Carlos. Madrid, España (2013). págs.72-80.
- [7]. Baranowska I, Wojciechowska I, Solarz N. "Determination of preservatives in cosmetics, cleaning agents and pharmaceuticals using fast liquid chromatography". Journal of Chromatographic science. 2013; 22(6):1609-1625.
- [8]. Cashman A, Warshaw E. "Parabens: A review of epidemiology, structure, allergenicity, and hormonal properties". Dermatitis. 2005; 16:57-66.
- [9]. Wade L.G, JR. "Química orgánica". Quinta edición. Pearson Educación, S. A., Madrid, 2004. Págs.547-550.

- [10]. Leopoldini M, Marino T, Russo N. "Antioxidant properties of phenolic compounds: H-atom versus electron transfer mechanism". *J.Phys.Chem.* 2004; 108:4916-4922.
- [11]. Wright J.S, Johnson E.R." Predicting the activity of phenolic antioxidants: Theoretical method analysis of substituent effects and application to major families of antioxidants". *J.Am.Chem.Soc.* 2001; 123:1173-1183.
- [12]. Cabaleiro N, De la Calle I, Bendicho C." An overview of simple preparation for the determination of parabens in cosmetics". *Trends in Analytical Chemistry.* 2014; 7:34-46.
- [13]. Droguería Cosmopolitan. "Conservadores cosméticos II". 2012. <http://cosblog.com/test/2012/01/09/conservador.com>. Fecha de revisión: 06 de junio del 2016.
- [14]. Soni M, Carabin I.G. Burdock G.A. "Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens)". *Food and Chemical Toxicology.* 2005;47:985–1015.
- [15]. Lorenzetti OJ, Wernet TC." Topical parabens: benefits and risks". *Dermatologic.* 1977; 154:244-50.
- [16]. Soni M, Taylor SL, Greenberg NA. "Evaluation of the health aspects of methyl paraben: a review of the published literature". *Food and Chemical Toxicology.* 2006; 40:1335-73.
- [17]. Díaz B, Heras F, Conde L." Parabens: ¿mito o realidad? ". Servicio de Dermatología. Escuela Nacional de Medicina del Trabajo. Instituto de Salud Carlos III. Madrid. España. *Piel.* 2006; 21(5):231-40.
- [18]. Routledgea E., Parkera J., Odumb J. "Some Alkyl Hydroxy Benzoate Preservatives (Parabens) Are Estrogenic". *Toxicology and Applied Pharmacology.* 1998; 153:12-19.
- [19]. Makino T. "Female Reproductive Tract and Mammary Disorders Caused by Endocrine Disruptors". *Journal of the Japan Medical Association.* 2003; 46:93-96.
- [20]. Oishi S. " Lack of spermatotoxic effects of methyl and ethyl esters of p-hydroxybenzoic acid in rats". *Food Chem Toxicol.* 2004; 42:1845-9.
- [21]. Kang KS, Che JH, Lee YS. " Decreased sperm number and motile activity on the F1 offspring maternally exposed to butyl p-hydroxibenzoic acid (butyl paraben) ". *J Vet Med Sci.* 2002; 64:227-35.

- [22]. Ishiwatari S, Suzuki T, Yoshino T. "Effects of methyl paraben on skin keratinocytes". *J. Appl. Toxicol.* 2007; 27: 1–9
- [23]. Okamoto Y, Hayashi T, Matsunami S. "Combined Activation of Methyl Paraben by Light Irradiation and Esterase Metabolism toward Oxidative DNA Damage". *Chem. Res. Toxicol.* 2008; 21: 1594–1599.
- [24]. Darbre Philippa. "Underarm Cosmetics and Breast Cancer". *J. Appl. Toxicol.* 2003; 23: 89–95.
- [25]. Darbre P, Aljarrah A, Miller WR, Coldham NG, Sauer MJ, Pope GS. "Concentrations of Parabens in Human Breast Tumours". *J Appl Toxicol.* 2004; 24(1): 5-13.
- [26]. Darbre P, Harvey P. "Paraben esters: review of recent studies of endocrinotoxicity, absorption, esterase and human exposure, and discussion of potential human health risks". *J. Appl. Toxicol.* 2008; 28: 561–578.
- [27]. Barr L, Metaxas G, Harbach J, Savoy L, Darbre P. "Measurement of paraben concentrations in human breast tissue at serial locations across the breast from axilla to sternum". *J. Appl. Toxicol.* 2012; 32: 219–232.
- [28]. Charles A, Darbre P. "Combinations of parabens at concentrations measured in human breast tissue can increase proliferation of MCF-7 human breast cancer cells". *J. Appl. Toxicol.* 2013; 33: 390–398.
- [29]. Darbre P, Harvey. "Parabens can enable hallmarks and characteristics of cancer in human breast epithelial cells: a review of the literature with reference to new exposure data and regulatory status". *J. Appl. Toxicol.* 2014; 34: 925–938.
- [30]. Angeles L, Cydney N, Chanel P, Runke Stephanie R. "Methylparaben stimulates tumor initiating cells in ER+ breast cancer models". *J. Appl. Toxicol.* 2016.
- [31]. Saad B, Bari Md.F, Saleh M. "Simultaneous determination of preservatives (benzoic acid, sorbic acid, methylparaben and propylparaben) in foodstuffs using high-performance liquid chromatography". *Journal of chromatography.* 2005; 1073: 393-397.
- [32]. Baranowska I, Wojciechowska I. "Determination of preservatives in cosmetics and environmental waters by HPLC". *Pol. J. Environ. Stud.* 2013; 22(6): 1609-1625.
- [33]. Noorashikin M.S, Mohamad S, Abas M.R. "Extraction and determination of parabens in water sample using an aqueous two-phase system of ionic liquid and salts with beta-cyclodextrin as the modifier coupled with high performance liquid chromatography". *Anal methods.* 2014; 6: 419.

- [34]. Jain A, Soni S, Verma K. "Determination of parabens in cosmetics by liquid-phase microextractions and high-performance liquid chromatography diode array detection". *Journal of liquid chromatography & related technologies*. 2015; 38:82-91.
- [35]. Millares P, Vrouvaki I, Chisvert A. "Determination of alternative preservatives in cosmetic products by chromophoric derivatization followed by vortex-assisted liquid-liquid semimicroextraction and liquid chromatography". 2016;16:414.
- [36]. Mincea M, Lupsa I, Cinghita D. "Determination of methylparaben from cosmetic products by ultra performance liquid chromatography". *J.Serb.Chem.Soc.* 2009; 74(6):669-676.
- [37]. Maneenuch C, Sudkate C, Weena S. "A rapid separation and highly determination of paraben species by ultra-preformance liquid chromatography- electrochemical detection". *Detection*. 2013;1:21-29.
- [38]. Njies P. "Rapid UHPLC determination of common preservatives in cosmetic products". *PerkinElmer,Inc.*2010
- [39]. Tsai I-Chi,Su Chia-Yu, Hu C. "Simultaneous determination of whitening agents and parabens in cosmetic products by capillary electrophoresis with on-line sweeping enhancement". *Anal methods*.2014; 6:7615.
- [40]. Uysal U.D, Guray T. "Determination of parabens in pharmaceutical and cosmetic products by capillary electrophoresis". *Journal of analytical chemistry*". 2008; 63(10):982-986.
- [41]. Dolzam M, Spudeit D, Azevedo M. "A fast method for simultaneous analysis of methyl, ethyl,propyl and butylparaben in cosmetics and pharmaceutical formulations using capillary zone electrophoresis with UV detection". *Anal methods*. 2013; 5:6023.
- [42]. Ortí N, Villanueva R, Ramos G. "Determination of parabens in cosmetics without previous extraction by micelar liquid chromatography". *Journal of chromatographic science*. 1999; 37.
- [43]. Haunschmidt M, Buchberger W, Klampfl C. "Identification and semi-quantitative analysis of parabens and UV filters in cosmetic products by direct-analysis in-real-time mass spectrometry and gas chromatography with mass spectrometric detection". *Anal methods*. 2011; 3:99.

- [44]. Fan X, Kubwabo C, Rasmussen P. "Simultaneous quantitation of parabens, triclosan, and methyl triclosan in indoor house dust using solid phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry". *Journal of environmental monitoring*. 2010.
- [45]. Mielech K, Puzanowska H, Niedzielko A. "Electrooxidation of some antifungal agents and their square-wave voltametric determination in cosmetics and pharmaceuticals". *Analytical letters*. 2011; 44:955-967.
- [46]. Fung Y, Luk S. "Determination of salicylic acid in pharmaceutical formulations and foods by differential-pulse voltammetry using a glassy carbon electrode". *Analyst*. 1989; 114:943-948.
- [47]. Radovan C, Cinghita D, Manea F. "Electrochemical sensing and assessment of parabens in hydro-alcohol solutions and water using a boron-doped diamond electrode". *Sensors*. 2008; 8(7):4330-4349.
- [48]. Gholivand M, Shamsipur M, Dehdashtian S. "Development of a selective and sensitive voltammetric sensor for propylparaben based on a nanosized molecularly imprinted polymer- carbon paste electrode". *Materials Science and Engineering C*. 2014; 36:102-107.
- [49]. Keerti M. Naik, Sharanappa T. Nandibewoor. "Electroanalytical method for the determination of methylparaben". *Sensors and Actuators A: Physical*. 2014; 212: 127–132.
- [50]. Gil E, Andrade C, Barbosa N, Serrano S. "Cyclic voltammetry and computational chemistry studies on the evaluation of the redox behavior of parabens and other analogues". *J. Braz. Chem. Soc.* 2012; 23(3):1-14
- [51]. Azadeh Lalifar Asma Khoob M.B.S.M. "A novel method based on electrochemical approaches and multivariate calibrations for study and determination of methylparaben in the presence of unexpected interference in Cosmetics". *Sensors and Actuators B*. 2015; SNB 18192.
- [52]. Hajian A, Ghodsic J, Afraz A, Rafati A. "Development of a Novel Biosensor for Nanomolar Detection of Methylparaben". *EuroSensors, Procedia Engineering*. 2015; 120:552-555.
- [53]. Dhahir S, Hussein H.J. "Spectrophotometric determination of methyl paraben in pure and pharmaceutical oral solution". *Advances in natural science*. 2013;6(4):1-4.

- [54]. Kutluay A, Duzmen S, Teker T, Aslanoglu M. "Voltammetric determination of methylparaben and its DNA interaction using a novel platform based on carbon nanofibers and cobalt-nickel-palladium nanoparticles". *Sensors and Actuators*. 2017;239:330–337.
- [55]. Baeza A, García A. "Principios de electroquímica analítica". Documentos de apoyo UNAM (2011), Pág. 64-68.
- [56]. Hernandez, R. Martínez, Y. Ortiz, R. "Técnicas electroanalíticas, Parte II - Voltamperometría" *Guía de Laboratorio de Análisis Instrumental*. Universidad de los Andes. Mérida 2006.
- [57]. Kissinger P, Heineman W. "Cyclic voltammetry". *Journal of Chemical Education*. 1983; 60:702-706.
- [58]. Brett C, Oliveira A. "Electrochemistry. Principles, methods, and applications". Oxford Science Publications. 1994; 217-219.
- [59]. Brad A, Faulkner L. "Electrochemical methods. Fundamentals and Applications". Inc. 2ª Edition. Phoenix- Estados Unidos. 2001. págs. 226-240.
- [60]. Mabbott, G. "An introduction to cyclic voltammetry". *Journal of Chemical Education*. 1983; 60:697-702.
- [61]. Wang, J. "Analytical electrochemistry". Wiley-VCH. 2ª Edition. Nueva York. 2001; 28.
- [62]. Osteryoung R.A, Osteryoung J. "Pulse Voltammetry methods of analysis". *Journal of Chemical Education*. 1983; 60: 296-298.
- [63]. Díez J. "Hoja informativa de galvanía y medio ambiente". Centro de tecnologías electroquímicas CIDETEC. [Publicaciones en línea]. Disponible en: <http://www.cidetec.es/media/archivos/61Abril06.pdf>. Fecha de revisión: 15 mayo 2016.
- [64]. Carroz D. "Química Orgánica Básica". Publicaciones Vicerrectorado Académico. 3ª Edición. Venezuela. 2009. págs. 759-760.
- [65]. Serrano J.L. "Curso: Instrumentación y métodos de análisis químico". http://www.upct.es/espectro_electromagnetico. Fecha de revisión: 06 de junio 2016
- [66]. Skoog Douglas, Holler James F. "Principios de análisis instrumental". 5ª Edición. McGraw-Hill. Madrid, España. 2009. págs. 322-353.

- [67]. Miller James, Miller Jane .“Estadística y quimiometría para química analítica”. 4^a Edición. Pearson Educación S.A. Madrid, España.2002. págs. 43-186.
- [68]. Suárez, Raibel; Arévalo, Evelia; Linares, Ledy; Ustáriz, Francisco; Hernández, Gladys. “Validación de un método analítico para la determinación de magnesio eritrocitario”. Avances en Química.2009;4:53-62.
- [69]. Jurado M. “Aplicación de Microsoft Excel a la Química Analítica: validación de métodos analíticos”. Departamento de Química Analítica. 2008.
- [70]. Huber L. “Validation of analytical methods: review and strategy. LC-GC International”. 1998; 11:96-105.
- [71]. Taylor J. “Validation of Analytical Methods”. Analytical Chemistry. 1933; 55: 600-608.

www.bdigital.ula.ve