



UNIVERSIDAD DE OVIEDO
FACULTAD DE QUÍMICA

DETERMINACIÓN DE FÓSFORO EN FRUTAS

TRABAJO FIN DE GRADO EN QUÍMICA

TERESA RODRÍGUEZ PARDO
OVIEDO, 10 DE JUNIO, 2024



Determinación de fósforo en frutas

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Ángel e Isabel, por su amor incondicional y por creer siempre en mí, incluso cuando ni yo lo hacía.

A mi hermana, Irene, por estar siempre conmigo en los momentos de estrés. Gracias por ser una fuente de alegría y motivación en mi vida.

A mi abuela, Tatín, por ser una inspiración en la vida y a mi abuelo Ramón, por ayudarme desde el cielo.

A mis amigos, por apoyarme y acompañarme siempre.



ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. RESUMEN.....	4
2. INTRODUCCIÓN.....	4
2.1. FÓSFORO EN LA SALUD HUMANA.....	5
2.2. VALORACIÓN DE DISTINTAS TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE FÓSFORO	7
2.3. ANÁLISIS POR INYECCIÓN EN FLUJO	8
2.4. DIGESTIÓN ÁCIDA ASISTIDA POR MICROONDAS.....	11
3. OBJETIVOS	12
4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	12
4.1. INSTRUMENTACIÓN	12
4.2. REACTIVOS	12
4.3. PROCEDIMIENTO OPERATIVO.....	13
4.3.1. PREPARACIÓN DE LAS FASES	13
4.3.2. PUESTA A PUNTO DEL MÉTODO ANALÍTICO	14
4.3.3. PROCEDIMIENTO DE PUESTA EN DISOLUCIÓN DE LAS MUESTRAS.....	14
4.3.4. PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS TRAS SU PUESTA EN DISOLUCIÓN	15
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
5.1. CALIBRACIÓN DE LA BOMBA PERISTÁLTICA.....	16
5.2. CURVA DE CALIBRADO	17
5.3. MUESTRAS	19
5.4. ADICIONES ESTÁNDAR	24
5.5. COMPARACIÓN CON CONCENTRACIONES ENCONTRADAS EN LA LITERATURA.....	28
6. CONCLUSIONES	28
7. BIBLIOGRAFÍA	29
8. ANEXO	31
8.1. PREPARACIÓN DE LAS FASES	31
8.2. PREPARACIÓN DE UN PATRÓN DE 25 PPM PARA EL ESTUDIO DE LA VELOCIDAD DE FLUJO.	31
8.3. PREPARACIÓN DE PATRONES.....	32
8.4. CÁLCULO DE MUESTRAS DE ADICIONES ESTÁNDAR	33



1. RESUMEN

El fósforo (P) es un elemento químico que se encuentra en cada una de las células de nuestro organismo. Está naturalmente presente en muchos alimentos como productos lácteos, carnes, verduras o legumbres y, además, muchos alimentos procesados tienen aditivos que contienen fósforo. La determinación del contenido de fósforo en frutas es importante ya que proporciona información crucial para diversos campos, desde la salud humana hasta la investigación agrícola y la conformidad con regulaciones alimentarias.

En este Trabajo Fin de Grado se va a determinar la concentración de fosforo, a través de la medida de la concentración de fosfato, en tres frutas: la uva pasa, la almendra molida y la avellana. Los niveles típicos de fósforo en cada fruta son: en torno a 111 mg de fósforo/100 g muestra en el caso de la uva pasa, en torno a 510 mg de fósforo/100 g de muestra en la almendra molida y en torno a 401 mg de fósforo/100 g de muestra en la avellana. Estos niveles se compararon con los niveles de fósforo obtenidos en los análisis llevados a cabo.

Se valoraron diferentes métodos susceptibles de aplicación hasta llegar a la conclusión de que el más apropiado era el análisis por inyección en flujo (FIA) con detección espectrofotométrica del compuesto conocido como “azul de molibdeno”.

Se han determinado los siguientes niveles de fósforo por 100 gramos de muestra seca y los resultados de calibrado directo han sido comparados con los obtenidos por adiciones estándar. Se obtuvieron: 221 mg de fósforo en el caso de la almendra molida; 93,9 mg de fósforo en la avellana y 35,1 mg de fósforo en la uva pasa. Los valores obtenidos de la concentración de fósforo en las tres muestras son inferiores a los esperados, lo que puede deberse a varios factores como el suelo donde han crecido estas frutas, zonas de cultivo y variaciones geográficas pueden afectar a la concentración de fósforo en las frutas.

2. INTRODUCCIÓN

El fósforo fue descubierto en 1669 por el alquimista alemán Henning Brandt. Era un sólido blanco que en la oscuridad transmitía la luz, por ello recibió el nombre phos *phorus*, que en griego significa “portador de la luz”. Es el undécimo elemento más abundante en la superficie de la tierra y se encuentra más comúnmente en forma de fosfato. Es un mineral esencial para la salud, ya que desempeña un papel clave en la formación de huesos y dientes, así como en funciones metabólicas y celulares. También, interviene en la utilización de los hidratos de carbono y las grasas en el organismo, en el correcto empleo de la vitamina B, y ayuda a un correcto funcionamiento de las funciones nerviosa y muscular.



Determinación de fósforo en frutas

Por tanto, conocer la cantidad de fósforo en alimentos es necesaria para comprender su valor nutricional y su impacto en la salud. Por ejemplo, es de interés la determinación del contenido de fósforo en frutas ya que proporciona información crucial para diversos campos, desde la salud humana hasta la investigación agrícola y la conformidad con regulaciones alimentarias:

*En la investigación agrícola, es útil para comprender las necesidades nutricionales de las plantas que, más tarde, influirán en el crecimiento de las frutas. El fósforo es vital en la agricultura ya que contribuye en el crecimiento de los cultivos de manera sana y fuerte. También, es uno de los agentes principales que hacen posible la fotosíntesis. Como se puede observar en la Figura 1, se puede saber si una planta tiene déficit de fósforo a simple vista, ya que sus hojas son más débiles y suelen presentar un color violeta (1).



Figura 1. Representación del césped con déficit de fósforo (1).

*En el caso de las normativas alimentarias, es importante determinar el contenido de fósforo en frutas para cumplir con las regulaciones y poder proporcionar información precisa a los consumidores. Cada tipo de fruta presenta diferentes niveles de fósforo, pero no existen unos niveles máximos de fósforo que puedan suponer un riesgo para la salud.

2.1. FÓSFORO EN LA SALUD HUMANA

El fósforo forma parte de muchos nutrientes que el ser humano necesita ingerir, ya que es imprescindible para muchas funciones fisiológicas. El fósforo es un mineral que constituye alrededor del 1% del peso corporal total de una persona (2). La mayor parte del fósforo se encuentra formando parte de huesos y dientes, aunque también interviene en muchas funciones fisiológicas entre las que cabe destacar:

- Metabolismo de la energía, formando parte del ATP (trifosfato de adenosina).
- Estructura y función de la membrana celular, formando parte de los fosfolípidos.
- Tampón intracelular y extracelular.
- Activación de las reacciones en el metabolismo, mediante enzimas y proteínas.

Es esencial para la vida por su papel en numerosas moléculas clave como el ADN (ácido desoxirribonucleico) y el ARN (ácido ribonucleico) ya que el material genético consiste en unidades



Determinación de fósforo en frutas

azúcar unidas mediante fosfatos para formar las cadenas en hélice; por tanto, el fosfato forma parte del esqueleto o armazón de las moléculas que son esenciales para la vida, ya que contienen la información genética (3).

También es importante en el metabolismo de las células, ya que la formación e hidrólisis de los enlaces P-O sirve como almacén de energía en el trifosfato de adenosina (ATP), molécula que concentra las reservas de energía a nivel celular y las libera cuando las necesitamos. La energía que se libera en esta hidrólisis se utiliza para la contracción muscular y para otras muchas reacciones metabólicas. Otra de sus funciones ya mencionadas anteriormente es la de la activación o inactivación de las reacciones en el metabolismo, ya que el fósforo activa y desactiva enzimas y proteínas, mediante la ganancia o pérdida de grupos fosfato (4).

El fósforo es un componente que se encuentra en la mayoría de los alimentos de forma natural y se utiliza también en aditivos alimentarios usados en el procesado de alimentos y está presente también en las bebidas gaseosas en forma de ácido fosfórico. Las principales fuentes alimenticias de fósforo son los productos lácteos, la carne, productos de cereales y el pescado, aunque también se pueden encontrar alimentos con menores cantidades de fósforo como pueden ser las frutas o las verduras (2). En los alimentos puede encontrarse en forma de fósforo inorgánico o fósforo orgánico. El fósforo inorgánico se encuentra en forma de sales y se absorbe fácilmente en el tracto intestinal mientras que el fósforo orgánico de origen vegetal abunda en semillas, legumbres y frutos secos y su absorción es más baja. Esto se debe a que el fósforo de la proteína vegetal se almacena en forma de ácido fítico o fitato y el hombre no expresa el enzima fitasa, por ello solo una parte será absorbida (5, 6).

El ácido fítico, cuya estructura molecular aparece en la Figura 2, es una molécula rica en fosfato, que forma complejos muy estables con varios metales. Los fitatos sirven como almacenamiento de fósforo y son considerados anti nutrientes, debido a su capacidad de interferir en la absorción de los nutrientes ya que tiene gran afinidad por diversos cationes formando quelatos (6). También tienen otras propiedades beneficiosas como actividad anticancerígena y antioxidante.

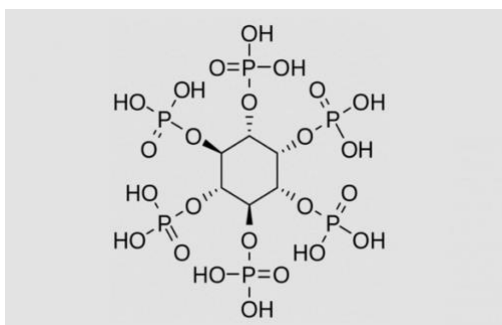


Figura 2. Estructura molecular del ácido fítico (7)

Como ya se ha indicado, algunos alimentos que contienen fósforo de manera natural son, por ejemplo, las legumbres, las frutas y los cereales, pero, aquellos alimentos a los cuales se les añade fósforo



Determinación de fósforo en frutas

mediante aditivos pueden suponer un riesgo para la salud humana, ya que la ingesta diaria recomendada (IDR) para una persona joven saludable es de 700 mg/día. Si la cantidad de fósforo en el organismo no es la correcta, puede dar lugar a enfermedades. Una deficiencia en los niveles de fósforo puede causar enfermedades como anemia, dolor óseo, debilidad muscular y mayor susceptibilidad a infecciones. Por el contrario, un exceso de fósforo puede causar también enfermedades importantes ya que, por ejemplo, se ha descubierto que puede activar una ruta metabólica que estimula el crecimiento de los tumores de pulmón (8). Por eso se suele decir que “no es bueno ni el exceso ni el defecto”.

2.2. VALORACIÓN DE DISTINTAS TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE FÓSFORO

Se han descrito varios métodos para determinar fósforo en frutas. Estos métodos deben tener buen límite de detección, buena selectividad y, además, es conveniente que empleen una técnica rápida y de bajo coste.

Una de las técnicas que podría cumplir con los requisitos mencionados en el párrafo anterior es la separación por cromatografía iónica mediante el uso de una columna con un polímero de intercambio aniónico, bien utilizando un detector de conductividad o empleando como detector un plasma acoplado por inducción con un espectrómetro de masas (ICP-MS) (9). En este último caso, si bien es más caro el empleo de un ICP-MS, evita interferencias al compararlo con el detector de conductividad ya que permite detectar de manera selectiva el fósforo. Tiene un límite de detección de 0,7 ppm y ofrece un calibrado lineal de concentración hasta las 400 ppm.

El empleo de sensores y biosensores tiene también importancia en la detección de fosfatos. Se encuentran comercialmente disponibles electrodos selectivos de iones los cuales permiten la determinación de iones específicos en una disolución, a través de la conversión de su actividad en potencial eléctrico (10), pero también se han desarrollado biosensores, por ejemplo, mediante la inmovilización de la enzima piruvato oxidasa. En este último caso, la presencia de fosfato en la muestra provoca la generación enzimática de peróxido de hidrógeno, que se monitoriza mediante un potencióstato y la señal es proporcional a la concentración de fosfato en la muestra (11, 12). Este método se caracteriza por sus rápidas mediciones y el gran rango de detección de concentraciones. Sin embargo, entre sus limitaciones se encuentra la dificultad de preparar de manera reproducible los electrodos sensores por personal no suficientemente entrenado.

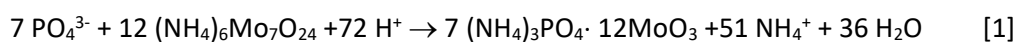
La técnica más comúnmente empleada para la determinación de fosfato se basa en detección por espectrofotometría de absorción molecular que involucra agentes químicos que producen cambios de



Determinación de fósforo en frutas

color al reaccionar mediante el contacto con determinadas disoluciones o sustratos. La estrategia más habitual para la determinación de fosfatos se basa en la formación de heteropoliácidos, seguida de una reducción para formar el compuesto conocido como azul de molibdeno, el cual presenta un intenso color azul (cuanto mayor es la intensidad de color azul producido mayor es la concentración de fosfatos en la muestra analizada) con muy buenos límites de detección.

Uno de los procedimientos más empleados se basa en la formación del heteropoliácido fosfomolibdico en medio ácido. En esta reacción se forma el intermedio $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4 \cdot 12 \text{MoO}_3$ que es de color amarillo. En la siguiente etapa, este intermedio se trata con un reductor y se reduce a un heteropoliácido que contiene una mezcla de Mo (V) y Mo (VI), más conocido como azul de molibdeno, el cuál presenta una elevada absorción en la zona visible del espectro. Las reacciones secuenciales que tienen lugar son:



Se han propuesto varios agentes reductores, como sulfuro de sodio, cloruro de estaño (II), ácido ascórbico o hidrato de hidracina. La mayoría de ellos sufren desventajas como inestabilidad del color del producto generado, interferencias de arsénico, o absorción del blanco. Si bien se ha descrito que el empleo de hidrato de hidracina aporta como principal ventaja la obtención de blancos experimentales incoloros (13, 14), el uso habitual de hidrato de hidracina no es conveniente, ya que la exposición a este compuesto puede causar dolor de cabeza, náusea, vómitos, mareo, entre otros.

Por todo lo anteriormente descrito, y teniendo en cuenta la disponibilidad de equipamiento en el laboratorio, en el presente Trabajo Fin de Grado (TFG) se ha optado por el empleo de un método de detección espectrofotométrica, basado en la formación de azul de molibdeno utilizando como reductor ácido ascórbico. A fin de evitar los problemas asociados a inestabilidad del producto generado, se ha optado por emplear un sistema de análisis de inyección en flujo (FIA), que como se verá en el apartado siguiente, permite realizar medidas de la reacción a tiempos exactos.

2.3. ANÁLISIS POR INYECCIÓN EN FLUJO

Como se ha indicado al final del apartado anterior, el método escogido para la determinación de fosfato en frutas en este TFG se basa en la combinación de la técnica de análisis por inyección en flujo con la detección espectrofotométrica. La decisión de emplear FIA se basa en sus numerosas ventajas:



Determinación de fósforo en frutas

- Se basa en el empleo de un flujo constante muy reproducible, que ofrece una buena precisión analítica.
- Permite medir muchas muestras en poco tiempo y requiere pequeños volúmenes de muestra.
- Es adecuado para la medida de reacciones en las que se generan compuestos inestables, ya que tanto patrones como muestras se medirán tras transcurrir un intervalo constante de tiempo.
- Requiere pequeños volúmenes de reactivos, lo que permite ahorrar costes, además de ser respetuoso con el medio ambiente.
- Es viable la automatización de los análisis.

El análisis por inyección en flujo tiene su antecedente en otro método llamado análisis de flujo segmentado (SFA). En SFA las muestras son aspiradas secuencialmente y entre ellas se sitúan burbujas de aire para asegurar la homogeneidad química de la inyección sin riesgo de contaminación entre muestras aspiradas de manera continua. Estas burbujas también impiden la dispersión de la muestra y facilitan la generación de un flujo turbulento. Las burbujas de aire deben ser eliminadas antes de que lleguen a la celda de flujo, que está localizada en el detector.

Sin embargo, la introducción de las burbujas de aire tiene una serie de inconvenientes como son la compresibilidad de la fase gaseosa que afecta a la forma de la señal, la baja eficiencia del separador de fases gas- líquido en línea (es importante la eliminación de dichas burbujas pues pueden perturbar la detección con muchas técnicas instrumentales), la imposibilidad de aplicar métodos de flujo detenido y la dificultad de miniaturizar el analizador (15).

Por todos estos inconvenientes, el SFA ha sido reemplazado por técnicas con el flujo no segmentado como el análisis por inyección en flujo que se utilizará en este TFG cuyas ventajas, como por ejemplo su configuración extremadamente simple, su fácil operación y bajo costo, además de las mencionadas anteriormente, reflejan la preferencia de su utilización.

En la Figura 3 se recoge un diagrama de los componentes de un sistema básico de análisis por inyección en flujo, al cual se suelen añadir uno o más canales tras el sistema de introducción de la muestra.

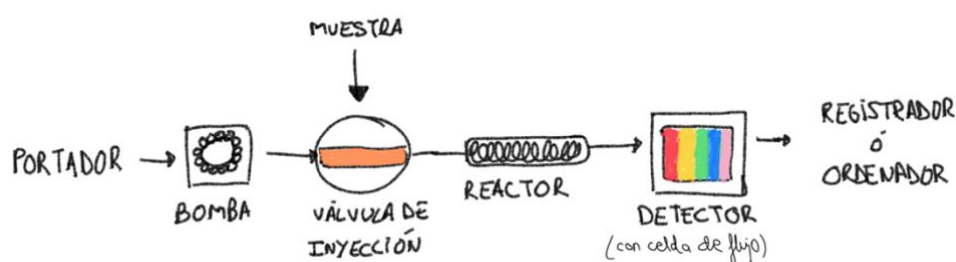


Figura 3. Componentes básicos de un sistema de análisis de inyección en flujo. (elaboración propia)



Determinación de fósforo en frutas

La unidad de propulsión (bomba) tiene como objetivo proporcionar un flujo constante de una o varias disoluciones. Este caudal tiene que estar ausente de pulsos y ser perfectamente reproducible. Las bombas más utilizadas con estos fines son las bombas peristálticas que poseen un tambor con rodillos sobre los cuales se encuentran unos tubos por los que circulan las disoluciones gracias a la presión temporal que se genera.

La muestra se suele introducir mediante un sistema de inyección, generalmente una válvula rotatoria de 6 vías (Figura 4), la cual permite introducir un volumen exacto de la muestra, con gran reproducibilidad de operación y sin interrumpir el flujo.

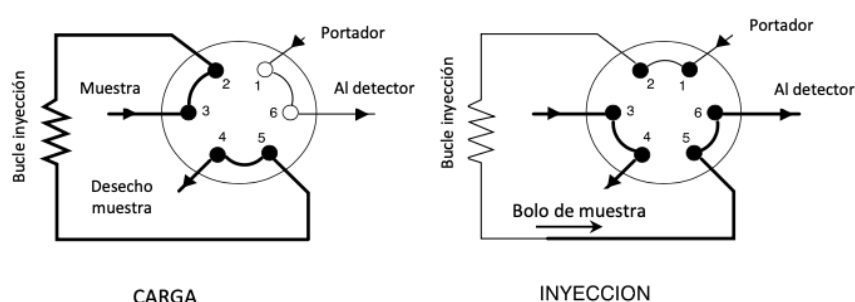


Figura 4. Esquema de las posiciones “carga” e “inyección” de una válvula rotatoria de 6 vías.

Como se puede observar en la Figura 4, estas válvulas ofrecen dos posiciones, carga e inyección. En la posición de carga se llena el bucle de inyección con la muestra y, en la posición de inyección, la muestra que se encuentra en el bucle es arrastrada por el fluido portador hacia el detector.

La muestra introducida en el sistema y los reactivos llegan al tubo o “coil” de reacción, en donde tiene lugar la reacción mediante la cual se genera la forma medible del analito.

Finalmente, se encuentra el sistema de detección, con celda de flujo, incorporado a un instrumento que transforma la concentración de la forma medible del analito a una señal que se genera, se procesa y se recoge de forma continua, dado que se trata de una señal transitoria (en función del tiempo), la cual es denominada diagrama. La forma de la señal FIA que se obtiene cuando se inyecta una muestra, depende del tiempo en el que la muestra inyectada está dentro del sistema. Si el tiempo que permanece la muestra en el sistema es muy corto y la reacción que da lugar a la señal analítica no tuvo lugar, no se generará ningún pico; en cambio, si el tiempo es demasiado largo los picos serán muy anchos.

Por lo tanto, el tiempo es un factor muy importante en la detección espectrofotométrica con un sistema FIA, por lo que es necesario investigar cuál es el tiempo de residencia óptimo en nuestro procedimiento. Para ello, se ensayan distintas velocidades de reacción, distintas temperaturas o



Determinación de fósforo en frutas

distintos reactores hasta que se obtengan unos parámetros óptimos de medida con los cuales se trabajará durante todo el experimento.

2.4. DIGESTIÓN ÁCIDA ASISTIDA POR MICROONDAS

El pretratamiento más común en matrices alimentarias es el usado en este trabajo, digestión ácida asistida por microondas. Esta técnica fue descrita por primera vez a mediados de los años setenta y, desde entonces se han ido introduciendo numerosas mejoras sobre ella. El calentamiento que se produce en esta digestión es provocado por dichas ondas, microondas, que son un tipo de radiación electromagnética cuyas longitudes de onda se encuentran entre las de radio y las de radiación infrarroja.

Los métodos que utilizan hornos de microondas para la preparación de las muestras tienden a ser precisos, seguros y rápidos, además tienen capacidad para digerir varias muestras de manera simultánea, y permiten la monitorización y automatización del proceso (16, 17).

Esta digestión es útil ya que se minimiza la pérdida de analito y contaminación debido a la utilización de recipientes cerrados durante la digestión, pero también presenta desventajas. La principal sería la limitación en la cantidad de muestra que se puede digerir y el volumen de reactivos que se puede utilizar, ya que un exceso de ambos puede provocar la explosión del reactor.

Se pueden utilizar muchos agentes oxidantes, entre ellos el HNO_3 concentrado se utiliza debido a su alta pureza y su gran capacidad de oxidación. Su utilización tiene grandes beneficios, pero también se deben tener en cuenta algunas de sus desventajas, como la alta acidez residual que puede afectar en los posteriores sistemas de medida. Además, un tema que se ha estado estudiando durante muchos años es el desarrollo de métodos basados en la “química verde”, es decir que sean económicos y generen pocos residuos. Por lo tanto, un método que produzca residuos altamente ácidos no cumpliría con estos propósitos e incidiría en la problemática de la contaminación a nivel mundial.

Se han estudiado métodos en los que se combina el uso de HNO_3 concentrado con H_2O_2 como oxidante para así mejorar la eficiencia de la digestión de la muestra. Otros parámetros importantes en la digestión asistida por microondas, además de los reactivos, son la presión y la temperatura, dado que son necesarios sistemas de alta presión y altas temperaturas para mejorar la capacidad de digestión (18).

En este proyecto se ha utilizado como reactivo, una mezcla $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$. La utilización de los volúmenes de los reactivos debe ser adecuada, para así no provocar la pérdida del analito.

Cada horno microondas viene acompañado de una guía de instrucciones donde se incluyen normas para el encendido, funcionamiento y apagado. Es muy importante conocerlas y cumplirlas, ya no solo para la obtención de unos buenos resultados sino también para un cuidado del material del laboratorio.



3. OBJETIVOS

El objetivo general de este TFG es la determinación de fósforo en tres frutas. Este objetivo general se pretende abordar a través de los objetivos parciales que se recogen a continuación:

- Seleccionar el método más adecuado para determinar fosfato en frutas.
- Realizar el montaje del equipamiento experimental y optimizarlo de manera adecuada.
- Determinar la concentración de fosfato en muestras de tres frutas mediante análisis de inyección en flujo con detección espectrofotométrica.
- Contrastar los resultados obtenidos con datos estipulados.

4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

4.1. INSTRUMENTACIÓN

- Bomba peristáltica Masterflex Ismatec Microflow
- Válvula de inyección Rheodyne con bucle de inyección de 50 μ L.
- Tubo de teflón de 0,5 mm de diámetro interno.
- Celda de flujo Hellma Mod. 178.712 Q2, con un paso óptico de 10 mm.
- Thermo Scientific Espectrofotómetro visible 30 controlado por ordenador.
- 3 botellas ámbar de vidrio para contener las fases A, B y C.
- Filtro de jeringa
- Matraces aforados de 10,25,50,100 y 1000 mL.
- Vasos de precipitados
- Micropipetas
- Agitadores e imanes
- Ordenador para registrar la señal del espectrofotómetro
- Sistema de microondas Ethos 1 de Milestone Srl. (Soriso, Italia)

4.2. REACTIVOS

- Sal de molibdeno: $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ (LabKem, >99%)
- Ácido nítrico (HNO_3) (AnalaR NORMAPUR, 60%)
- Ácido ascórbico (LabKem, >99%)
- Glicerina (Prolabo, >99,5%)
- Sal de hidrógeno-fosfato de potasio: (KH_2PO_4) (Scharlau, 99,5%)
- Ácido sulfúrico (H_2SO_4) (MERCK, 95-97%)
- Peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Supelco, 30%)
- Hidróxido de potasio (KOH) (Scharlau, >90%)



4.3. PROCEDIMIENTO OPERATIVO

En este TFG se va a llevar a cabo la determinación de fosfato en frutas mediante un sistema FIA con detección espectrofotométrica utilizando como reacción de desarrollo del color, la reacción de formación del heteropoliácido fosfomolibdico en medio ácido. En esta reacción se forma el intermedio $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4 \cdot 12 \text{MoO}_3$ que es de color amarillo. En la siguiente etapa, este compuesto se reduce a un heteropoliácido que contiene una mezcla de Mo (V) y Mo (VI), más conocido como azul de molibdeno el cuál presenta una gran absorción en el rango visible del espectro. Las reacciones que tienen lugar se encuentran recogidas en el apartado 2.2 de esta Memoria, como reacciones [1] y [2].

Se trabaja con un sistema FIA con 3 disoluciones portadoras que llamaremos A, B y C que fluyen a través de canales paralelos y que se van uniendo secuencialmente a través de piezas con forma de T. Tras atravesar cada pieza en T pasan a través de una zona de reacción que tiene una longitud adecuada. La fase A es agua destilada, la fase B es una disolución de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ en HNO_3 0,2M y la fase C es una disolución de ácido ascórbico en glicerina. Se trabaja con estos reactivos en concreto ya que son los necesarios para convertir el analito en una forma medible; en este caso, desarrollan un complejo de color azul que presenta una intensa absorción de radiación en la región visible del espectro. Las lecturas de absorbancia en el espectrómetro se realizan a la longitud de onda que produce máxima absorción (660 nm).

La Figura 5 recoge un esquema de la disposición FIA empleada en este TFG:

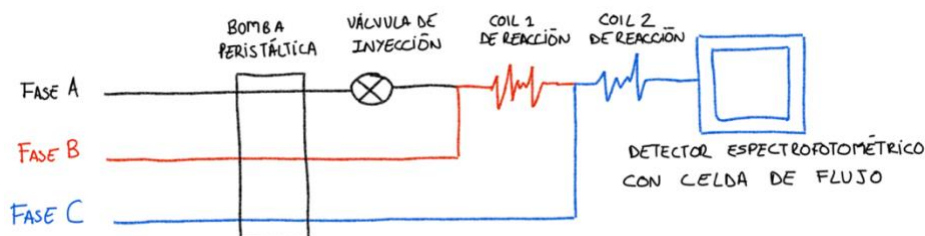


Figura 5. Esquema del sistema de inyección en flujo empleado en este TFG.

4.3.1. PREPARACIÓN DE LAS FASES

Todos los cálculos se detallan en el apartado “Anexo” del trabajo.

- Fase A: 1 L de agua destilada.
- Fase B: Disolución 7 g/L de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ en HNO_3 0,2M.

Se añade la cantidad correspondiente de HNO_3 puro a un vaso de precipitados con agua destilada. Después, se añade la sal de molibdeno mientras se agita para favorecer su disolución. Una vez disuelto, se transfiere a una botella de 1L opaca, la cual se utilizará durante el transcurso de este trabajo.

Es importante que todas estas operaciones se realicen en campana extractora de humos ya que se trabaja con un ácido fuerte.



Determinación de fósforo en frutas

- Fase C: Disolución al 4% (p/v) de ácido ascórbico en disolución acuosa de glicerina al 1% (p/v).

Se añaden las cantidades necesarias de agua destilada, ácido ascórbico y glicerina a un vaso de precipitados. Una vez disuelto, se introduce en una botella de 1L opaca, listo para utilizar.

Como se observa en la Figura 5 y en las reacciones [1] y [2], la Fase A (agua destilada) impulsa la muestra inyectada hasta el tubo de reacción 1 en donde reacciona con la Fase B (compuesta por la sal de molibdeno) y se forma el compuesto intermedio de color amarillo. Después, en el tubo de reacción 2 este compuesto intermedio reacciona con la Fase C (con ácido ascórbico) que da lugar al complejo azul de molibdeno.

4.3.2. PUESTA A PUNTO DEL MÉTODO ANALÍTICO

Cada día, antes de cualquier operación se pasa por todos los canales ácido nítrico al 2% y agua destilada para limpiar y asegurarse de que no queden ni burbujas ni restos de contaminantes.

Calibración de la bomba peristáltica.

La bomba peristáltica produce una velocidad de flujo que depende de las revoluciones por minuto (rpm) a las que gira el rotor y del grosor del tubo que comprime. Se debe calibrar la bomba peristáltica, a fin de transformar los caudales obtenidos a diferentes rpm en unidades de mL/min. Para ello, se bombea agua destilada por los tres canales y se mide, en un tubo de ensayo graduado que colocaremos a la salida del detector, qué volumen se obtiene tras 1 min cuando se varían las revoluciones por minuto de la bomba. Se estudiaron 10 rpm, 20 rpm, 50 rpm y 70 rpm.

Estudio del efecto de la velocidad de flujo en la señal analítica.

A fin de optimizar nuestro método, a partir de la sal KH_2PO_4 , se prepara un patrón de 25 mg/L en 25 mL, cuya preparación se detalla en el apartado “Anexo” y se inyecta a tres velocidades de flujo (4 mL/min, 3 mL/min y 1 mL/min), a fin de seleccionar aquella que proporcione una mayor señal analítica. Para ello se introducirán tres réplicas de cada velocidad de flujo.

Estudio de las características analíticas del método: rango lineal de calibración analítica y límite de detección.

Con el caudal seleccionado, se estudiará el rango lineal con concentraciones crecientes del patrón de fosfato, comenzando por 0 mg/L (blanco), 2 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L y 50 mg/L, y se investigará hasta qué concentración es lineal. Para este estudio se realizarán tres inyecciones de cada patrón de fosfato. Asimismo, se evaluará el límite de detección del método puesto a punto.

4.3.3. PROCEDIMIENTO DE PUESTA EN DISOLUCIÓN DE LAS MUESTRAS

En este trabajo se analizaron los tres tipos de fruta: uva pasa, avellana y almendra molida. Estas frutas deben ser puestas en disolución teniendo en cuenta que parte del fosfato está unido a biomoléculas (ácidos nucleicos y fosfolípidos).



Determinación de fósforo en frutas

Para ello, primero de todo, se cortan en trozos pequeños para que su puesta en disolución sea más fácil, y se homogeniza la muestra con ayuda de un mortero. Se pesan, de manera exacta, en torno a 300 mg de cada muestra por triplicado y, a continuación, se lleva a cabo la digestión calentando en un horno microondas para así destruir de manera rápida la matriz orgánica de las frutas sin que queden residuos sólidos.

El programa de tiempos y temperatura elegido asciende la temperatura hasta 180°C en 10 minutos y después asciende hasta 200°C hasta llegar a los 50 minutos, ya que en este intervalo se consigue la disolución total de la muestra. El volumen mínimo de muestra es de 8 mL, por lo tanto, dado que se utiliza una mezcla de HNO₃ y H₂O₂ en una proporción 2:1, se añaden 6,7 mL de HNO₃ y 3,3 mL de H₂O₂ para así tener al menos 10 mL (19).

Tras esta digestión por microondas se diluye la disolución resultante con 10 mL de agua destilada para que así la posterior neutralización no sea tan brusca. El pH adecuado tras la neutralización está entre 6.0 y 7.0 para que el fósforo sea más soluble y disponible. Este ajuste de pH se realiza en un pH metro utilizando una disolución de KOH saturada para neutralizar el ácido residual. Una vez se ajusta el pH, se lleva la disolución a un volumen adecuado (puede ser 50 mL o 100 mL) y conocido, por lo que se tienen 12 disoluciones que corresponden a cada una de las muestras por triplicado más el blanco en cada caso.

4.3.4. PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS TRAS SU PUESTA EN DISOLUCIÓN

Una vez se ha realizado el calibrado, se procede a la medida analítica de las muestras preparadas. Antes de inyectar la muestra en el sistema, esta se pasa por un filtro de jeringa (comúnmente utilizados en HPLC) para así evitar cualquier tipo de entrada de algún sólido en suspensión al sistema FIA. Cada una de las muestras se inyecta por triplicado en el sistema y se obtienen los correspondientes valores de absorbancia.

En una primera etapa se investigará si la dilución ensayada para la muestra entra dentro del intervalo de calibración lineal, en el caso de que no sea así se ensayarán otras diluciones.

Finalmente, a fin de evaluar si el método puesto a punto para la determinación de frutas tiene efectos de matriz, se procederá a realizar un procedimiento de adiciones estándar para cada uno de los tipos de fruta. En este caso, se prepararán matraces con volúmenes constantes de muestra, a los que se añadirán volúmenes crecientes de patrón de fosfato y se enrasarán. En la preparación de estos matraces es importante tener en cuenta que la concentración total de fosfato esperable (procedente de la muestra más el añadido del patrón) no supere el valor máximo del rango de concentración lineal.



5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. CALIBRACIÓN DE LA BOMBA PERISTÁLTICA

En primer lugar, se realizó la calibración de la bomba peristáltica para conocer los caudales en unidades (mL/min), y así conocer el caudal con el que será óptimo trabajar. De esta manera, como se explicó anteriormente, midiendo los mililitros obtenidos tras variar las velocidades de la bomba se obtiene una recta que se representa en la Figura 6.

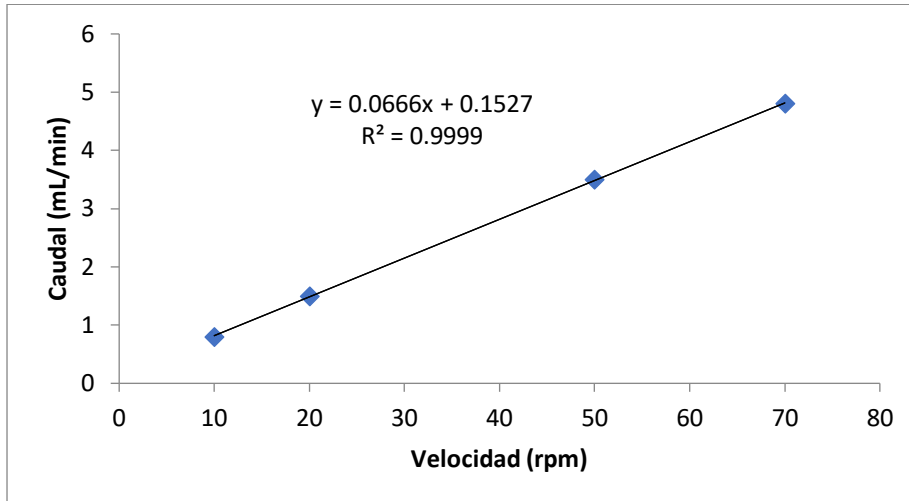


Figura 6. Recta para el cálculo del caudal de la bomba en mL/min frente a la velocidad en rpm.

Tras obtener la recta para el cálculo del caudal de la bomba, se realizan tres medidas de un patrón de 25 mg/L de fosfato, escogiendo como caudales tres que se encuentren dentro del rango lineal. Utilizando la ecuación de la recta de la Figura 6 se obtiene:

- Para el caudal de 4 mL/min \rightarrow 58,3 rpm \cong 58 rpm
- Para el caudal de 3 mL/min \rightarrow 43,15 rpm \cong 43 rpm
- Para el caudal de 1 mL/min \rightarrow 12,84 rpm \cong 13 rpm

Se realizan 3 inyecciones del patrón de 25 mg/L de fosfato a cada una de las velocidades de flujo obteniendo así las correspondientes Figuras 7, 8 y 9.

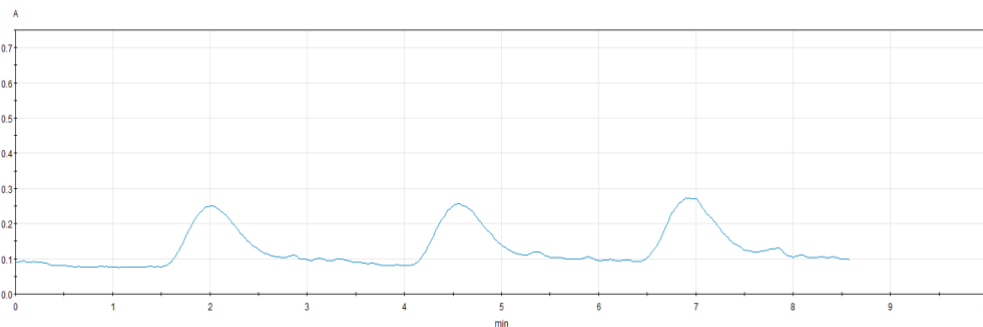


Figura 7. Medidas del patrón de 25 mg/L de fosfato para el caudal de 1 mL/min donde se representa la absorbancia en el eje y y el tiempo de medida en el eje x.



Determinación de fósforo en frutas

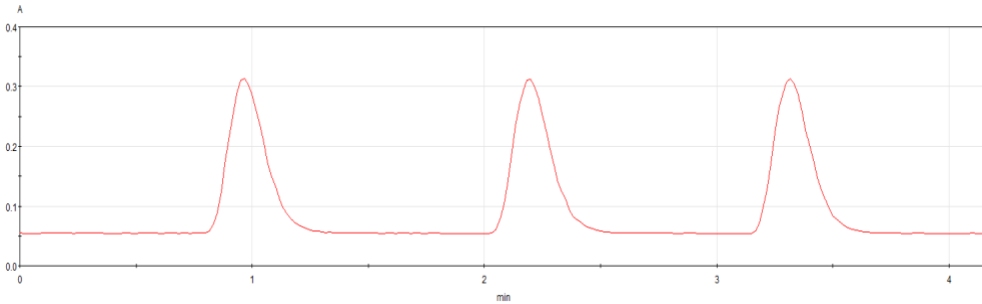


Figura 8. Medidas del patrón de 25 mg/L de fosfato para el caudal de 3 mL/min donde se representa la absorbancia en el eje y y el tiempo de medida en el eje x.

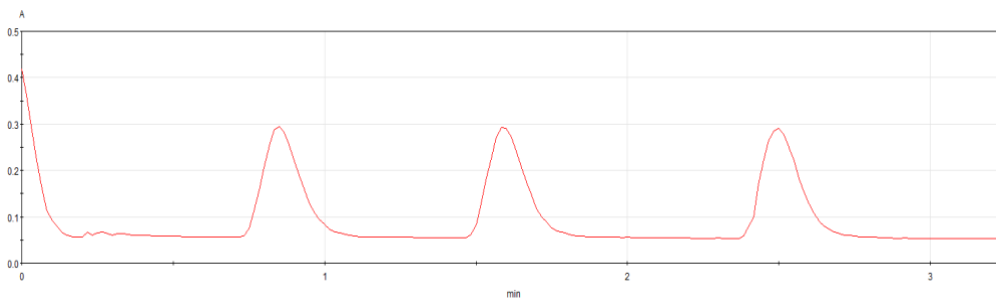


Figura 9. Medidas del patrón de 25 mg/L de fosfato para el caudal de 4 mL/min donde se representa la absorbancia en el eje y y el tiempo de medida en el eje x.

En las Figuras 7, 8 y 9 se observa un fenómeno que puede llamar la atención: la línea base no es constante en una absorbancia igual a 0, que es lo que cabe esperar, sino que es un poco más alta. Esto puede ser debido a alguna pequeña contaminación en las disoluciones portadoras o que el “autocero” realizado en el instrumento no esté correcto; en cualquier caso, siempre se tomaron las señales netas. Comparando las Figuras 7, 8 y 9, se observa que la anchura de pico al caudal de 1 mL/min no es muy adecuada para el análisis ya que es demasiado ancho. En las Figuras 8 y 9 la anchura de pico es bastante adecuada para el análisis. En cuanto al tiempo de análisis a los tres caudales se observa que, a 1 mL/min el tiempo de análisis es demasiado largo, a 4 mL/min el tiempo de análisis es más corto y a 3 mL/min se obtiene un tiempo de análisis bastante coherente y adecuado para la medida. Además, dado que la reproducibilidad de la señal es mejor en el caso de 3 mL/min, este es el caudal seleccionado para ser utilizado a lo largo de todas las medidas del trabajo.

5.2. CURVA DE CALIBRADO

Se realizó la medida por triplicado de cada uno de los patrones preparados desde 2 hasta 50 mg/L (ppm), obteniendo los correspondientes valores de absorbancia de los cuales se calculó tanto la media como la desviación estándar para así poder calcular la recta de calibrado.

Las medidas realizadas se recogen en la Tabla 1.



Determinación de fósforo en frutas

Tabla 1. Resultados de la recta de calibrado del método. Se indican valores de absorbancia obtenidos para las distintas concentraciones estudiadas como media \pm desviación estándar de tres réplicas.

[PO ₄ ³⁻] (mg/L)	Absorbancia (u.a.)
0	0 \pm 0,001
2	0,019 \pm 0,002
5	0,0453 \pm 0,0015
10	0,1006 \pm 0,003
50	0,6656 \pm 0,041

Con los datos de la Tabla 1, se construye la recta de calibrado obteniendo la recta recogida en la Figura 10.

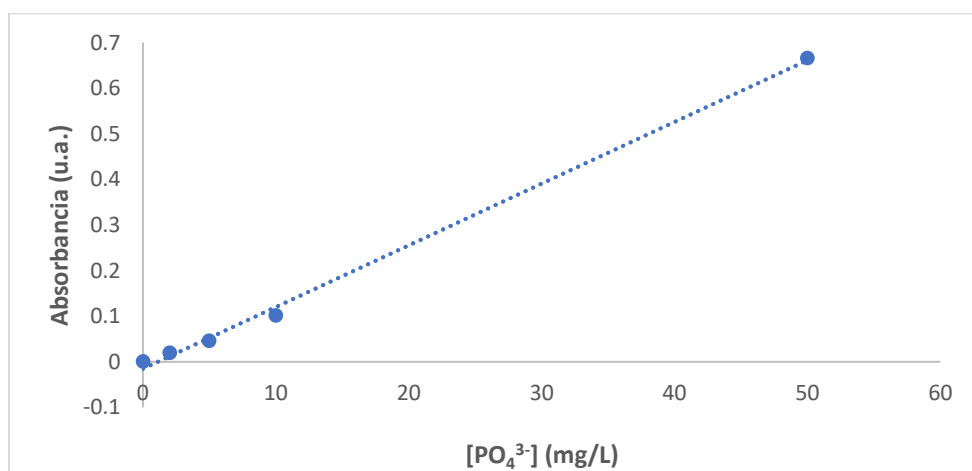


Figura 10. Recta patrón del método. Se representan los valores de absorbancia obtenidos para las distintas concentraciones estudiadas como media \pm desviación estándar de tres réplicas.

La ecuación de la recta obtenida mediante Excel es:

$$\text{Absorbancia} = 13,53 \times 10^{-3} [\text{PO}_4^{3-}] (1/\text{mg/L}) - 15,19 \times 10^{-3} \quad [3]$$

$$R^2 = 0,9977$$

Se obtienen también los errores tanto de la pendiente como de la ordenada en el origen:

Error de la pendiente: $3,8 \times 10^{-4}$ (1/mg/L)

Error de la ordenada en el origen: $8,6 \times 10^{-3}$

Para el cálculo del límite de detección (LOD) se siguieron dos métodos:

- El límite de detección calculado a partir de la desviación estándar del blanco ($\text{LOD} = 3 S_{\text{blanco}} / \text{pendiente}$) sabiendo que S_{blanco} tiene un valor de 0,001 (ruido del instrumento). Por lo tanto, $\text{LOD} = 0,22 \text{ mg/L}$.
- El límite de detección a partir de la ecuación de la recta ($\text{LOD} = 3 S_{\text{ordenada}} / \text{pendiente}$) utilizando el error de la ordenada en el origen, el cual se obtuvo un valor de $\text{LOD} = 1,91 \text{ mg/L}$.



Determinación de fósforo en frutas

En ambos casos el límite de detección con el procedimiento analítico puesto a punto es inferior a la concentración más baja medida (2 mg/L).

5.3. MUESTRAS

Una vez obtenida la recta de calibrado, se realizan las medidas de cada una de las muestras problema. Se analizan por triplicado cada una de las 3 muestras. Se obtienen las medidas de absorbancia y gracias a la recta de calibrado se puede obtener la concentración de fosfato que se tiene en cada una de las muestras.

Previamente, se ha pesado una pequeña cantidad de cada una de las muestras y se ha dejado secando en la estufa a unos 200 °C durante un día entero. Como las muestras tienen agua, por diferencia de peso se puede calcular la humedad, así como conocer el peso de las muestras secas, necesario para expresar el resultado.

- ALMENDRA MOLIDA

Para el cálculo de la humedad, en el caso de la almendra molida, se pesaron 0,5132 gramos y al día siguiente se obtuvieron 0,4676 gramos (almendra seca), por lo que se puede decir que la almendra molida tiene aproximadamente 0,0456 gramos de agua, lo que corresponde a un 8,9 % de humedad. Este porcentaje de humedad se tiene en cuenta en todas las muestras de almendra molida para expresar el resultado final en gramos de muestra seca (Tabla 2).

Tabla 2. Cantidad de cada muestra de almendra molida pesada (muestra húmeda) y cantidad de muestra seca teniendo en cuenta el porcentaje de humedad.

	Muestra húmeda (g)	Muestra seca (g)
Muestra 1	0,3015	0,2745
Muestra 2	0,3161	0,288
Muestra 3	0,3016	0,2748

La Tabla 3 recoge los valores de absorbancia obtenidos, que corresponden al valor de absorbancia medido de cada muestra menos el valor de absorbancia del blanco.

Tabla 3. Valores de las medidas de las muestras de almendra molida. Se indican los valores de absorbancia, así como su media.

ALMENDRA MOLIDA	Absorbancia (u.a.)	Absorbancia (u.a.)	Absorbancia (u.a.)	Media ± Desviación Estándar
Muestra 1	0,501	0,538	0,548	0,529 ± 0,025
Muestra 2	0,368	0,376	0,381	0,375 ± 0,007
Muestra 3	0,595	0,638	0,635	0,623 ± 0,024



Determinación de fósforo en frutas

A modo de ejemplo, la siguiente figura (Figura 11) recoge la gráfica de la señal obtenida para una de las muestras de almendra molida, concretamente, la muestra 2.

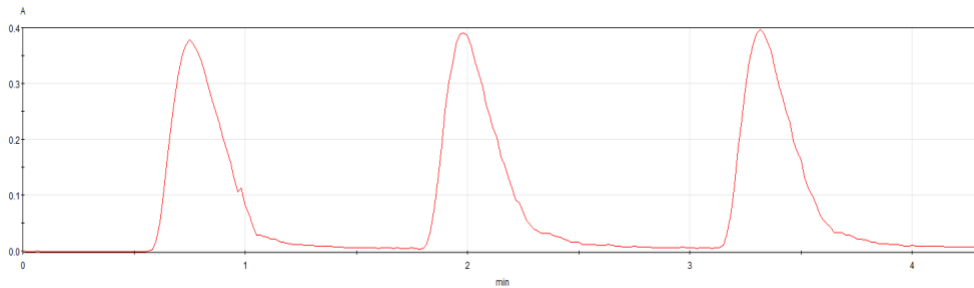


Figura 11. Gráfica de la señal obtenida para la muestra 2 de almendra molida, donde el eje y corresponde a la absorbancia y el eje x, al tiempo de medida (min).

Sustituyendo cada valor medio de absorbancia en la recta de calibrado se obtienen los valores mostrados en la Tabla 4.

Tabla 4. Valores de las concentraciones de fosfato en mg/L para cada una de las muestras de almendra molida.

	Concentración (mg/L)
Muestra 1	40,22
Muestra 2	28,84
Muestra 3	47,17

Teniendo en cuenta las diluciones a las que se llevó cada una de las muestras (Muestra 1 → 50 mL, Muestra 2 → 100 mL, Muestra 3 → 50 mL) se calcula la cantidad de fosfato que hay que cada matraz (Tabla 5).

Tabla 5. Cantidad de fosfato en cada matraz. Se indica el valor de los miligramos de fosfato en cada matraz teniendo en cuenta los volúmenes de los matraces utilizados.

	mg de PO_4^{3-} en cada matraz
Muestra 1	2,01
Muestra 2	2,88
Muestra 3	2,36

Finalmente, conociendo la cantidad de muestra seca de cada una de las muestras, se obtiene la concentración de fosfato por gramo de muestra seca (Tabla 6).

Tabla 6. Concentración de fosfato en cada muestra de almendra molida por gramo de muestra seca.

$[\text{PO}_4^{3-}]$ (mg /g muestra seca)
7,32
10,00
8,59

- $[\text{PO}_4^{3-}]$ en la almendra molida = $8,64 \pm 1,34$ mg PO_4^{3-} / g muestra seca.



Determinación de fósforo en frutas

Se expresa también el resultado como la concentración de fósforo presente en cada fruta, mediante un simple factor de conversión utilizando las masas molares.

- [P] en la almendra molida = $2,82 \pm 0,44$ mg P / g muestra seca

- AVELLANA

Se pesaron 0,5101 gramos de avellana (previamente molida para así facilitar su análisis) y al día siguiente se obtuvieron 0,4753 gramos (avellana seca), lo que quiere decir que la avellana tiene aproximadamente 0,035 gramos de agua, lo que corresponde a un 6,9 % de humedad. Este porcentaje de humedad se tiene en cuenta en todas las muestras de avellana para expresar el resultado final en gramos de muestra seca (Tabla 7).

Tabla 7. Cantidad de cada muestra de avellana pesada (muestra húmeda) y cantidad de muestra seca teniendo en cuenta el porcentaje de humedad.

	Muestra húmeda (g)	Muestra seca (g)
Muestra 1	0,3000	0,2793
Muestra 2	0,3245	0,3021
Muestra 3	0,3226	0,3003

Con las muestras de avellana pesadas se obtienen los valores recogidos en la Tabla 8. Los valores de absorbancia representados corresponden al valor de absorbancia medido de cada muestra menos el valor de absorbancia del blanco.

Tabla 8. Valores de las medidas de las muestras de avellana. Se indican los valores de absorbancia, así como su media.

AVELLANA	Absorbancia (u.a.)	Absorbancia (u.a.)	Absorbancia (u.a.)	Media \pm Desviación Estándar
Muestra 1	0,326	0,334	0,338	$0,333 \pm 0,006$
Muestra 2	0,123	0,128	0,13	$0,127 \pm 0,004$
Muestra 3	0,369	0,374	0,37	$0,371 \pm 0,003$

A modo de ejemplo, en la Figura 12 se representa la gráfica de la señal obtenida para una de las muestras de avellana, concretamente, la muestra 1.



Determinación de fósforo en frutas

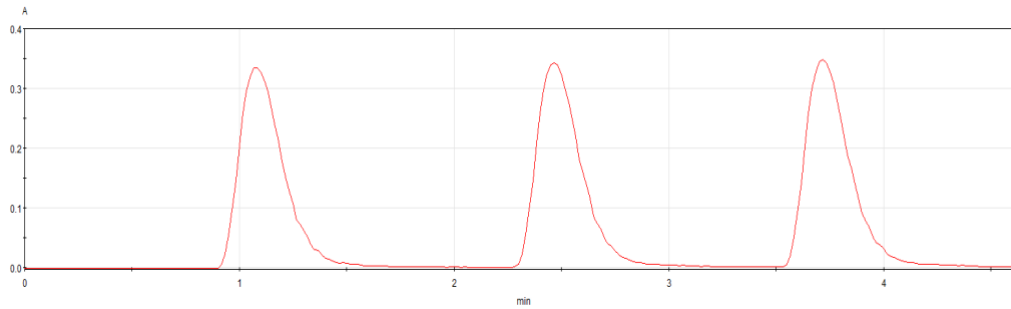


Figura 12. Gráfica de la señal obtenida para la muestra 1 de avellana, donde el eje y corresponde a la absorbancia y el eje x, al tiempo de medida (min).

Sustituyendo cada valor medio de absorbancia en la recta de calibrado se obtienen los valores representados en la Tabla 9.

Tabla 9. Valores de las concentraciones de fosfato en mg/L para cada una de las muestras de avellana.

	Concentración (mg/L)
Muestra 1	25,73
Muestra 2	10,51
Muestra 3	28,54

A partir de esta concentración obtenida experimentalmente, sabiendo las diluciones realizadas (Muestra 1 → 50 mL, Muestra 2 → 100 mL, Muestra 3 → 50 mL) se calcula la cantidad de fosfato en cada matraz (Tabla 10).

Tabla 10. Cantidad de fosfato en cada matraz. Se indica el valor de los miligramos de fosfato en cada matraz teniendo en cuenta los volúmenes de los matraces utilizados.

	mg de PO_4^{3-} en cada matraz
Muestra 1	1,29
Muestra 2	1,05
Muestra 3	1,43

Por último, sabiendo el peso de cada muestra seca, se obtiene la concentración de fosfato por gramo de muestra seca (Tabla 11).

Tabla 11. Concentración de fosfato en cada muestra de avellana por gramo de muestra seca.

$[\text{PO}_4^{3-}]$ (mg/g muestra seca)
4,62
3,48
4,76

- $[\text{PO}_4^{3-}]$ en la avellana = $4,3 \pm 0,7$ mg PO_4^{3-} / g muestra seca.

Si se expresa en concentración de fósforo;

- [P] en la avellana = $1,40 \pm 0,23$ mg P / g muestra seca



Determinación de fósforo en frutas

- UVA PASA

Se pesaron 2,7986 gramos de uva pasa y al día siguiente se obtuvieron 1,8401 gramos (uva pasa seca), lo que quiere decir que la uva pasa tiene aproximadamente 0,9585 gramos de agua, lo que corresponde a 34,25% de humedad. Este porcentaje de humedad se tiene en cuenta en todas las muestras de uva pasa y así expresar el resultado final en gramos de muestra seca (Tabla 12).

Tabla 12. Cantidad de cada muestra de uva pasa pesada (muestra húmeda) y cantidad de muestra seca teniendo en cuenta el porcentaje de humedad.

	Muestra húmeda (g)	Muestra seca (g)
Muestra 1	0,5300	0,3485
Muestra 2	0,5612	0,3712
Muestra 3	0,5482	0,3605

Con las muestras de uva pasa pesadas se obtienen los valores recogidos en la Tabla 13. Los valores de absorbancia representados corresponden al valor de absorbancia medido de cada muestra menos el valor de absorbancia del blanco.

Tabla 13. Valores de las medidas de las muestras de uva pasa. Se indican los valores de absorbancia, así como su media.

UVA PASA	Absorbancia (u.a.)	Absorbancia (u.a.)	Absorbancia (u.a.)	Media \pm Desviación Estándar
Muestra 1	0,063	0,063	0,063	0,063 \pm 0
Muestra 2	0,058	0,062	0,063	0,061 \pm 0,003
Muestra 3	0,204	0,21	0,214	0,209 \pm 0,005

A continuación, en la Figura 13 se representa la gráfica de la señal obtenida para una de las muestras de uva pasa, concretamente, la muestra 3, a modo de ejemplo.

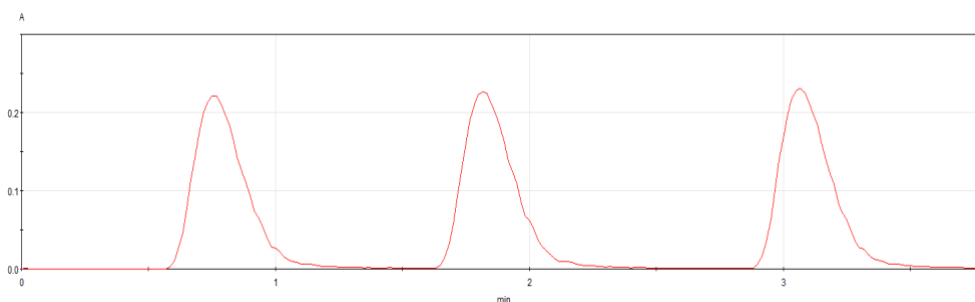


Figura 13. Gráfica de la señal obtenida para la muestra 3 de uva pasa, donde el eje y corresponde a la absorbancia y el eje x, al tiempo de medida (min).

A continuación, se sustituye cada valor medio de absorbancia en la recta de calibrado y se obtienen los valores representados en la Tabla 14.



Determinación de fósforo en frutas

Tabla 14. Valores de las concentraciones de fosfato en mg/L para cada una de las muestras de uva pasa.

	Concentración (mg/L)
Muestra 1	5,78
Muestra 2	5,63
Muestra 3	16,57

A partir de esta concentración y sabiendo las diluciones realizadas (Muestra 1 → 100 mL, Muestra 2 → 100 mL, Muestra 3 → 50 mL) se calcula la cantidad de fosfato en cada matraz. (Tabla 15).

Tabla 15. Cantidad de fosfato en cada matraz. Se indica el valor de los miligramos de fosfato en cada matraz teniendo en cuenta los volúmenes de los matraces utilizados.

	mg de $[\text{PO}_4^{3-}]$ en cada matraz
Muestra 1	0,58
Muestra 2	0,56
Muestra 3	0,83

Se observa que el tercer valor, correspondiente a la muestra 3, es un valor atípico. Puede deberse a algún fallo experimental (p.ej. contaminación), por lo que se descarta este tercer valor.

Sabiendo el peso de cada muestra seca, se obtiene la concentración de fosfato por gramo de muestra seca (Tabla 16).

Tabla 16. Concentración de fosfato en cada muestra de uva pasa por gramo de muestra seca.

$[\text{PO}_4^{3-}]$ (mg/g muestra seca)
1,66
1,51

- $[\text{PO}_4^{3-}]$ en la uva pasa = $1,59 \pm 0,11$ mg PO_4^{3-} / g muestra seca.

Si se expresa en concentración de fósforo presente en la muestra;

- $[\text{P}]$ en la uva pasa = $0,52 \pm 0,04$ mg P / g muestra seca

5.4. ADICIONES ESTÁNDAR

Se preparan adiciones estándar para cada una de las frutas para ver si el método aplicado está libre de efectos de matriz. Los cálculos se detallan en el apartado 'Anexo'. Observando los valores de absorbancia que se han obtenido en la medida de las muestras (vemos que son parecidos para las tres réplicas), las adiciones estándar se preparan a partir de las muestras almendra 1, avellana 1 y uva pasa 1.



Determinación de fósforo en frutas

- Almendra molida

Un suceso a destacar es que, durante la medida de los blancos de las muestras de almendra molida para la realización de adiciones estándar, se observó en la medida de la absorbancia que existía mucho ruido. Por ello, a partir de la segunda medida se cambió el tiempo de integración de 0,5 segundos a 1 segundo para así suavizar este ruido presente. Se mantuvo este tiempo de integración durante el resto de las medidas de las otras dos muestras.

Tabla 17. Datos de las adiciones estándar de la muestra de avellana.

Concentración (mg/L)	Absorbancia (u.a.)
0	0,337
10	0,467
20	0,537
40	0,718

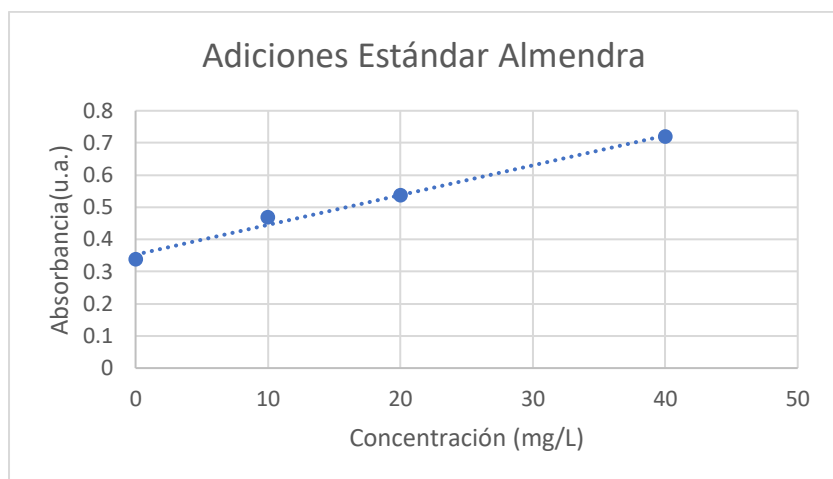


Figura 14. Representación de las adiciones estándar correspondientes a la muestra de almendra molida, donde el eje x corresponde a la concentración de cada adición (mg/L) y el eje y corresponde a la absorbancia obtenida (u.a.).

Se obtiene la siguiente recta:

$$\text{Absorbancia} = 9,3 \times 10^{-3} [\text{PO}_4^{3-}] (1/\text{mg/L}) + 0,3527 \quad [4]$$

$$R^2 = 0,9902$$

Como estamos trabajando con adiciones estándar, se calcula la concentración de fosfato cuando la Absorbancia es igual a 0 $\rightarrow [\text{PO}_4^{3-}] = 37,92 \text{ mg/L}$

Teniendo en cuenta las diluciones que se han hecho, se obtiene la concentración de fosfato en la muestra seca:

$$[\text{PO}_4^{3-}] = 6,78 \text{ mg PO}_4^{3-} / \text{g muestra seca}$$

Expresándolo en concentración de fósforo, se obtiene:

$$[\text{P}] = 2,21 \text{ mg P} / \text{g muestra seca}$$



Determinación de fósforo en frutas

- Avellana

Se preparan los tubos de la muestra de la misma manera que para la almendra molida, pero esta vez con la muestra de avellana 1.

Tabla 18. Datos de las adiciones estándar de la muestra de avellana.

Concentración (mg/L)	Absorbancia (u.a.)
0	0,195
10	0,312
20	0,451
40	0,679

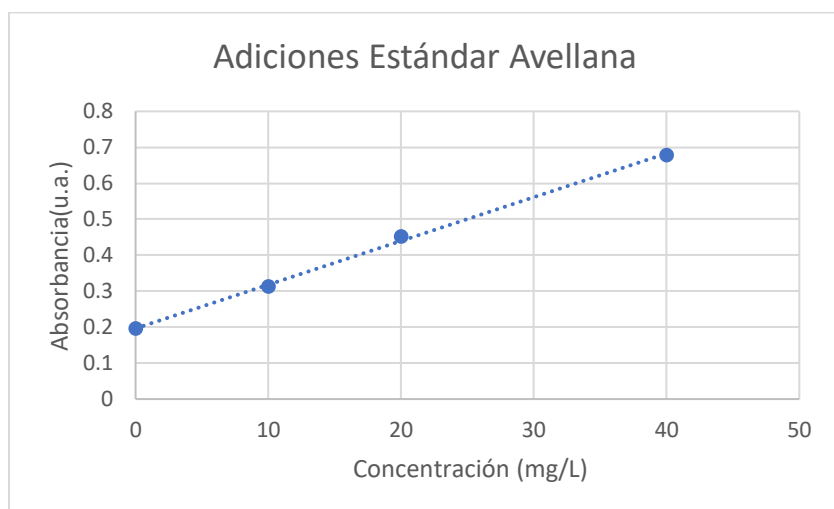


Figura 15. Representación de las adiciones estándar correspondientes a la muestra de avellana, donde el eje x corresponde a la concentración de cada adición (mg/L) y el eje y corresponde a la absorbancia obtenida (u.a.).

Se obtiene la recta:

$$\text{Absorbancia} = 0,0122 [\text{PO}_4^{3-}] (1/\text{mg/L}) + 0,1964 \quad [5]$$

$$R^2 = 0,9986$$

Sabiendo que la Absorbancia es igual a 0 \rightarrow $[\text{PO}_4^{3-}] = 16,10 \text{ mg/L}$

Teniendo en cuenta las diluciones realizadas, se obtiene la concentración de fosfato por gramo de muestra seca:

$$[\text{PO}_4^{3-}] = 2,88 \text{ mg PO}_4^{3-} / \text{g muestra seca}$$

Si se expresa en concentración de fósforo:

$$[\text{P}] = 0,94 \text{ mg P} / \text{g muestra seca}$$

- Uva pasa

Se preparan los tubos de la muestra de la misma manera que para la almendra molida y la avellana, pero con la muestra de uva pasa 1.



Determinación de fósforo en frutas

Tabla 19. Datos de las adiciones estándar de la muestra de uva pasa.

Concentración (mg/L)	Absorbancia (u.a.)
0	0,038
10	0,151
20	0,273
40	0,482

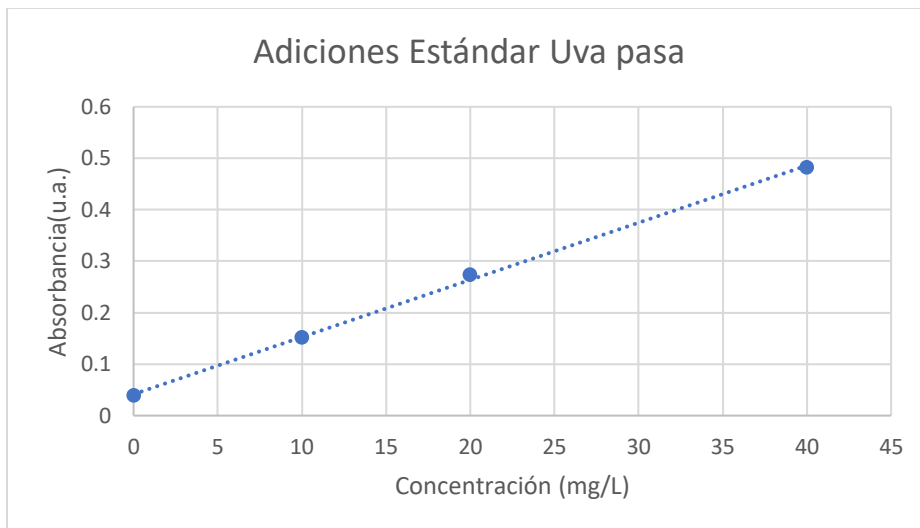


Figura 16. Representación de las adiciones estándar correspondientes a la muestra de uva pasa, donde el eje x corresponde a la concentración de cada adición (mg/L) y el eje y corresponde a la absorbancia obtenida (u.a.).

La ecuación de la recta obtenida se recoge a continuación:

$$\text{Absorbancia} = 0,0111 [\text{PO}_4^{3-}] (1/\text{mg/L}) + 0,0416 \quad [6]$$

$$R^2 = 0,9989$$

Sabiendo que la Absorbancia = 0 \rightarrow $[\text{PO}_4^{3-}] = 3,75 \text{ mg/L}$

Deshaciendo las diluciones realizadas, se obtiene una concentración de fosfato por gramos de muestra seca de $[\text{PO}_4^{3-}] = 1,08 \text{ mg PO}_4^{3-} / \text{g muestra seca}$.

Expresándolo en concentración de fósforo,

$$[\text{P}] = 0,35 \text{ mg P} / \text{g muestra seca}$$

Comparando las pendientes de las tres figuras correspondientes a cada muestra obtenidas por adición estándar con la pendiente obtenida por calibrado directo se pueden obtener las siguientes observaciones:

Se observa que la pendiente obtenida por adiciones estándar de la almendra (0,0093) difiere bastante de la pendiente del calibrado directo (0,0135). Si bien, las pendientes obtenidas por adiciones estándar para la avellana (0,0122) y para la uva pasa (0,0111) son más parecidas a la del calibrado directo, aún hay ciertas diferencias.



Determinación de fósforo en frutas

Las concentraciones de fósforo obtenidas por el método de adiciones estándar no están dentro del intervalo de concentración de fósforo obtenida por calibrado directo, como se puede comprobar en la Tabla 20, lo que ratifica la presencia de efectos de matriz en las tres muestras (cada muestra podrá estar sujeta a diferentes interferencias de matriz, dado que no tienen exactamente la misma matriz).

Tabla 20. Comparación de las concentraciones de fósforo, en mg por 100 gramos de muestra, encontradas en la literatura con las obtenidas mediante calibrado y adiciones estándar.

[P](mg/100g)	LITERATURA	CALIBRADO	ADICIONES ESTÁNDAR
ALMENDRA MOLIDA	510	281,6 ± 43,7	221
AVELLANA	401	139,8 ± 22,9	93,9
UVA PASA	111	51,7 ± 3,5	35,1

Por lo tanto, los valores de las concentraciones de fósforo más fiables son los obtenidos por adiciones estándar ya que estas permiten compensar las interferencias de matriz.

5.5. COMPARACIÓN CON CONCENTRACIONES ENCONTRADAS EN LA LITERATURA.

A partir de datos encontrados en la literatura, concretamente en la Fundación Española de la Nutrición (20), se comparan, en la Tabla 20 con los datos obtenidos por calibrado directo y adiciones estándar.

Se observa que los valores de fósforo obtenidos tanto en el calibrado como en adiciones estándar tienen cierta semejanza entre ellos, pero no con los encontrados en la literatura.

Buscando explicaciones al porqué de la obtención de estos valores inferiores a los esperados, se ha llegado a la decisión de que puede ser debido a varios factores: algún pequeño error metodológico sistemático en la puesta en disolución de las muestras, la zona geográfica donde se cultive la fruta, el medio de cultivo o la presencia de fertilizantes fosfatados en el suelo. Todos ellos son factores que pueden afectar a la concentración de fósforo obtenida y hacer que esta varíe significativamente respecto a la concentración de fósforo encontrada en la literatura.

6. CONCLUSIONES

El trabajo experimental llevado a cabo en el presente Trabajo Fin de Grado ha permitido extraer las siguientes conclusiones:

1. Se ha decidido que el método más adecuado para la determinación de fosfato en frutas es el análisis por inyección en flujo acoplado a detección espectrofotométrica.
2. Se ha visto que la digestión ácida con microondas ha resultado adecuada para la digestión de las muestras, sin problemas de contaminación y en un periodo de tiempo bastante adecuado.



Determinación de fósforo en frutas

3. Las pendientes de calibración obtenidas por calibrado externo y por adiciones estándar no son similares, lo que nos indica la presencia de efectos de matriz en el procedimiento analítico seguido.
4. En los tres tipos de las muestras estudiadas (almendra molida, avellana y uva pasa) se ha detectado la presencia de fósforo en unas concentraciones inferiores a las encontradas en la literatura. Esto puede ser debido a varios factores como el ámbito geográfico en donde crezcan las frutas, la presencia de fertilizantes fosfatados en el suelo de cultivo o los distintos niveles de fósforo dentro de un mismo tipo de fruta, ya que, por ejemplo, no todas las almendras tendrán la misma cantidad de fósforo.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Brandt. La importancia del fósforo en la agricultura: nutrientes esenciales [Internet]. *BRANDT Europe*. 2022 [citado 9 de febrero de 2024]. Disponible en <https://brandteurope.com/importancia-fosforo-agricultura-nutrientes-esenciales>
2. Fósforo en la dieta. *MedlinePlus enciclopedia médica* [Internet]. [citado 26 de enero de 2024]. Disponible en <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/002424.htm>
3. Canfield DE, Kristensen E, Thamdrup B. The phosphorus cycle. *Adv Mar Biol*. 2005;48:419-440. [https://doi.org/10.1016/S0065-2881\(05\)48011-6](https://doi.org/10.1016/S0065-2881(05)48011-6)
4. Martínez Fernández I, Saracho R. El fósforo y sus implicaciones clínicas. *Nefrología*. 2009;29:41-50. <https://www.revistanefrologia.com/es-pdf-X2013757509001944>
5. Schlemmer U, Frølich W, Prieto RM, Grases F. Phytate in foods and significance for humans: food sources, intake, processing, bioavailability, protective role and analysis. *Mol Nutr Food Res*. 2009;53 Suppl 2:S330-375. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200900099>
6. Silva EO, Bracarense APFRL. Phytic Acid: From antinutritional to multiple protection factor of organic systems. *J Food Sci*. 2016;81:R1357-1362. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13320>
7. Salud y Alimentación. *Ácido fítico o fitatos: poner en remojo o germinar* [Internet]. [citado 13 de mayo de 2024]. Disponible en <https://www.diet-health.info/es/100001/papers/6294/alimentacion/acido-fitico-o-fitatos-poner-en-remojo-o-germinar>
8. Office of Dietary Supplements - Fósforo [Internet]. [citado 4 de febrero de 2024]. Disponible en: <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Phosphorus-DatosEnEspanol/>
9. Guo ZX, Cai Q, Yang Z. Determination of glyphosate and phosphate in water by ion chromatography—inductively coupled plasma mass spectrometry detection. *J Chromatogr A*. 2005;1100:160-167. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.09.034>



Determinación de fósforo en frutas

10. Mettler Toledo. Electrodo selectivo de iones [Internet]. [citado 5 de febrero de 2024]. Disponible en https://www.mt.com/es/es/home/products/Laboratory_Analytics_Browse/pH-meter/sensor/ion-selective-electrode.html
11. Kwan RCH, Leung HF, Hon PYT, Barford JP, Renneberg R. A screen-printed biosensor using pyruvate oxidase for rapid determination of phosphate in synthetic wastewater. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2005;66:377-383. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1701-8>
12. Kwan RCH, Leung HF, Hon PYT, Cheung HCF, Hirota K, Renneberg R. Amperometric biosensor for determining human salivary phosphate. *Anal Biochem*. 2005;343:263-267. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2005.05.021>
13. Zhang JZ, Fischer CJ, Ortner PB. Continuous flow analysis of phosphate in natural waters using hydrazine as a reductant. *Int J Environ Anal Chem*. 2001;80:61-73. <http://dx.doi.org/10.1080/03067310108044386>
14. Pradhan S, Pokhrel M. Spectrophotometric determination of phosphate in sugarcane juice, fertilizer, detergent and water samples by molybdenum blue method. *Sci World*. 2013;1:58-62. <https://doi.org/10.3126/sw.v11i11.9139>
15. Fuente MM. Aplicaciones de interés medioambiental, clínico e industrial del análisis por inyección en flujo multiconmutado. Tesis doctoral (Universidad de las Islas Baleares). 2007. Disponible en <https://www.tesisenred.net/handle/10803/9453#page=1>
16. Quaresma MCB, Cassella RJ, Guardia M de la, Santelli RE. Rapid on-line sample dissolution assisted by focused microwave radiation for silicate analysis employing flame atomic absorption spectrometry: iron determination. *Talanta*. 2004;62:807-811. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2003.10.002>
17. Nikdel S, Temelli CM. Comparison of microwave and muffle furnace for citrus juice sample preparation and analysis using inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry. *Microchem J*. 1987;36:240-244. <http://dx.doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.768.280>
18. Lee J, Park YS, Lee HJ, Koo YE. Microwave-assisted digestion method using diluted nitric acid and hydrogen peroxide for the determination of major and minor elements in milk samples by ICP-OES and ICP-MS. *Food Chem*. 2022;373:131483. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131483>
19. Dundar MS, Altundağ H, Tunca G. Determination of boron in hazelnut varieties with the addition of sorbitol by using ICP-OES and ultrasonic nebulization after microwave digestion system. *J Chem Metrol*. 2018;12:113-120. <http://dx.doi.org/10.25135/jcm.20.18.11.1076>
20. Fundación Española de la Nutrición [Internet]. [citado 14 de mayo de 2024]. Disponible en <https://www.fen.org.es>



8. ANEXO

8.1. PREPARACIÓN DE LAS FASES

Fase B: Disolución 7 g/L de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ en HNO_3 0,2M.

Tabla 21: Datos para el HNO_3 para la preparación de la fase B

	HNO_3
Masa molecular (g/mol)	63,01
Densidad (g/mL)	1,37
Pureza	60%

$$\frac{60 \text{ g}}{100 \text{ g}} \times \frac{1 \text{ mol}}{63,01 \text{ g}} \times \frac{1,37 \text{ g}}{1 \text{ mL}} \times \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} \times 0,01 \text{ L} = 13,04 \text{ M}$$

Aplicando $V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$ [7]

$$V(\text{HNO}_3) = 15,34 \text{ mL HNO}_3 \text{ 60\%}$$

Fase C: Disolución al 4% (p/v) de ácido ascórbico en disolución acuosa de glicerina al 1% (p/v).

- Cantidad de glicerina necesaria

$$1 \text{ L D} \times \frac{99 \text{ L glicerina}}{100 \text{ L D}} \times \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} \times 0,01 \text{ L} = 9,9 \text{ mL glicerina}$$

- Cantidad de ácido ascórbico necesario

$$1000 \text{ mL} \times \frac{4 \text{ g ácido ascórbico}}{100 \text{ mL}} = 40 \text{ g ácido ascórbico}$$

8.2. PREPARACIÓN DE UN PATRÓN DE 25 PPM PARA EL ESTUDIO DE LA VELOCIDAD DE FLUJO.

$$50 \text{ mL} \times \frac{25 \text{ mg}}{1 \text{ L}} \times \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} = 1,25 \text{ mg fosfato}$$

No disponemos de fosfato como tal en el laboratorio, sino que partimos de KH_2PO_4 anhidro para preparar una disolución de 100 ppm.



Determinación de fósforo en frutas

PM (KH_2PO_4) = 136,09 g/mol

136,09 g/mol – 2 g/mol – 39,09 g/mol = 95 g/mol (PO_4^{2-})

$$\frac{95 \frac{\text{g}}{\text{mol}}}{136,09 \frac{\text{g}}{\text{mol}}} = 0,7 \rightarrow 70\% \text{ fosfato en la sal}$$

$$\frac{1,25 \text{ mg fosfato}}{70} \times 100 = 1,78 \text{ mg fosfato}$$

No se pesaron exactamente los 1,78 mg si no que se pesaron 6,8 mg, por lo que la concentración varía y se calcula la nueva concentración.

$$6,8 \text{ mg sal} \times \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}} \times \frac{1 \text{ mol}}{136,09 \text{ g}} \times \frac{1 \text{ mol fosfato}}{1 \text{ mol sal}} \times \frac{95 \text{ g}}{1 \text{ mol}} \times \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}} \\ = 4,75 \text{ mg fosfato}$$

$$\frac{4,75 \text{ mg fosfato}}{0,05 \text{ L}} = 95 \text{ mg/L}$$

En el matraz de 50 mL tenemos una concentración de 95 mg/L, por lo tanto, se calcula para un patrón de 25 mg/L en 25 mL aplicando la fórmula [7].

$V_{\text{necesario}} = 6,57 \text{ mL}$ de la disolución de 50 mL

8.3. PREPARACIÓN DE PATRONES

Se preparan en matraces de 25 mL a partir de la disolución madre de 100 ppm. Aplicando [7].

1. Blanco (0 ppm) → 25 mL agua destilada
2. 2 ppm → $100 \text{ ppm} \times V = 2 \text{ ppm} \times 25 \text{ mL} \rightarrow V = 0,5 \text{ mL}$
3. 5 ppm → $100 \text{ ppm} \times V = 5 \text{ ppm} \times 25 \text{ mL} \rightarrow V = 1,25 \text{ mL}$
4. 10 ppm → $100 \text{ ppm} \times V = 10 \text{ ppm} \times 25 \text{ mL} \rightarrow V = 2,5 \text{ mL}$
5. 50 ppm → $100 \text{ ppm} \times V = 50 \text{ ppm} \times 25 \text{ mL} \rightarrow V = 12,5 \text{ mL}$



Determinación de fósforo en frutas

8.4. CÁLCULO DE MUESTRAS DE ADICIONES ESTÁNDAR

Es importante que la concentración total no supere el valor máximo del rango de concentraciones. Se utilizó el patrón madre de 100 mg/L (ppm) y se llevaron todos ellos a volúmenes finales de 10 mililitros (mL).

A cada uno se le añadió 5 mL de cada muestra.

Estos cálculos son similares para las tres muestras.

1. Blanco → **0 mg/L (ppm)** patrón
2. 1 mL patrón 100 mg/L → 100 mg en 10 mL → **10 mg/L (ppm)**
3. 2 mL patrón 100 mg/L → 200 mg en 10 mL → **20 mg/L (ppm)**
4. 4 mL patrón 100 mg/L → 400 mg en 10 mL → **40 mg/L (ppm)**