

ESTUDIO DE UN MÉTODO PARA DETERMINAR FÓSFORO EN LEGUMINOSAS MEDIANTE ESPECTROSCOPÍA ULTRAVIOLETA VISIBLE

STUDY OF A METHOD FOR MEASURE PHOSPHORUS IN LEGUMES
BY UV SPECTROSCOPY VISIBLE

Andrés Correa E.¹ & Augusto Oviedo Ch.¹

Recibido: 3 abril 2017 / Aceptado: 30 junio 2017

Palabras claves: cereal, espectroscopía ultravioleta visible, fósforo, leguminosa

Keywords: cereal, legumes, phosphorus, ultraviolet visible spectroscopy

RESUMEN

En este trabajo se valida el método para la determinación de fósforo en leguminosas mediante la técnica de espectroscopía ultravioleta visible. La metodología para la preparación de muestras y soluciones reactiva fue tomada de la AOAC 915.11 obteniéndose buenos resultados para el analito estudiado. Para el acondicionamiento del método se toman en cuenta parámetros como: linea-

¹ Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Escuela de Ciencias Químicas, Quito Ecuador (andrescorreaespinosa@hotmail.com, aoviedo554@puce.edu.ec).

lidad, sensibilidad, límites de detección, límites de cuantificación, exactitud y precisión. Antes de aplicar el método en las muestras de leguminosas se establece la exactitud de la metodología mediante el proceso de adiciones fortificantes con un estándar de fósforo en una muestra de harina de maíz, se establecieron los límites basados en publicaciones de trabajos similares.

ABSTRACT

In this work, a method was developed for the determination of phosphorus in legumes using the Visible Ultraviolet Spectroscopy technique. The methodology for the preparation of samples and reagent solutions was taken from AOAC 915.11 obtaining good results for the analyte studied. For the development of the method, parameters such as linearity, sensitivity, limits of detection and quantification, accuracy and precision are taken into account. Before applying the method in legume samples, the accuracy of the methodology was established by the process of fortifying additions with a phosphorus standard in a sample of corn flour, the limits were established based on publications of similar works.

INTRODUCCIÓN

El fósforo es un elemento químico muy reactivo y se oxida espontáneamente en contacto con oxígeno atmosférico (Behran, 1996). Se relaciona directamente con todas las reacciones de transferencia de energía que ocurren en los seres vivos. En las plantas, el fósforo, es almacenado en las semillas y/o frutos, que con el tiempo se convertirán en leguminosas. En los seres humanos el fósforo actúa como parte estructural de fosfolípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos, así como en varias rutas metabólicas (Rodríguez y Simón, 2008).

Conocer el contenido de fósforo en leguminosas y cereales es importante ya que estas constituyen la base de la alimentación de la población, es así el caso de las personas que han optado por una dieta vegetariana, dado que el contenido de minerales, grasas y proteínas podrían llegar a sustituir el consumo de carne y, también, por personas que se esfuerzan en mantener un equilibrio entre los productos de origen vegetal y los de origen animal (Rodríguez y Simón, 2008; Calle *et al.*, 2003).

Leguminosas estudiadas

Arveja (*Pisum sativum L.*) aporta cantidades considerables de hidratos de carbono (56 %), como el almidón; proteínas, si son secas (21,6 %) o frescas (6 %), y una pequeña proporción de sacarosa. La arveja contiene dos tipos de fibra: soluble e insoluble. La fibra insoluble beneficia al funcionamiento del intestino; mientras que la soluble reduce los niveles elevados de colesterol. Las arvejas presentan también vitaminas como tiamina (B1) y riboflavina (B2), al mismo tiempo contienen minerales como hierro, fósforo, potasio y magnesio (Guzmán, 2004).

Garbanzo (*Cicer arietinum*), es un alimento rico en hidratos de carbono, proteínas, fibras, minerales y vitaminas. Contiene niveles altos de lecitina, un tipo de grasa que ayuda a mantener niveles saludables de colesterol y los triglicéridos. También son ricos en aminoácidos esenciales (Pamplona, 1995).

Haba (*Vicia faba*), se encuentra entre las legumbres de grano más importantes en el mundo; se la usa tanto

para alimentación humana como para la nutrición animal. Las habas son un tipo de legumbre que brinda beneficios para la salud ya que reducen el colesterol naturalmente (Confalone, 2008).

Maní (*Arachis hypogaea*) está químicamente compuesto por una gran cantidad de grasas insaturadas, proteínas y carbohidratos. Contiene ácidos grasos como el omega 3, omega 6 y fitoteróleos que reducen el colesterol. Es rico en vitamina E y como suplemento nutricional aporta minerales como sodio, potasio, fósforo, yodo y calcio (Villalobos, 1998).

Soya (*Glycine max*) es una alternativa eficiente para las personas intolerantes a la lactosa, se usa en tratamientos para la disminución de síntomas menopáusicos, en la prevención del cáncer de mama, y en los hombres la disminución de posibilidades de cáncer de próstata, contiene cantidades considerables de fibra que es beneficiosa para el sistema digestivo, no

tiene colesterol, el 40 % de su peso es proteína, es fuente de fósforo, hierro, magnesio y calcio (Valencia & Garzón, 2004).

Cereal estudiado

Los cereales son plantas conocidas también como gramíneas que dan productos farináceos, la principal característica de los cereales y todos sus derivados es el alto contenido de almidón que es de alrededor del 65 % del peso seco de los granos (FAO, 1994).

Arroz (*Oryza sativa*) es un cereal considerado como uno de los alimentos básicos en zonas globales específicas como Asia y América Latina. Es el segundo cereal más producido después del maíz. Desde el punto de vista nutricional el arroz tiene en comparación con otros cereales un menor porcentaje de proteínas; sin embargo, tiene un valor alto de almidón, su bajo costo y alto aporte calórico ha facilitado su consumo masivo (FAO, 1994).

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo

La toma de muestras se realizó en dos supermercados y un mercado popular de la ciudad de Quito. Se recolectan en total tres muestras de cada leguminosa, las mismas que fueron molidas hasta obtener un polvo fino para facilitar el análisis y para evitar posibles interferencias dadas por la matriz. Se realiza un total de 27 muestras por cada leguminosa muestreada.

Parte Analítica

Para la preparación del estándar, de las muestras, soluciones reactivo y los parámetros instrumentales del análisis químico de las leguminosas, se aplicó el método AOAC 915.11. Para acondicionar el método analítico se establecen parámetros como linealidad, sensibilidad, límites de detección, límites de cuantificación, exactitud y precisión.

Linealidad: es el parámetro que muestra la capacidad del método analítico para dar resultados directamente proporcionales según la con-

centración del analito. Se construyen curvas de calibración a diferentes concentraciones empleando un estándar de fosfato monobásico de potasio KH_2PO_4 al 99,0 % de pureza marca Fisher Scientific. Se realiza este procedimiento por cinco días, cada día se obtienen cinco curvas de calibración, con el objetivo de determinar el factor de correlación y el factor de determinación, se plantea como límite que la correlación y el factor de determinación deben ser mayores a 0,9990.

Exactitud: para evaluar el rendimiento y exactitud del método analítico, se aplicó la técnica de adición de volúmenes fortificantes del estándar de fósforo en muestras blanco de maíz. Se escoge el maíz ya que la matriz debe ser un cereal o una leguminosa como las muestras. Las muestras deben ser secadas, calcinadas y procesadas por digestión ácida con ácido clorhídrico 12,0 N; el fósforo forma una reacción compleja, colorada con una solución reactivo de ácido ascórbico-molibdato, de esta manera es viable cuantificar el con-

tenido de fósforo en el espectrómetro ultravioleta visible. De acuerdo con la referencia se establece que la recuperación del analito debe estar comprendida entre 70 a 120 % (Sanco, 2009).

Límites de cuantificación (LQ) y detección (LD): estos límites fueron calculados con el promedio de los valores de absorbancia del blanco de las curvas de calibración, se realizan en total veinticinco blancos, de los cuales se calculó el promedio (de las lecturas y el valor de la desviación estándar (S) (Herrero, 2012).

Sensibilidad: el método analítico se determina como sensible o poco sensible mediante los valores de los pendientes (m) obtenidas de las curvas de calibración del estándar de fósforo, la sensibilidad del método depende entonces de la inclinación de la recta y de su aproximación en este caso al eje Y (Sanz, 2012).

Análisis y tratamiento de muestras de leguminosas

Las leguminosas deben ser analizadas en base seca, para lo cual se usó una estufa marca Binder a 110 °C por

dos horas. Para eliminar el material orgánico de las muestras, estas se calcinaron en una mufla marca Optic Ivimen SNOL, a 525 °C durante una noche, de esta manera se aseguró que el agua molecular y posibles sustancias volátiles son evaporadas de las muestras y que no interferirán en los resultados produciendo falsos negativos o desviaciones en los resultados (AOAC, 2012).

Eliminado todo el material orgánico se procedió a la digestión ácida de las muestras aplicando ácido clorhídrico concentrado grado analítico, 12.1 N, de esta manera el analito de interés es aislado a una solución. Se agregó una solución de ácido ascórbico-molibdato a las muestras diluidas en balones de 50,0 ml, y se incubaron en un baño maría a 60 °C hasta observar la aparición de color azul del complejo de fósforo-molibdato. El fosfato soluble en ácido forma un complejo coloreado de color azul intenso $[(\text{MoO}_2.4\text{MoO}_3)_2.\text{H}_3\text{PO}_4]$ (AOAC, 2012).

Análisis Instrumental

Las soluciones fueron analizadas mediante espectroscopía ultravioleta vi-

sible en un equipo de marca Agilent Technologies Cary 60 a una longitud de onda de 823 nm. Cada muestra fue analizada por triplicado para demostrar la reproducibilidad de los datos.

Estudio estadístico

La prueba *t* de Student se aplica para contrastar una hipótesis nula entre medias de dos poblaciones con distribución normal. Se comparan las medias de un método a prueba con otro que se considera aceptado. En el presente estudio se aplicó la prueba de *t* de Student para contrastar los resultados obtenidos con los valores reportados en la Tabla de Composición del año 1965 del Ecuador.

El análisis ANOVA es la herramienta estadística más apropiada para calcu-

lar la linealidad del método mediante el factor de correlación (*r*) y el factor de determinación (*r*²) obtenidos a partir de las curvas de calibración del estándar de fósforo. El análisis estadístico se realizó a base de la prueba de una cola con un grado de libertad (1L) y con un nivel de confianza del 95,0%.

La precisión del método se estableció mediante el coeficiente de variación dentro del día de análisis denominado repetitividad (CVr), y los resultados de todos los días de análisis denominados como reproducibilidad analítica (CVR). Se clasificó cada nivel en: *Bueno*, *Aceptablemente bueno* y *Bajo* de acuerdo con el valor obtenido. Se estableció el criterio de aceptabilidad menor al 20% (Sanco, 2009).

RESULTADOS

Linealidad: en la Tabla 1 se presentan los resultados promedio de los cinco días de análisis obtenidos a partir de las curvas de calibración, se estableció que la linealidad del método analítico cumple con las especificaciones propuestas para el coeficiente correlación y determinación.

Tabla 1. Resultados de linealidad

Día	Correlación	Determinación	Especificación
1	0,9997	0,9994	>0,9990
2	0,9996	0,9996	>0,9990
3	0,9999	0,9999	>0,9990
4	0,9998	0,9998	>0,9990
5	0,9995	0,9995	>0,9990

En la Tabla 2 se presentan los resultados de la prueba Fischer aplicada a los valores obtenidos de las curvas de calibración.

Esto demuestra estadísticamente que los valores de desviación estándar de las curvas de calibración se mantuvieron homogéneos a lo largo de los días de análisis, los valores F calculados son menores al valor tabulado. Se aceptó la hipótesis nula dado que no existen diferencias significativas

entre las varianzas de las medias poblacionales.

Tabla 2. Resultados prueba Fischer

Conc mg/ml	F. Calculada	F Teórica	Conclusión
0,000	2,1797	2,4341	Ho Aceptada
0,010	1,314	2,4341	Ho Aceptada
0,025	1,0555	2,4341	Ho Aceptada
0,050	2,1873	2,4341	Ho Aceptada
0,075	1,265	2,4341	Ho Aceptada

Límites de detección y cuantificación: En la Tabla 3 se presentan los resultados obtenidos para los límites de cuantificación y detección calculados a partir de los valores de los blancos de las curvas de calibración.

Tabla 3. Límites de cuantificación y detección

Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
0,0000	0,0003	0,001	0,0000	0,0000
0,0000	0,0003	0,0001	0,0007	0,0003
0,0005	0,0001	0,0000	0,0005	0,0004
0,0001	0,0004	0,0004	0,0002	0,0002
0,0001	0,001	0,001	0,0005	0,0000
Desv. estándar			0,0004	
Promedio			0,0002	
LD			0,0014	
LQ			0,0042	

Exactitud: en la Tabla 4 se muestran los resultados para la eficiencia del método analítico determinada mediante las pruebas de adiciones obteniendo un resultado del 85,01 % de recuperación del analito. Los resultados de cada día de análisis y del total de días de estudio se encontraron dentro del límite establecido entre 70 y 120 %.

Tabla 4. Resultados de recuperaciones

Conc.	Día 1 (%)	Día 2 (%)	Día 3 (%)	Día 4 (%)	Día 5 (%)
0,0141	73,48	94,38	85,66	93,57	91,40
0,0441	81,12	85,10	82,60	83,62	86,18
0,0641	86,81	78,95	85,34	86,59	87,83
0,0841	82,76	76,87	85,41	84,16	88,38
Promedio					85,01 %

En la Tabla 5 se presentan los resultados promedio calculados para el coeficiente de variación de los días de estudio, los valores de desviación estándar son similares entre ellos y el coeficiente de variación está por debajo de 10 %, superando el límite propuesto por la bibliografía.

Tabla 5. Repetitividad

Parámetro	Conc.	S	%CV _R
Acondicionamiento del método	0,010	0,009	5,835
	0,025	0,015	3,669
	0,050	0,013	1,645
	0,075	0,017	1,389
	0,100	0,021	1,291
Recuperación	0,014	0,008	4,192
	0,044	0,049	8,065
	0,064	0,063	7,021
	0,084	0,056	4,863

En la Tabla 6 se presentan los resultados promedio calculados para el coeficiente de variación entre los días de estudio.

Los valores de desviación estándar son similares entre ellos y el coeficiente de variación está por debajo de 10 %, superando el límite propuesto por la bibliografía.

Tabla 6. Reproducibilidad

Parámetro	Conc.	S	%CV _R
Acondicionamiento del método	0,0100	0,0102	6,6889
	0,0250	0,0150	3,7696
	0,0500	0,0199	2,4330
	0,0750	0,0193	1,5619
	0,1000	0,0192	1,1647
Recuperación	0,0141	0,0485	2,7342
	0,0441	0,0361	5,9784
	0,0641	0,0800	8,9251
	0,0841	0,1320	11,4083

Sensibilidad: en la Tabla 7 se muestran los resultados para la sensibilidad del método analítico, que fue clasificada como Aceptable dada la inclinación de las curvas de calibración y por los valores bajos en las desviaciones estándar.

Tabla 7. Sensibilidad

Día	Pendiente b	s
1	16,5936	0,0779
2	16,5311	0,0931
3	16,5987	0,0539
4	16,5929	0,0677
5	16,6993	0,0964
Promedio	16,6031	0,0778

En la Tabla 8 se muestra el cálculo de la prueba t de Student, donde se determinó que el valor calculado en este estudio es mayor al valor tabulado. Este contraste de resultados asegura que existen diferencias entre los valores obtenidos en este estudio y los valores reportados en la tabla nutricional del año 1965.

Tabla 8. Resultados del análisis estadístico t de Student

Muestra	t Tabulada	t Calculada
Arveja	1,71	9,2
Garbanzo	1,71	2,4
Lenteja	1,71	5,7
Soya	1,71	37,2
Maní	1,71	23,0
Arroz	1,71	4,6
Haba	1,71	4,3

Cuantificación: en la Tabla 9 se presentan los resultados promedio de los 27 análisis de fósforo aplicados a cada una de las muestras de leguminosas. Los resultados muestran los contenidos más altos de fósforo para todas las leguminosas estudiadas y los más bajos para el arroz. También se presentan los datos del estudio actual y los datos obtenidos de la bibliografía de referencia de la tabla del año 1965 (Instituto Nacional de Nutrición, 1965).

Tabla 9. Resultados actuales y datos bibliográficos del año 1965

Muestra	Media	Valor teórico
	mg/100g	mg/100g
	Estudio Actual	Estudio del año 1965
Arveja	319,4	375,0
Garbanzo	277,9	292,0
Lenteja	346,3	313,0
Soya	266,0	915,0
Maíz	739,1	477,0
Arroz	108,8	135,0
Haba	481,5	346,0

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos para el acondicionamiento del método muestran que el método analítico es confiable y los datos obtenidos son reproducibles; los resultados obtenidos en este estudio cumplieron con los parámetros establecidos. La linealidad del método determinada por el factor de correlación a partir de las curvas de calibración fue de 0,9999; para el parámetro de exactitud en el cual se aplicó la prueba de adiciones del estándar de fósforo a muestras de maíz, el método analítico propuesto recuperó un 85,01 % de fósforo de las muestras de maíz.

La varianza se mostró homogénea y no mostró cambios significativos al aplicar la prueba de Fischer. El límite de detección del método fue de 0,0014 mg/ml y el límite de cuantificación fue de 0,0042 mg/ml. La sensibilidad del método analítico se clasificó como Aceptable. Los resultados del coeficiente de variación, de la reproducibilidad, a lo largo de los días de análisis, fueron de 5,80 %, y para el coeficiente de repetitividad de cada día fue de 4,82 %, los dos valores se encontraron dentro del límite planteado, incluso menor a 10 %.

Para la cuantificación de fósforo en las leguminosas, el maní tiene el valor más alto de fósforo (739,1 mg/100g), seguido del haba (481,5 mg/100g), lenteja (346,33 mg/100g), arveja (319,4 mg/100g), garbanzo (277,9 mg/100g), soya (265,9 mg/100/g); además, el arroz presenta

el valor más bajo (108,8 mg/100g). De manera comparativa, en todos los casos se evidenció que hay diferencias con los datos que se usan actualmente y que son tomados de la Tabla de Alimentos del Ecuador del año 1965.

CONCLUSIONES

El método colorimétrico 915.11 para la determinación de fósforo, es confiable y sus resultados son reproducibles. Este cumple con las especificaciones propuestas para los parámetros

de la validación, por lo tanto la determinación de fósforo en muestras de leguminosas es un proceso viable y eficiente.

RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar un proyecto de actualización a mayor escala para determinar nuevos límites y especificaciones para la tabla del año 1965 que se usa como fuente bibliográfica,

considerando que la tecnología ha avanzado respecto a la mejora de métodos analíticos y la implementación de equipos más sensibles en los laboratorios actuales.

LITERATURA CITADA

- Behran, J. (1996). Fundamentos de la Química General e Inorgánica, Reverté, Barcelona. pp. 551-573.
- Calle, J., Pedroche, J., Rodríguez, J. & Millon, F. (2003). *Proteínas Alimentarias y Coloides de Interés Industrial*, Sevilla, España. Universidad de Sevilla.
- Confalone, A. (2008). *Crecimiento y Desarrollo del Cultivo de Haba*, Lugo, España. Universidad de Santiago de Compostela.
- FAO. (1994). *El Arroz en la Nutrición Humana*, Roma, Italia. Colecciones FAO.
- Guzmán, H. (2004). *El Cultivo de la Arveja en la Sierra Sur*, Boletín Divulgativo 32, Azogues, Cuenca. [s.n]
- Herrero, L. (2012). *Puesta a Punto y Validación de un Método de Análisis de Aflotoxinas en Frutos Secos y Cereales*, Universidad de Zaragoza, España. pp. 27-35.
- Instituto Nacional de Nutrición. (1965). *Tabla de Composición de los Alimentos Ecuatorianos*, Guayaquil, Ecuador, INEN.
- Official Methods of Analysis of AOAC International. (2012). *Phosphorus (Total) in Food, Colorimetric Method. Chapter 45*, Método 995.11., pp. 50 - 52.
- Pamplona, J. (1995). *Alimentos*, Madrid, España. Safeliz.
- Rodríguez, V., y Simón, E. (2008). *Bases de Nutrición Humana*, Galicia, España. Netbiblo.
- Sanco. (2009). Método de Validación y Control de Calidad para residuos de pesticidas en alimentos y semillas, NAFA, Alemania.
- Sanz, E. (2012). *Puesta a punto y validación de un procedimiento de análisis de neonicotinoides en abejas (apis mellifera) por hplc-ms/ms*. <http://hdl.handle.net/10251/27797>, UPV, Valencia.

Valencia, R. & Garzón, A. (2004). *Potencialidades de la Soya y Usos en la Alimentación Humana y Animal*, Boletín informativo 13, Bogotá, Colombia. Corpoica.

Villalobos, L. (1998). *Cultivo de Maní*, 2^{da} edición, Costa Rica. Euned.