

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES  
ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

Comparación de los métodos de digestión seca y digestión ácida por microondas para el análisis de fósforo en brócoli y acelga por Espectrofotometría Ultravioleta - Visible

Disertación previa a la obtención del título de Licenciado en Ciencias Químicas con  
mención en Química Analítica

CHRISTIAN FERNANDO TERÁN RUIZ

Quito, 2016

## **CERTIFICACIÓN**

Certifico que la disertación de Licenciatura en Ciencias Químicas con mención en Química Analítica, del candidato Christian Fernando Terán Ruiz, ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Fecha:

M. Sc. Eliza Jara

## AGRADECIMIENTOS

A Dios, al universo y al destino por haberme dado a una persona especial, mi madre Bethzabé Ruiz, quien es mi mejor amiga, mi felicidad y mi apoyo en cada etapa de mi vida; también a mi tía Isabelita, a mis primos Julio y Lilo, quienes me han brindado su total confianza, soporte y guía. A mi padre, Fernando Terán, quién me enseñó la lección más importante de la vida, y es que sólo tenemos un tiempo limitado aquí, y hay que sacarle el mejor provecho posible, dejando una huella que perdure muchos años. De igual manera a mi familia, por estar pendiente de mí en cada paso que doy.

A los excelentes profesores que me brindaron su conocimiento, amistad y experiencias de la vida, y también a los otros, de los que aprendí que cada adversidad que se presenta, hay que superarla hasta conquistar el objetivo que uno se propone. A la M. Sc. Eliza Jara, quien fue mi primera profesora de Química en la universidad y con quien estoy culminando este proceso, por su colaboración y por su manera reflexiva y práctica de enseñar.

A mis amigas y amigo de carrera: Cinty, Alejandra, Shirley y Pedro por hacer de la universidad una experiencia no sólo de estudio, sino también de diversión y locuras inolvidables; por haber estado conmigo en las buenas, en las malas, con alegrías y tristezas, por estarme forzando de cierta manera a terminar con este trabajo. A Daly, por todo su cariño, ánimos y empuje durante los momentos finales de mi carrera.

Así mismo quiero agradecer a la Escuela de Ciencias Químicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador por brindarme los recursos necesarios para la realización de este trabajo y por ser el lugar donde inició mi camino de ser un profesional en la carrera más divertida, creativa y satisfactoria, Química Analítica

“Nunca te rindas, los sayajines  
nos volvemos más fuertes  
con cada caída”

**Vegeta**

## RESUMEN

El objetivo principal de este trabajo fue la comparación de los métodos de digestión vía seca y digestión húmeda asistida por microondas para el análisis de fósforo por Espectrofotometría Ultravioleta - Visible en dos hortalizas: brócoli y acelga. Se empleó para la determinación de fósforo el método de azul de molibdeno establecido por la Asociación de Comunidades Analíticas (AOAC por sus siglas en inglés). Se inició con un muestreo aleatorio simple en dos supermercados populares de la ciudad de Quito, durante un periodo de tres meses. Las muestras fueron preparadas, digeridas por vía seca y por vía húmeda asistida por microondas con diferentes condiciones de temperatura, tiempo y reactivos disgregantes; y, posteriormente analizadas por Espectrofotometría Ultravioleta - Visible, tras lo cual, se efectuaron las siguientes pruebas estadísticas: t de Student, ANOVA y HSD de Tukey. Se determinó que la digestión húmeda asistida por microondas no es viable para la determinación de fósforo por desarrollo colorimétrico de azul de molibdeno, ya que se obtienen valores de recuperación menores al 81% y diferencias significativas respecto al valor verdadero. El mejor de los resultados con la digestión asistida por microondas se consiguió al emplear como disgregante una mezcla de ácidos nítrico y clorhídrico, bajo una digestión a 220 °C durante 90 min, y controlando el tiempo de desarrollo de color del azul de molibdeno. Adicionalmente, se pudo comprobar que gran parte de los datos de humedad, cenizas y fósforo reportados en la Tabla de Composición de Alimentos Ecuatorianos del año 1965 no presentan diferencias significativas con los obtenidos en este trabajo.

**Palabras clave:** fósforo, hortalizas, espectrofotometría ultravioleta - visible, digestión vía seca, digestión húmeda asistida por microondas

## ABSTRACT

The main aim of this work was to compare digestion methods for the analysis of phosphorus by UV-Visible spectrophotometry in two vegetables: broccoli and chard. Phosphorus determination was executed with the molybdenum blue method established by the Association of Analytical Communities (AOAC). A simple random sampling in two popular supermarkets in the city of Quito was performed within a period of three months. Samples were prepared by means of dry-ashing and microwave-assisted wet digestion with different conditions of temperature, time and reagents; resulting solutions of both methods were analyzed by UV-visible spectrophotometry, after which the following statistical tests were performed: Student's t, ANOVA and Tukey HSD. It was determined that microwave-assisted wet-digestion is not viable for the colorimetric determination of phosphorus, as recovery values were under 81 % and a significant difference from the true value was obtained. The best results were achieved by employing a mixture of nitric and hydrochloric acid for digestion at 220 °C for 90 min, and controlling color development conditions. Additionally, it was found that most of the data reported in Ecuadorian Food Composition Table (from 1965) show no significant differences with those reported in this work.

**Keywords:** phosphorus, vegetables, ultraviolet-visible spectrophotometry, dry ashing, microwave-assisted wet digestion

## TABLA DE CONTENIDOS

CERTIFICACIÓN .....	ii
AGRADECIMIENTOS .....	iii
RESUMEN .....	vi
ABSTRACT .....	vii
TABLA DE CONTENIDOS .....	viii
ÍNDICE DE TABLAS .....	x
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xii
ÍNDICE DE ANEXOS .....	xiii
INTRODUCCIÓN .....	1
CAPÍTULO 1 .....	3
1. MARCO TEÓRICO.....	3
1.1. El fósforo en los alimentos .....	3
1.1.1. Requerimientos dietarios .....	5
1.1.2. Fuentes naturales.....	6
1.2. Metodologías de análisis de fósforo.....	11
1.2.1. Digestión vía seca .....	12
1.2.2. Digestión mediante microondas .....	13
1.2.3. Espectrofotometría Ultravioleta - Visible .....	17
1.3. Tratamiento estadístico de resultados .....	21
1.3.1. Medidas de tendencia central y dispersión .....	22
1.3.2. Pruebas de significación.....	22
CAPÍTULO 2 .....	27
2. PARTE EXPERIMENTAL .....	27
2.1. Muestreo .....	27

<b>2.2. Preparación de la muestra .....</b>	<b>28</b>
<b>2.3. Determinaciones analíticas .....</b>	<b>28</b>
<b>2.3.1. Determinación de humedad (AOAC 925.10) .....</b>	<b>29</b>
<b>2.3.2. Determinación de cenizas (AOAC 923.03) .....</b>	<b>30</b>
<b>2.3.3. Digestión vía seca (AOAC 995.11) .....</b>	<b>31</b>
<b>2.3.4. Digestión mediante microondas .....</b>	<b>34</b>
<b>2.3.5. Determinación de Fósforo (AOAC 995.11) .....</b>	<b>35</b>
<b>CAPÍTULO 3 .....</b>	<b>41</b>
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>41</b>
<b>3.1. Determinación de Humedad y Cenizas.....</b>	<b>41</b>
<b>3.2. Determinación de fósforo por vía seca.....</b>	<b>43</b>
<b>3.3. Determinación de fósforo por vía húmeda.....</b>	<b>44</b>
<b>3.4. Tratamiento estadístico de resultados .....</b>	<b>53</b>
<b>CAPÍTULO 4 .....</b>	<b>60</b>
<b>4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....</b>	<b>60</b>
<b>4.1. Conclusiones.....</b>	<b>60</b>
<b>4.2. Recomendaciones.....</b>	<b>62</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>69</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Cantidad recomendada de ingesta de fósforo según el grupo de edad .....	5
Tabla 1.2. Contenido de fósforo (mg/ 100 g de la porción aprovechable de alimento) .....	7
Tabla 1.3. Tabla de fórmulas empleadas en un análisis de varianza .....	24
Tabla 2.1. Parámetros para la digestión de muestras en horno de microondas .....	35
Tabla 3.1. Contenido de humedad y cenizas en los lotes de las hortalizas estudiadas.....	42
Tabla 3.2. Contenido global de humedad y cenizas de las hortalizas estudiadas.....	42
Tabla 3.3. Concentración de fósforo (mg/100 g) empleando digestión por vía seca .....	43
Tabla 3.4. Concentración de fósforo (mg/100 g) empleando digestión húmeda asistida por microondas con ácido nítrico.....	44
Tabla 3.5. Concentración de fósforo (mg/ 100g) empleando digestión húmeda asistida por microondas con una mezcla de ácidos nítrico y clorhídrico.....	45
Tabla 3.6. Variación de la concentración de fósforo en brócoli (mg/ 100g) en función del tiempo de reacción en baño térmico .....	46
Tabla 3.7. Variación de la concentración de fósforo en acelga (mg/ 100g) en función del tiempo de reacción en baño térmico .....	46
Tabla 3.8. Datos de la Tabla de Composición de Alimentos Ecuatorianos para cada hortaliza estudiada .....	53
Tabla 3.9. Comparación de medias e intervalos de confianza obtenidos para humedad, cenizas y fósforo por digestión vía seca en brócoli .....	54
Tabla 3.10. Comparación de medias e intervalos de confianza obtenidos para humedad, cenizas y fósforo por digestión vía seca en acelga .....	54
Tabla 3.11. Comparación de medias de la concentración de fósforo en hortalizas obtenida mediante digestión vía seca y vía húmeda por microondas.....	56

Tabla 3.12. Análisis de varianza de los parámetros estudiados en el brócoli.....	57
Tabla 3.13. Análisis de varianza de los parámetros estudiados en la acelga.....	57
Tabla 3.14. Análisis de varianza de los ensayos de digestión húmeda asistida por microondas .....	58
Tabla 3.15. Prueba de Tukey para los ensayos de digestión húmeda asistida por microondas en acelga.....	59

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Pirámide Alimenticia .....	9
Figura 1.2. Porción comestible del brócoli ( <i>Brassica oleracea italica</i> ) .....	10
Figura 1.3. Porción comestible de la acelga ( <i>Beta vulgaris L</i> ) .....	11
Figura 1.4. Diagrama de los principales componentes de un horno microondas .....	14
Figura 1.5. Representación de la alineación de moléculas polares con un campo fluctuante .....	15
Figura 1.6. Diagrama interno de un magnetrón .....	16
Figura 1.7. Esquema básico de un Espectrofotómetro UV–VIS de doble haz .....	19
Figura 2.1. Zonas de muestreo señaladas en la ciudad de Quito .....	27
Figura 3.1. Variación de la coloración de la solución en función del tiempo en el baño térmico en la determinación de fósforo de la acelga .....	48
Figura 3.2. Digestión húmeda asistida por microondas con ácido clorhídrico.....	49
Figura 3.3. Porcentaje de recuperación de fósforo en el brócoli en función del tiempo de reacción en el baño térmico .....	51
Figura 3.4. Porcentaje de recuperación de fósforo en la acelga en función del tiempo de reacción en el baño térmico .....	52

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>ANEXO 1:</b> TABLA DE COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LAS HORTALIZAS ECUATORIANAS DE 1965.....	70
<b>ANEXO 2:</b> TABLAS ESTADÍSTICAS.....	72
<b>ANEXO 3:</b> DESARROLLO DE COLOR PARA LA DETERMINACIÓN DE FÓSFORO CON CADA MÉTODO DE DIGESTIÓN.....	75

## INTRODUCCIÓN

Dado que la mira central de este trabajo estará puesta en la comparación de un método de digestión relativamente nuevo, la digestión asistida por microondas (puesto en marcha a mediados de la década de 1970) [1], frente al método convencional, la digestión vía seca, para realizar a posteriori la determinación de fósforo en hortalizas por Espectrofotometría Ultravioleta - Visible, empleando el método de azul de molibdeno propuesto por la AOAC, es indispensable conocer y plantear algunas acotaciones y conceptos que servirán como ejes de partida en este trabajo.

En primer lugar, se expondrá el concepto de digestión de una muestra, la cual se define como el proceso de descomposición o destrucción de la matriz de una sustancia para extraer el o los analitos de interés dentro de una solución. Esta etapa puede llevarse a cabo por distintas vías dependiendo de la matriz, como son: vía seca, vía húmeda o digestión húmeda asistida por microondas, y en algunos casos mediante extracción por ultrasonido [2].

Cada técnica de digestión posee ciertas ventajas y desventajas que se describirán en el primer apartado de este trabajo, en donde se aprecia que la digestión asistida por microondas presenta características superiores frente a otros métodos; por lo cual, esta técnica está siendo aplicada para el tratamiento de diversas muestras: suelos, aguas, alimentos, entre otros [3]. Con respecto al área alimenticia, este tratamiento es utilizado para muestras, como: legumbres, carnes, harinas, entre otras, para determinaciones de elementos como: sodio, hierro, zinc [4], calcio, potasio, metales pesados (cadmio y plomo) [5]; sin embargo, en el país esta técnica no ha sido explotada para la determinación de

fósforo en muestras de hortalizas. De aquí surge el interés de realizar este trabajo y generar un aporte para la determinación de este importante mineral.

El fósforo representa alrededor del 1.0 % del peso total del cuerpo humano [6], formando parte de huesos, tejidos blandos, material genético e interviniendo en funciones vitales como: transmisión de impulsos nerviosos, crecimiento, reacciones energéticas, entre otras [7].

Por su parte las hortalizas poseen una amplia gama de especies, incluyendo verduras y legumbres verdes, muy conocidas como: brócoli, tomate riñón, arveja, lechuga, espinaca, apio, etc [8]. Su consumo es importante por su contribución nutricional, en donde resalta su alto contenido de agua y micronutrientes, como vitaminas (A, B, C, D, E y K) y minerales (sodio, potasio, hierro, magnesio y fósforo), además de su bajo aporte de carbohidratos y calorías, por estas razones, se ubican en el segundo piso de la pirámide nutricional [9]. Por lo cual, el consumo de hortalizas se encuentra presente en la dieta de personas omnívoras y en mayor cantidad en personas que han adoptado algún tipo de dieta vegetariana o vegana.

En el segundo apartado de este trabajo, se describirán los procedimientos realizados para el tratamiento de las muestras y para la determinación del elemento fósforo. Finalmente en el tercer apartado se mostrarán en tablas los resultados obtenidos para proceder con su análisis y discusión, y, seguidamente finalizar con las conclusiones y recomendaciones respectivas.

# CAPÍTULO 1

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1. El fósforo en los alimentos

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, FAO (*Food and Agriculture Organization*, por sus siglas en inglés), define como "alimento" a toda sustancia, elaborada, semielaborada o bruta, que se destina al consumo humano [10]. Los alimentos son importantes porque proporcionan al organismo la energía y nutrientes básicos para llevar a cabo las funciones vitales, sin embargo, también se los consume por placer, para satisfacer el apetito, cosa que constituye un estímulo psicofísico con significado emocional y que ayuda a la integración social [6].

Los nutrientes son sustancias químicas necesarias para que el organismo pueda efectuar las funciones vitales básicas [11]. Se los divide en dos grupos que son:

- **Macronutrientes:** Son los que pueden ser metabólicamente procesados en energía [4]. El organismo requiere de grandes cantidades de este tipo de nutrientes, entre los que se encuentran: carbohidratos, lípidos y proteínas.
- **Micronutrientes:** Son esenciales para las funciones del cuerpo, puesto que participan en muchas actividades bioquímicas. El requerimiento es menor en comparación a los anteriores. Dentro de este grupo se encuentran los minerales como el fósforo [11].

Los minerales son elementos químicos indispensables para el correcto funcionamiento del organismo debido a que intervienen en varias funciones como: elaboración de tejidos, regulan la composición de los líquidos extra e intracelulares, síntesis de hormonas, reacciones enzimáticas, constitución de los huesos y dientes [12]. Se estima que son cerca de veinte los minerales que se consideran esenciales para el ser humano, que según la necesidad del organismo se clasifican en tres grupos [12]:

- **Macroelementos o macrominerales:** Son los que el organismo requiere en mayor cantidad ( $> 100$  mg/día), entre los que se tiene: calcio, fósforo, magnesio, sodio, potasio, cloro y azufre.
- **Microelementos o microminerales:** Son aquellos elementos que el organismo necesita en cantidades menores ( $< 100$  mg/día), como son: hierro, zinc, cobre, yodo, cromo, selenio, flúor, manganeso, entre otros.
- **Oligoelementos o elementos traza:** Se precisan en el orden de microgramos; entre ellos se encuentran: silicio, níquel, cromo, litio, arsénico.

El fósforo es un macroelemento, ya que se encuentra dentro de los 6 minerales más abundantes en el organismo humano (600 - 900 g) y, representa alrededor del 1.0 % del peso total del cuerpo [6]. Químicamente hablando, el fósforo es un no metal que es insoluble en agua, su número atómico es 15 y se lo representa con la letra “P” dentro de la tabla periódica. Se encuentra principalmente combinado con el calcio, produciendo la mineralización de los huesos y dientes en forma de fosfato de calcio, conocido como hidroxiapatita; aunque también, el fósforo constituye parte de tejidos blandos; del material genético (ADN y ARN); y, también forma parte del ATP [7]. Otro de los aportes que proporciona este mineral, es la influencia para la adecuada transmisión de los impulsos

nerviosos; así mismo, su presencia contribuye para la asimilación de las vitaminas B2 y B3. Para cumplir estas funciones, el fósforo proveniente de los alimentos es absorbido por el organismo en el duodeno y el yeyuno, y posteriormente eliminado a través de la orina [13].

### 1.1.1. Requerimientos dietarios

Debido a las funciones que desempeña el fósforo en nuestro organismo, en la Tabla 1.1 se plantean valores de la ingesta recomendada de este macronutriente según el Departamento de Nutrición del Instituto de Medicina de Estados, tanto para bebés, niños y adultos, a fin de cubrir las necesidades, prever un correcto funcionamiento del organismo y evitar trastornos.

**Tabla 1.1. Cantidad recomendada de ingesta de fósforo según el grupo de edad [13]**

<b>Etapas de vida</b>	<b>Fósforo (mg/día)</b>
Infantes de 1-3 años	380
Niños de 4-8 años	405
Jóvenes de 9-18 años	1055
Adultos (hombres)	580
Adultos (mujeres)	580
Mujeres en embarazo (< 18 años)	1055
Mujeres en embarazo (> 18 años)	580
Mujeres en lactancia (< 18 años)	1055
Mujeres en lactancia (> 18 años)	580

Existen dos tipos de trastornos que se pueden generar por inadecuados niveles de fósforo en el organismo. En primer lugar está la Hipofosfatemia, que se produce cuando existe una baja concentración sérica de fosfato inorgánico ( $< 2.5 \text{ mg/ dL}$ ,  $0.8 \text{ mmol/ L}$ ); está relativamente presente en pacientes hospitalizados con tratamiento de ciertas drogas médicas, personas desnutridas, anoréxicas, diabéticas y con alguna alteración en las glándulas paratiroides. Entre sus principales efectos destacan: la disminución de las concentraciones de ATP en los eritrocitos, aumento de eritrocitos débiles (hemólisis), deterioro en la entrega de oxígeno, acortamiento de plaquetas, lo cual se aprecia con síntomas como: insuficiencia respiratoria, dolor y debilidad muscular y óseo, dificultad para caminar, vómito [14].

Por otra parte, una elevada concentración sérica de fosfato inorgánico ( $> 6.5 \text{ mg/ dL}$ ), desemboca en un trastorno conocido como Hiperfosfatemia, la cual es menos frecuente que la primera, debido a que el riñón elimina el exceso de fosfato de la sangre; sin embargo, personas que presenten insuficiencia renal o hipoparatiroidismo, pueden padecer este trastorno. Se caracteriza por conllevar a una hipocalcemia (disminución de los niveles de calcio), lo cual produce que se movilice el calcio de los huesos a otras zonas del organismo como la sangre y los tejidos, ocasionando calcificación en vasos, corazón, riñones [14].

### **1.1.2. Fuentes naturales**

El fósforo se encuentra ampliamente distribuido en alimentos de origen animal y vegetal en forma de fosfatos; entre las principales fuentes se tiene: carnes, pescados, lácteos, frutos secos, legumbres, verduras, y cereales, como se puede apreciar en la Tabla 1.2.

**Tabla 1.2. Contenido de fósforo (mg/ 100 g de la porción aprovechable de alimento)**

[15]

<b>ORIGEN ANIMAL</b>		<b>ORIGEN VEGETAL</b>	
<b>Alimento</b>	<b>Fósforo (mg)</b>	<b>Alimento</b>	<b>Fósforo (mg)</b>
Leche pasteurizada	87	Lechuga	23
Camarones	136	Tomate riñón	28
Salami	138	Cebolla paiteña	29
Carne de cerdo	182	Acelga cruda	34
Carne de res cruda	198	Apio	44
Huevo entero	198	Berro	84
Atún enlatado en aceite	218	Brócoli	108
Queso de mesa	504	Arveja tierna	124

Las personas omnívoras ven satisfecha su ingesta de fósforo al consumir alimentos de origen animal y vegetal, sin embargo, las personas vegetarianas y veganas, deben incrementar el consumo de ciertos alimentos para compensar la cantidad del mineral inherente a las fuentes animales. En este contexto, se puede considerar que una de las mejores alternativas es la ingesta de mayores porciones de ciertas hortalizas.

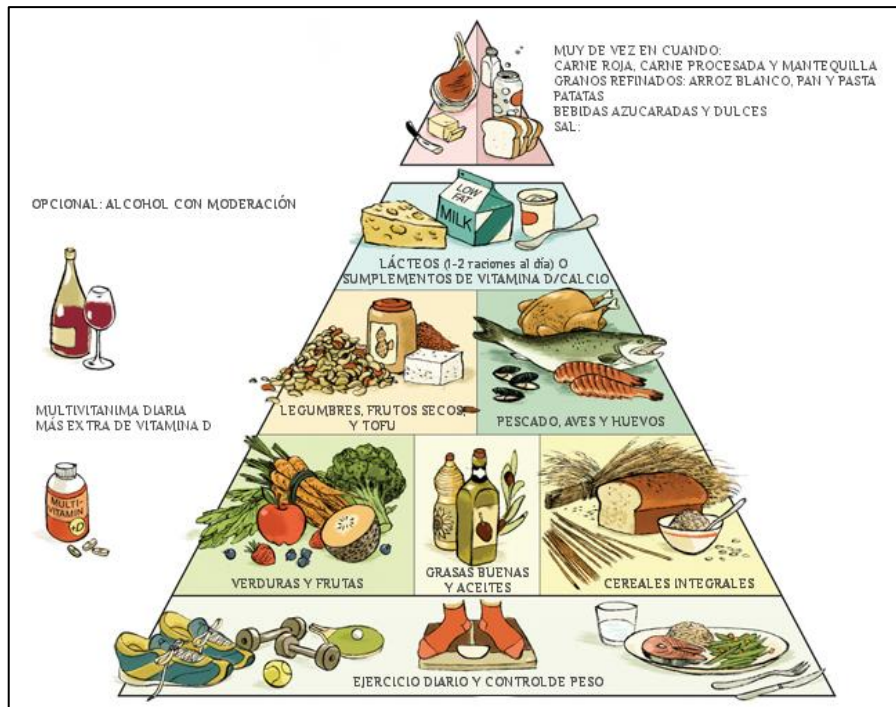
#### **1.1.2.1. Las hortalizas**

Según el Código Alimentario Español (CAE), se define como “hortaliza” a cualquier planta herbácea cultivada en un huerto que pueda ser utilizada como alimento, ya sea de forma cruda o cocida [16]; incluyen a las verduras y legumbres verdes. Las hortalizas poseen un aroma y un color característicos, que van de acuerdo a la variedad y su composición química.

Dentro de su composición podemos encontrar una elevada cantidad de agua (entre el 75 y 95% del peso total) [17], motivo por el cual, contribuyen a la hidratación del organismo, como también a la eliminación de sustancias tóxicas. Representan un aporte bajo en cuanto se refiere a glúcidos, en base a lo cual se agrupan en tres categorías: aquellas que contienen menos del 5 % (apio, acelga, espinaca), las que tienen entre el 5 - 10 % (zanahoria, cebolla, alcachofa, puerro), y finalmente, las que muestran más del 10 % de carbohidratos (papa, mandioca, yuca) [9].

A causa de su bajo aporte de carbohidratos, y aún menor de proteínas (1 – 5 %) y de grasas (0,1 - 0,3 %), su aporte calórico se estima entre 20 y 40 calorías por cada 100 gramos, razón por la cual, las hortalizas son recomendables para una dieta contra la obesidad [13]. Otra de sus destacables propiedades nutritivas, es su riqueza en micronutrientes; las hortalizas cuentan con vitaminas tanto hidrosolubles (vitamina C y las del grupo B), como liposolubles (A, D, E y K); por otra parte, entre los minerales, se pueden encontrar: potasio, magnesio sodio, hierro, fósforo, y en menores cantidades, yodo, selenio, cromo [9,17].

Por todos estos componentes, además de contar con fibra y sustancias antioxidantes (como carotenoides y compuestos fenólicos) -que juegan un rol de enorme interés al disminuir el riesgo de contraer ciertas enfermedades, como también el retrasar la aparición de los deterioros funcionales asociados al proceso de envejecimiento- las hortalizas se ubican junto a las frutas en el segundo piso de la pirámide alimenticia propuesta por la Universidad de Harvard que se muestra en la Figura 1.1.



**Figura 1.1. Pirámide Alimenticia [18]**

Existen varias formas de clasificar a las hortalizas, una de las cuales se mencionó anteriormente (contenido de glúcidos), otra es en base a su color (de hoja verde, amarillas o de otro color), sin embargo, la FAO toma en cuenta la parte comestible de la planta [8], en base a lo cual se tienen las siguientes categorías:

- **Raíces:** zanahoria, remolacha, rábano.
- **Hojas:** acelga, achicoria, lechuga, espinaca, perejil, apio.
- **Tallos y bulbos:** cebolla, puerro, ajo, espárragos.
- **Flor y coles:** alcachofa, coliflor, brócoli, col de brúcelas.
- **Fruto:** tomate, arveja, zapallo.

En este estudio se escogieron dos especies de hortalizas pertenecientes a grupos diferentes de esta clasificación. Para su selección, se tomaron en cuenta dos factores, el primero fue

que presenten un contenido diferente de fósforo; es decir, una especie debía presentar baja concentración y la otra una alta concentración de este mineral, a fin de abarcar el rango esperado de concentración del analito, el segundo factor fue la facilidad de obtención de las especies; por lo cual, la acelga y el brócoli se ajustaron a estos requerimientos.

➤ **Brócoli**



**Figura 1.2. Porción comestible del brócoli (*Brassica oleracea italica*) [19]**

El brócoli o *Brassica oleracea italica* es un miembro de la familia *Cruciferae*, es una hortaliza cuya parte consumible son las flores antes de abrirse, que se agrupan en inflorescencias. Tiene una gran importancia desde el punto de vista nutricional, debido al número de nutrientes que aporta, entre los que se encuentran: vitamina A (en forma de beta - caroteno), vitaminas (B1, B2, B3, B6, E, C) y ácido fólico. Se le atribuyen: efectos antioxidantes debido a los beta - carotenos, isocianatos, luteína y contenido de vitamina C; además de efectos anticancerígenos, gracias a un gran cantidad de glucosinolatos. Entre otras propiedades se tienen: antianémicas, laxantes, diuréticas y depuradoras de la sangre [19,20].

➤ **Acelga**



**Figura 1.3. Porción comestible de la acelga (*Beta vulgaris L*) [21]**

La acelga o *Beta vulgaris L* es un miembro perteneciente a la familia de las *Quenopodiaceae*. Esta hortaliza, cuya parte comestible son sus hojas de color verde brillante, se consume normalmente cocida en sopas o ensaladas, brindan un bajo aporte calórico ya que posee cantidades muy bajas de hidratos de carbono, proteínas y grasas, pero tiene un alto valor nutritivo, ya que aporta fibra, vitaminas (A, C y niacina), ácido fólico y minerales (yodo, fósforo, potasio, hierro y magnesio). Se le atribuyen propiedades laxantes, digestivas y diuréticas [19,21].

## **1.2. Metodologías de análisis de fósforo**

La determinación de fósforo en alimentos se realiza empleando métodos espectrofotométricos. Un ejemplo es el método del vanadato - molibdato, donde la solución problema es tratada con un reactivo que contiene ácido molíbdico y ácido vanádico, para formar un complejo amarillo de ácido vanadimolibdofosfórico cuya absorbancia se lee a 330 nm, aunque también se han obtenido resultados satisfactorios en la región de 420 - 480 nm [22]. Por otra parte, el método más usado es el de azul de

molibdeno, en el cual se emplea una solución de molibdato que reacciona con la solución problema que contiene ortofosfato, de tal manera que el fosfomolibdato formado se reduce en presencia de un agente reductor (cloruro estañoso, ácido ascórbico, fenilhidracina o hidroquinona), y se genera un compuesto de color azul (azul de molibdeno) cuya absorbancia máxima se lee a 823 nm [22].

Existen otras técnicas que pueden utilizarse para realizar este análisis, pero que no se emplean comúnmente, debido a dificultades con la matriz o con el manejo de instrumentos, factores económicos, sensibilidad insuficiente. Entre estas se pueden señalar: el método de Olsen modificado y la fluorescencia de rayos-x de energía dispersa [23].

En todos estos casos, y en lo que respecta al análisis de fósforo en vegetales u hortalizas, el tratamiento de la muestra es similar, ya que se basa en la mineralización de ésta a elevadas temperaturas (450 - 550 °C), es decir, se utiliza una digestión vía seca, excepto para el caso de la técnica de fluorescencia de rayos-x de energía dispersa, en donde la muestra es secada a temperaturas que oscilan los 200 °C, luego es pulverizada y medida directamente [23].

### **1.2.1. Digestión vía seca**

Este tratamiento representa una vía sencilla para la destrucción de la materia orgánica, se lo realiza sometiendo a la muestra durante algunas horas a temperaturas elevadas (alrededor de los 500 °C) en presencia de oxígeno, para lo cual se emplea un horno mufla. La obtención de cenizas blancas o ligeramente grises indican la finalización de la destrucción de la parte orgánica, tras lo cual, se debe disolver este residuo a un volumen

apropiado utilizando un ácido adecuado. Los inconvenientes al emplear este tratamiento son la probabilidad de contaminación cruzada y la posibilidad de una pérdida de analito por volatilización, lo que es un problema cuando se pretende analizar a nivel traza [24].

### **1.2.2. Digestión mediante microondas**

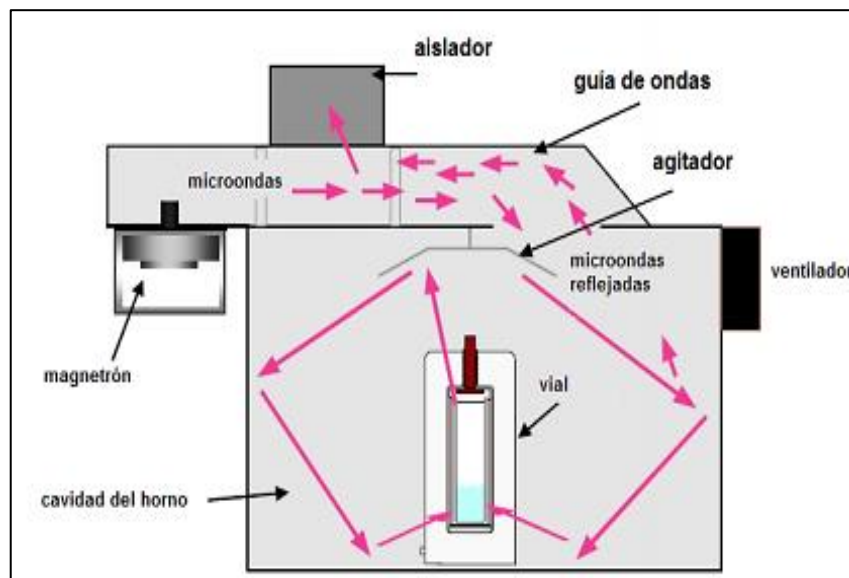
Es una variación de la digestión húmeda, debido a que, en ésta se emplea la energía microondas para calentar la mezcla de muestra - solvente en un recipiente cerrado y bajo ciertas condiciones controladas, como son la temperatura y el tiempo, lo cual permite destruir la matriz y extraer el analito de interés desde la muestra hacia el solvente para poder posteriormente realizar el análisis requerido [3].

En comparación a los métodos tradicionales de digestión: vía húmeda y vía seca, la digestión mediante microondas presenta varias ventajas. Entre sus puntos más destacados se encuentran [25]:

- Disminución en el tiempo de digestión.
- Impide pérdida de muestra.
- Posibilidad de tratar múltiples muestras a la vez.
- Uso de cantidades mínimas de reactivos.
- Control de presión y temperatura de la reacción.

➤ **Principio de funcionamiento del horno de microondas**

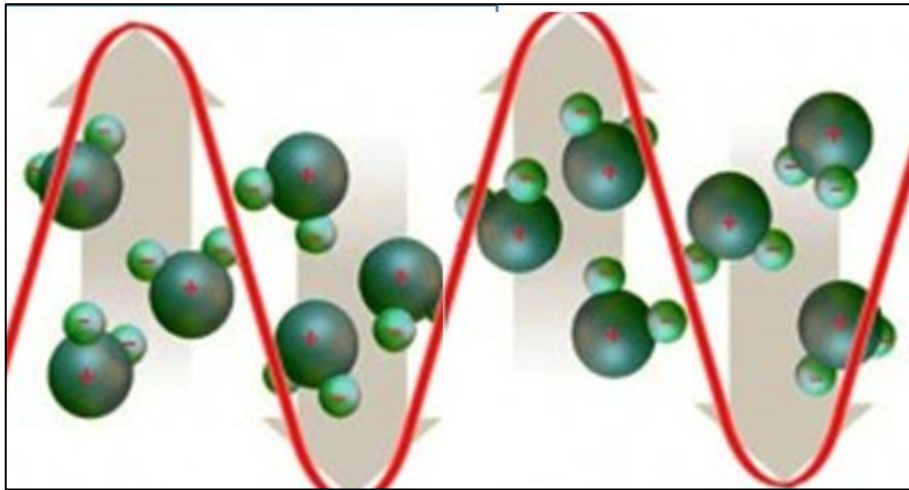
El funcionamiento del horno de microondas aprovecha la energía generada por un magnetrón, el cual crea ondas de 2.45 GHz, las cuales son propagadas hacia el interior de una cavidad donde se encuentra la sustancia (líquida o sólida). En esta cavidad, las microondas son distribuidas en múltiples direcciones, gracias a un agitador, como se puede observar en la Figura 1.4.



**Figura 1.4. Diagrama de los principales componentes de un horno microondas [26].**

Cuando dichas ondas chocan con la sustancia consiguen agitar a las moléculas polares (como el agua) presentes en su estructura. Debido a que este tipo de moléculas, al ser expuestas a un campo electromagnético intentan alinearse con éste, se producen movimientos; sin embargo, en el microondas dicho campo es fluctuante, es decir, que invierte su dirección miles de veces por segundo (en función de la frecuencia del magnetrón), lo cual obliga a que las moléculas se den múltiples vueltas a la par que el campo se invierte, así, este procedimiento realizado simultáneamente por millones de

moléculas dipolares da como resultado roces entre ellas, lo que ocasiona una gran dispersión de energía que finalmente se convertirá en calor (proceso denominado calentamiento dieléctrico) [26,27]. En la Figura 1.5 se muestra una representación de este fenómeno.

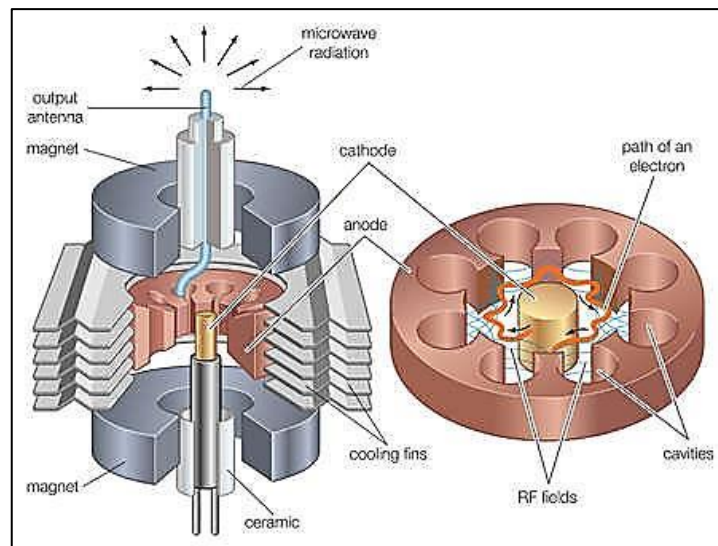


**Figura 1.5. Representación de la alineación de moléculas polares con un campo fluctuante [28]**

### ➤ Instrumentación

El magnetrón es la parte más relevante del microondas, ya que, es el encargado de convertir la energía eléctrica en energía electromagnética. Fue desarrollado a finales de la década de los 40' por el doctor Percy Spencer con la finalidad de alimentar radares a través de una fuente radioeléctrica potente. A pesar que, las configuraciones externas de los magnetrones pueden variar según la marca y el modelo, los componentes básicos, mostrados en la Figura 1.6, son los mismos: placa (*ánodo*), filamento (*cátodo*), antena e imanes [29].

El filamento (*cátodo*) se encuentra conectado al polo negativo de una fuente de corriente continua, cuando éste se calienta, empieza a emitir electrones, los cuales son atraídos a la placa (*ánodo*), que debido a la acción de un campo magnético producido por los imanes a cada extremo del magnetrón, obligan a los electrones a girar alrededor del filamento en forma espiral para alcanzar el polo positivo, esto genera una onda electromagnética (microonda) que es recogida y enviada hacia la cavidad interna del horno mediante la antena situada como una proyección del ánodo [29,30].



**Figura 1.6. Diagrama interno de un magnetrón [30]**

Dentro de la cavidad del microondas se encuentran, dependiendo del modelo, un agitador para difundir las microondas dentro de esta, además de un plato giratorio, cuya función es rotar los recipientes o vasos de digestión para conseguir una mejor interacción de las microondas con la muestra. Sin embargo existen otros tipos de componentes localizados en la cavidad del horno como los sensores. En el equipo de microondas empleado para este trabajo, el MARS 6 One Touch, posee un control de potencia y tres tipos de sensores para controlar: presión, temperatura y recuento de vasos digestores [31].

A través de una sonda de fibra óptica unida al vaso de referencia se realiza una medición de la temperatura, sin embargo, los sensores de tipo infrarrojo, son los que realizan un monitoreo sin la necesidad de entrar en contacto directamente con el vaso, realizando funciones como: un control del número de vasos empleados y la temperatura de cada uno; por otra parte, la presión se mide de dos maneras, una de las cuales es mediante un sensor de presión de referencia de vaso único logrando controlar la presión hasta los 1500 psi y la otra manera es a través de un sensor de presión sin contacto que realiza una monitorización del sistema de salida de gases incluyendo a los óxidos de nitrógeno ( $\text{NO}_x$ ), y otros vapores ácidos generados durante la digestión [31].

### **1.2.3. Espectrofotometría Ultravioleta - Visible**

El espectro electromagnético se define como el conjunto de longitudes de onda de todas las radiaciones electromagnéticas posibles, las cuales pueden cubrir longitudes desde kilómetros (ondas de radio) hasta el tamaño del núcleo de un átomo (rayos gamma). Cuando se mide la interacción entre la radiación electromagnética y la materia se denomina “espectrometría” [24]. En este sentido, la Espectrofotometría Ultravioleta - Visible utiliza la radiación electromagnética de longitudes de onda comprendidas entre (400 - 700 nm) perteneciente al rango del visible y ciertas longitudes de regiones adyacentes, como el ultravioleta cercano ( $> 150$  nm) y el infrarrojo cercano ( $< 1100$  nm) [32].

Esta técnica se aplica principalmente a líquidos y, muy raramente, a gases. Dado que las moléculas absorben las radiaciones electromagnéticas, se puede determinar la

concentración de éstas en solución, en función de la cantidad de luz que sea absorbida por las moléculas, para lo cual se aplica la Ley de Lambert-Beer.

Esta ley establece que la cantidad de radiación absorbida por una muestra (absorbancia) guarda una relación directa con las propiedades intrínsecas del analito, con su concentración y con la longitud de la trayectoria del haz de radiación al atravesar la muestra [33]. La expresión matemática es:

$$A = \varepsilon c b \quad (1.1)$$

Donde:

A = Absorbancia

c = concentración de la especie absorbente

$\varepsilon$  = coeficiente de absorción propia de cada analito (absortividad)

b = longitud del medio que atraviesa la radiación

Si se mantienen  $\varepsilon$  y  $b$  constantes, la concentración del analito es directamente proporcional a la absorbancia de la solución, por lo que se puede elaborar una curva de calibración con soluciones de concentración conocida para encontrar la ecuación de la recta que luego permitirá establecer la concentración de una solución desconocida mediante interpolación.

Esta ley se cumple para concentraciones menores a  $10^{-2}$  M; es decir, que a concentraciones mayores a 0.01M se puede generar una desviación del comportamiento lineal y la recta tendría una curvatura [34].

## ➤ Instrumentación

Para efectuar la medición de la absorbancia de la luz visible - ultravioleta se emplea un equipo denominado Espectrofotómetro Ultravioleta - Visible que tiene la capacidad de proyectar un haz de luz a través de un dispositivo que selecciona una longitud de onda determinada, la misma que incide en una muestra. La intensidad de la luz que sale de la muestra es captada y comparada con la intensidad de la luz que incidió inicialmente sobre la misma y a partir de esto se calcula la absorbancia para determinar la concentración del analito de interés presente en la muestra.

Aunque su diseño puede variar dependiendo de marcas y modelos, en especial con la incorporación de ordenadores para el análisis de datos, los componentes básicos son: fuente de radiación, rendija de entrada, monocromador, rendija de salida, celda, detector, y un sistema de presentación de datos [35], esquematizados en la Figura 1.7.

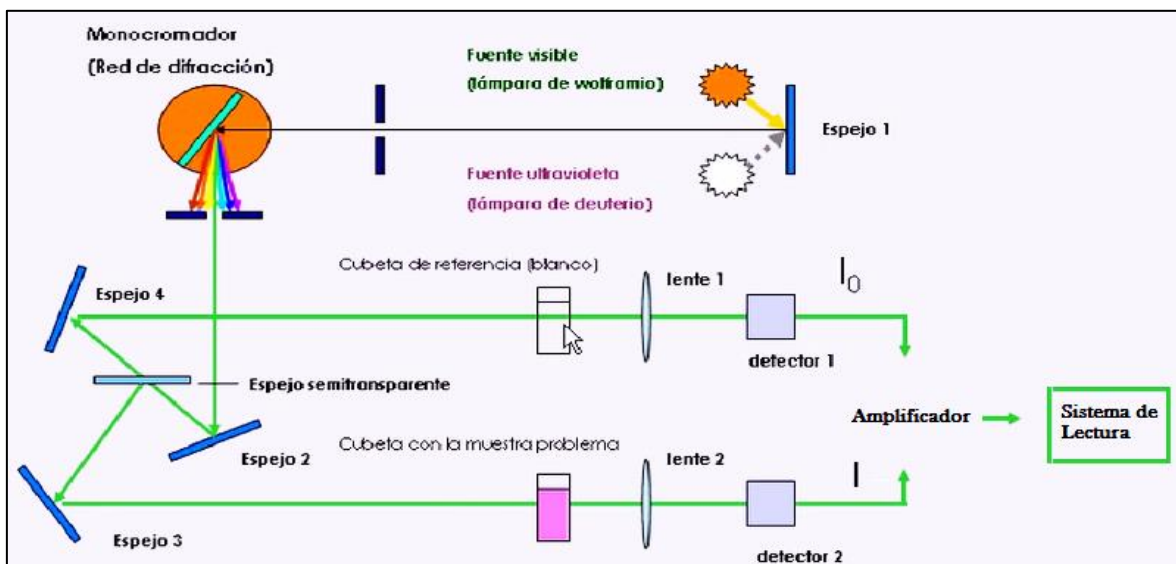


Figura 1.7. Esquema básico de un Espectrofotómetro UV - VIS de doble haz [36]

- **Fuente de radiación:** Es la encargada de generar el haz de luz. Entre las que se emplean comúnmente están: de Deuterio (160 - 375 nm), de Tungsteno/Wolframio (2350 - 2500 nm) o de arco de Xenón (200 - 1000 nm) [33].
- **Rendijas y Monocromador:** Seleccionan un haz de radiación monocromática para que llegue a la celda con la muestra.
- **Celda o cubeta:** Es el recipiente donde se coloca la muestra para la medición, debe permitir el paso de radiación de la región espectral de interés. Dependiendo de la muestra y la región del espectro con la que se trabaje, pueden estar hechas de: plástico, vidrio (para regiones comprendidas entre los 350 - 2000 nm), de cuarzo o sílice fundida (para las regiones ultravioleta y visible) [33,35].
- **Detector:** Es el responsable de percibir la intensidad de la radiación, y convertirla en una señal eléctrica de magnitud proporcional. Existen 3 tipos de detectores que son muy utilizados en espectrofotómetros, y son: células fotovoltaicas, fototubo y tubo fotomultiplicador.
- **Sistema de presentación y lectura de datos:** Traduce la señal eléctrica procedente del detector en valores numéricos o gráficas.

### ➤ Interferencias

Una interferencia se define como cualquier efecto que provoca una variación de la señal (respuesta) del analito, lo que conlleva a un aumento o disminución aparente de este afectando a la exactitud [37]. Se pueden distinguir diferentes tipos de interferencias en espectrofotometría, siendo las principales:

- **Químicas:** Factores como el tipo solvente, temperatura de la muestra y pH pueden producir alteraciones en la posición e intensidad de las bandas de absorción de las moléculas; por ejemplo, una modificación del pH puede afectar la estabilidad de algunos complejos y con ello a su espectro de absorción [35]. Otra fuente de interferencia química se debe a la calidad de reactivos, donde la pureza de los mismos juega un papel crucial, ya que puede provocar: soluciones estándar con concentraciones inferiores a las reales, la no formación de complejos, entre otras [34]. Finalmente, se puede incluir en este grupo a la interacción entre especies absorbentes, lo que puede ocasionar que algún compuesto absorba en la misma región que el de interés, resultando así en un error en la medida de absorbancia [35].
- **Instrumentales:** Por un lado tenemos a la interferencia generada por el ruido instrumental y, por otro, a la interferencia ocasionada por la presencia de una considerable cantidad de radiación parásita, que se refiere a la cantidad de radiación dispersa que contamina a la radiación principal a la misma longitud de onda seleccionada que emerge del monocromador. Esto afecta de manera negativa a la exactitud de las medidas, es decir, muestran una absorción menor de la real [35].

### 1.3. Tratamiento estadístico de resultados

El tratamiento estadístico de datos tiene como objetivo mejorar la calidad y fiabilidad de la información obtenida en un análisis, debido a que los resultados en cualquier campo no están libres de errores (sistemáticos o aleatorios) y presentan cierta incertidumbre. Por lo tanto, se utilizan ciertas pruebas estadísticas, con el fin de establecer resultados con una precisión y exactitud aceptables, como también conocer la tendencia que estos siguen.

### 1.3.1. Medidas de tendencia central y dispersión

#### 1.3.1.1. Media aritmética

La media aritmética o promedio ( $\bar{x}$ ), es el cociente resultante entre la suma de todos los valores de una serie y el número de elementos que conforman la serie. Se obtiene con la siguiente fórmula:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{N} \quad (1.2)$$

#### 1.3.1.2. Desviación estándar

La desviación estándar o típica (s), es una medida del grado de dispersión de los datos obtenidos con respecto al valor promedio. Se la calcula a partir de la raíz cuadrada de la variancia con la siguiente fórmula:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (1.3)$$

### 1.3.2. Pruebas de significación

Las pruebas de significación estadística son útiles para comparar variables entre distintas muestras. Dependiendo de si la distribución de la muestra es normal o no, se realizan dos clases de pruebas: paramétricos (prueba z, prueba t, ANOVA) o no paramétricos (prueba de Ji cuadrado, prueba de Kolmogorov-Smirnov, entre otras).

### 1.3.2.1. Prueba $t$

La prueba  $t$  o de Student se emplea cuando se desea determinar si dos medias de dos grupos diferentes son iguales o, por el contrario, difieren estadísticamente entre sí. Además, hay que tomar en cuenta que, cuando se calcula el valor  $t$ , se debe hacer una comparación con los valores  $t$  tabulados para el nivel de confianza con el que se desea trabajar [38].

La prueba se realiza de la siguiente manera: se plantea una hipótesis nula ( $H_0$ ) que hace referencia a la no existencia de diferencias significativas entre el valor teórico y el valor experimental obtenido; si esta  $H_0$  es rechazada, entonces se acepta la hipótesis alterna ( $H_1$ ) que indica la presencia de diferencias significativas entre los valores.

La ecuación viene dada por:

$$t = \frac{|\bar{x} - \mu|}{s} \sqrt{n} \quad (1.4)$$

Donde:

$t$  = valor experimental

$\bar{x}$  = media de la muestra

$\mu$  = valor teórico

$s$  = desviación estándar de la muestra

$n$  = tamaño de muestra

El valor  $t$  experimental ( $t_{exp}$ ) obtenido se compara con un valor  $t$  teórico ( $t_{teo}$ ) con un nivel de significación  $\alpha = 0.05$  o, lo que es lo mismo, a un 95% de confianza. En el caso de que se presente un  $t_{exp}$  mayor al  $t_{teo}$ , existe una diferencia significativa entre los

resultados y se rechaza la hipótesis nula, caso contrario si  $t_{exp}$  es menor a  $t_{teo}$ , la hipótesis nula es aceptada [38].

### 1.3.2.2. Análisis de varianza

El análisis de varianza (ANOVA, por sus siglas en inglés *Analysis of Variance*) permite, en esencia, determinar las variaciones que se generan entre los participantes u observaciones dentro de un mismo grupo y entre cada grupo [38].

Este análisis es muy útil, sobre todo en trabajos analíticos, cuando se presentan situaciones en que el número de muestras y/o grupos a comparar exceden de dos, ya que al poder comparar simultáneamente más de dos medias, se consigue superar las limitaciones de hacer contrastes bilaterales por parejas y, de este modo, estableciendo si existen o no diferencias significativas entre ellas. Para ello se emplean varias fórmulas, expuestas en la Tabla 1.3 [39].

**Tabla 1.3. Tabla de fórmulas empleadas en un análisis de varianza**

Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F
Entre Grupos	k-1	$SCE = n \sum_{i=1}^n (\bar{x}_i - \bar{x})^2$	$CME = \frac{SCE}{k-1}$	$\frac{CME}{CMD}$
Dentro de los Grupos	(n-1)k	$SCT = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} (\bar{x}_{ij} - \bar{x}_i)^2$	$CMD = \frac{SCT}{(n-1)k}$	
Total	k-1	$SC_{Total} = SCE + SCT$		

Donde:

k = número de grupos

n = número de repeticiones

$x_{ij}$  = valor de cada réplica

$x_i$  = media de cada grupo

$x$  = media total

F = valor F de Fisher (relación entre varianzas)

El valor F calculado ( $F_{exp}$ ) se compara con un valor F tabulado ( $F_{teo}$ ) con un 95% de confianza, en el caso de que se presente un  $F_{exp}$  mayor al  $F_{teo}$ , existe una diferencia significativa entre los resultados, caso contrario (si  $F_{exp}$  es menor a  $F_{teo}$ ), indica que no existen diferencias significativas [39].

### 1.3.2.3. Prueba HSD de Tukey

La prueba de Tukey (HSD, por sus siglas en inglés *Honestly Significant Difference*) permite la comparación de las medias de los  $t$  niveles de un factor tras haber rechazado la hipótesis nula de igualdad de medias mediante la técnica ANOVA; con esto, se intenta determinar cuál o cuáles medias son significativamente diferentes de las otras [39]. El modelo estadístico de Tukey es el que se expone a continuación:

$$Q = q_{t; N-t} (0,05) \sqrt{\frac{MCD}{n}} \quad (1.5)$$

Donde:

N = número total de observaciones

t = número de niveles del factor

$q_{t; N-t} (0,05)$  = número en la tabla Tukey a un 95% de confianza

MCD = media de cuadrados dentro de los grupos

n = tamaño muestral de cada nivel de factor

Si el valor absoluto de la diferencia entre las medias supera el HSD calculado, se da por entendido que esa diferencia es estadísticamente significativa. La prueba HSD de Tukey tiene el mismo objetivo que el ANOVA, pero de una manera más detallada ya que identifica las medias muestrales que difieren significativamente.

## CAPÍTULO 2

### 2. PARTE EXPERIMENTAL

#### 2.1. Muestreo

El tipo de muestreo empleado fue el aleatorio simple, mismo que consistió en la toma de dos muestras de cada variedad de hortalizas (brócoli y acelga), que fueron adquiridas en dos supermercados populares de la ciudad de Quito (zonas marcadas con color azul y rojo) en la Figura 2.1. El muestreo se efectuó el primer día de cada mes de dos meses no seguidos dentro de un periodo de tres meses, en cada lugar de muestreo se obtuvo aproximadamente un kilogramo de cada variedad. Las muestras recolectadas en el primer mes se denominaron lote 1 y las del tercer mes lote 2.

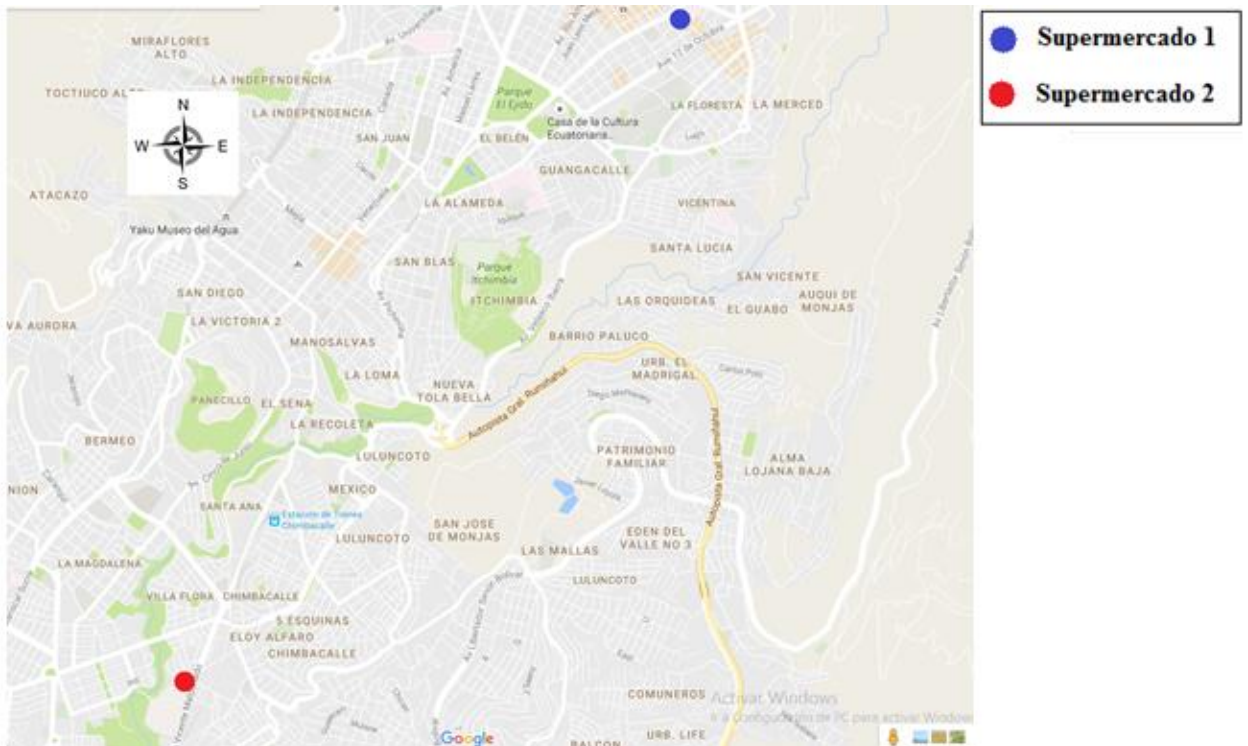


Figura 2.1 Zonas de muestreo señaladas en la ciudad de Quito

## **2.2. Preparación de la muestra**

### **Equipos**

- Molino eléctrico de granos Victoria
- Estufa Binder FD 115

### **Material**

- Bolsas plásticas Ziploc 20 x 18 cm

### **Procedimiento**

La parte comestible de las hortalizas fue separada (eliminando el tallo), luego se cuarteó la muestra hasta alcanzar cerca de 500 g. Seguidamente se procedió a cortar la muestra en pequeños trozos y se la secó en la estufa a  $105 \pm 2$  °C durante cuatro horas. Posteriormente, esta fue pulverizada en el molino eléctrico de granos hasta la obtención de una muestra homogénea cuyo tamaño de partícula fue inferior a 2 mm. Finalmente fue almacenada en una bolsa Ziploc 20 x 18 cm a temperatura ambiente.

## **2.3. Determinaciones analíticas**

Los métodos que fueron utilizados corresponden a los descritos por la 18<sup>va</sup> edición del compendio publicado por la AOAC (*Association of Analytical Communities*, siglas en inglés). Los análisis se realizaron por triplicado para cada muestra. Cabe señalar que los equipos usados para los análisis se encontraban calibrados, con lo cual se asegura la confiabilidad de las mediciones.

### **2.3.1. Determinación de humedad (AOAC 925.10)**

El método se basa en una determinación gravimétrica de la disminución de peso que experimenta una muestra debido a la evaporación del agua por calentamiento bajo condiciones normalizadas dentro de una estufa.

#### **Equipos**

- Balanza Analítica Mettler Toledo ML204, max 220 g, d=0,1 mg
- Estufa Binder FD 115

#### **Materiales**

- Cápsulas de porcelana
- Espátula de acero inoxidable
- Desecador de vidrio con sílica gel

#### **Procedimiento**

Se taró la cápsula de porcelana durante dos horas a una temperatura de  $130 \pm 2$  °C ( $P_c$ ), luego se pesó  $5 \pm 0.05$  g de muestra fresca homogenizada ( $P_m$ ). Posteriormente se colocó la cápsula con la muestra dentro de la estufa por dos horas a  $130 \pm 2$  °C (el tiempo se cronometró desde que la estufa alcanzó la temperatura marcada). Transcurrido dicho tiempo, se dejó enfriar dentro del desecador de vidrio hasta que alcance temperatura ambiente. Finalmente, la cápsula de porcelana con la muestra seca fue pesada hasta obtener peso constante ( $P_f$ ).

## **Cálculos**

$$\%H = 100 - \left( \frac{P_f - P_c}{P_m} \times 100\% \right) \quad (2.1)$$

Donde:

%H = Porcentaje de humedad

P<sub>c</sub> = Peso de la cápsula de porcelana tarada

P<sub>m</sub> = Peso de la muestra

P<sub>f</sub> = Peso de la capsula + muestra seca

### **2.3.2. Determinación de cenizas (AOAC 923.03)**

Se basa en la destrucción de la materia orgánica de la muestra al someterla a temperaturas elevadas mediante un horno mufla, donde se obtiene como resultado un residuo (cenizas) gris o blanco. El residuo contiene a los minerales presentes en la muestra en forma de óxidos, carbonatos, fosfatos o sulfatos.

## **Equipos**

- Balanza Analítica Mettler Toledo ML204, max 220 g, d=0,1 mg
- Mufla Snol 10740
- Sorbona Labconco CEX 120/ 011016

## **Materiales**

- Crisoles de porcelana con tapa
- Pinza para crisoles
- Espátula de acero inoxidable
- Desecador de vidrio

## **Procedimiento**

Se taró el crisol de porcelana en la mufla durante dos horas a  $550 \pm 2$  °C ( $P_c$ ), luego se pesó  $3 \pm 0.05$  g de muestra seca ( $P_m$ ). Posteriormente, se colocó el crisol con la muestra ligeramente tapada dentro de la mufla por cinco horas a  $550 \pm 2$  °C hasta la obtención de cenizas blancas o ligeramente grises, tras lo cual se retiró para que se enfríe dentro del desecador de vidrio hasta alcanzar temperatura ambiente. Finalmente, se pesó el crisol con las cenizas hasta obtener peso constante ( $P_f$ ).

## **`Cálculos**

$$\%C = \left( \frac{P_f - P_c}{P_m} \times 100 \right) \quad (2.2)$$

Donde:

$\%C$  = Porcentaje de humedad.

$P_c$  = Peso de la cápsula de porcelana tarada.

$P_m$  = Peso de la muestra.

$P_f$  = Peso de la cápsula + muestra seca.

### **2.3.3. Digestión vía seca (AOAC 995.11)**

Consiste en la destrucción de la matriz para poder extraer el fósforo; esto se consigue incinerando la muestra en una mufla a una temperatura elevada ( $550 \pm 2$  °C) y luego se disuelve el residuo (cenizas) con ácido clorhídrico concentrado.

## **Equipos**

- Balanza Analítica Mettler Toledo ML204, máx. 220 g, d=0,1 mg

- Mufla Snol 10740
- Plancha de calentamiento Velp Scientifica RC2/169359
- Sorbona Labconco CEX 120/ 011016
- Purificador de agua Thermo Scientific MicroPure

### **Materiales**

- Crisoles de cuarzo con tapa
- Espátula de acero inoxidable
- Pinza para crisoles
- Desecador de vidrio
- Vaso de precipitación de 100 mL
- Embudos cónicos de cristal
- Gradilla de madera
- Papel filtro cualitativo 125mm. Whatman 1001 - 125
- Vidrios de reloj
- Balones aforados de 50mL y 100 mL
- Gotero plástico
- Varilla de vidrio
- Frascos plásticos de 100 mL

### **Reactivos**

- Agua tipo 1 (Conductividad < 0,055  $\mu\text{S}/\text{cm}$ )
- Ácido clorhídrico 12.1 N grado analítico (Fisher Scientific)
- Óxido de zinc grado analítico (BDH Chemicals)
- Hidróxido de potasio grado analítico (BDH Chemicals)

- Solución de hidróxido de potasio al 50 % p/v: 50 g de hidróxido de potasio disueltos en agua tipo 1 y aforados a 100 mL. Se disuelve primero en una porción 30 - 50 mL de agua tipo 1, lo cual produce una reacción exotérmica; se deja enfriar y luego se trasvasa y afora.

### **Procedimiento**

Se pesó  $0.5 \pm 0.05$  g de muestra seca pulverizada junto con una cantidad similar de óxido de zinc, en un crisol de cuarzo, y se lo introdujo, tapado ligeramente, dentro de la mufla a  $550 \pm 2$  °C durante cuatro horas, hasta la obtención de cenizas blancas o ligeramente grises. Tras la calcinación, se retiró el crisol y se dejó enfriar dentro del desecador de vidrio hasta temperatura ambiente; luego, se añadió 5 mL de agua tipo 1 y 5 mL de ácido clorhídrico concentrado. Se tapó el crisol con un vidrio de reloj y se calentó suavemente sobre una plancha de calentamiento hasta disolución de las cenizas.

Se colocó un embudo de vidrio con un papel filtro cualitativo en un balón aforado de 100 mL y se transfirió el contenido del crisol, lavándolo con tres porciones de 5 mL de agua tipo 1 caliente. Una vez que el balón alcanzó temperatura ambiente, se neutralizó el contenido con una solución de hidróxido de potasio al 50 % p/v hasta ligera opalescencia. Luego, gota a gota, fue añadido ácido clorhídrico concentrado hasta que la opalescencia desapareció (se añadieron dos gotas extras de ácido clorhídrico para asegurar acidez). Finalmente, se procedió a aforar con agua tipo 1 hasta 100 mL y se almacenó en un frasco plástico de 100 mL.

### **2.3.4. Digestión mediante microondas**

En este proceso de digestión se emplea la energía de microondas para calentar la mezcla de muestra con disgregante en un recipiente cerrado y bajo ciertas condiciones controladas (como son temperatura y tiempo), lo cual permite destruir la matriz y extraer el analito de interés en un solvente adecuado. El disgregante generalmente empleado es ácido nítrico, pudiendo también ser utilizados ácido clorhídrico y en menor frecuencia peryódico, o a su vez, una mezcla de ácidos o un ácido con peróxido de hidrógeno.

#### **Equipos**

- Balanza Analítica Mettler Toledo ML204, max 220 g, d=0,1 mg
- Microondas MARS 6 One Touch
- Sorbona Labconco CEX 120/ 011016

#### **Materiales**

- Espátula de acero inoxidable.
- Vasos de digestión MARSXpress
- Balones aforados de 100 mL
- Gotero plástico
- Frascos plásticos

#### **Reactivos**

- Agua tipo 1 (Conductividad < 0,055  $\mu\text{S}/\text{cm}$ )
- Ácido nítrico concentrado libre de metales (Fisher Scientific)
- Peróxido de hidrógeno al 30 % grado analítico (Fisher Scientific)

- Solución de peróxido de hidrógeno al 15 %: 50 mL de peróxido de hidrógeno 30% aforados a 100 mL con agua tipo 1

### Procedimiento

Se pesó alrededor de  $0.5 \pm 0.05$  g de muestra seca y se transfirió a un vaso digestor MARSXpress, luego se añadió ácido nítrico concentrado libre de metales, ácido clorhídrico y agua oxigenada, después se programó las diferentes condiciones de temperatura y tiempo para cada ensayo, todo esto de acuerdo a lo mostrado en la Tabla 2.1. Tras la digestión en el microondas, se permitió que el vaso digestor alcance temperatura ambiente; la solución se transfirió cuantitativamente a un balón volumétrico de 100 mL y se procedió a aforar con agua tipo 1. El contenido se almacenó en un frasco plástico de 100 mL.

**Tabla 2.1. Parámetros para la digestión de muestras en horno de microondas**

CONDICIONES ENSAYO	Temperatura °C	Tiempo min	Disgregante (HNO <sub>3</sub> : H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) mL	Disgregante (HCl : HNO <sub>3</sub> ) mL
1	180	30	5:2	4:1
2	200	60	5:4	4:1
3	220	90	5:0	4:1

### 2.3.5. Determinación de Fósforo (AOAC 995.11)

El fósforo presente en la muestra digerida (en solución), se encuentra a manera de fosfato, y reacciona con el molibdato formando un complejo (fosfomolibdato) que en presencia de ácido ascórbico se reduce a azul de molibdeno y cuya absorbancia se lee a  $823 \pm 1$  nm.

## **Equipos**

- Balanza Analítica Mettler Toledo ML204, max 220 g, d=0,1 mg
- Espectrofotómetro Agilent Cary 60 UV/VIS
- Agitador magnético MyLab- SLMS3000
- Baño térmico Gemmy YCM-010E
- Sorbona Labconco CEX 120/ 011016
- Purificador de agua Thermo Scientific MicroPure

## **Materiales**

- Espátula de acero inoxidable
- Tuercas metálicas
- Balones aforados de 50 mL, 100 mL, 250 mL y 500 mL
- Vasos de precipitación de 100 mL, 400 mL y 1000 mL
- Buretas de 50 mL
- Vidrio de reloj
- Cubeta plástica
- Soporte universal
- Pipeta de volumen variable 1-5 mL Capp Bravo
- Puntas para pipetas
- Papel filtro cualitativo 125mm. Whatman 1001-125
- Macrocela rectangular de poliestireno de 1cm Agilent Cary UV
- Goteros
- Naves plásticas para pesar
- Varilla de vidrio
- Cronómetro

## **Reactivos**

- Agua tipo 1 (Conductividad < 0,055  $\mu\text{S}/\text{cm}$ )
- Fosfato monobásico de potasio grado HPLC (Fisher Scientific)
- Ácido ascórbico grado analítico (BDH Chemicals)
- Molibdato de sodio dihidratado grado analítico (Fisher Scientific)
- Ácido sulfúrico 18.1 M (Fisher Scientific)
- Solución de molibdato de sodio al 2.5% (p/v)
- Solución de ácido ascórbico al 5% (p/v)
- Solución de ácido ascórbico-molibdato en proporción 10:25
- Solución estándar stock de fósforo 1.0 mg/ mL
- Solución estándar de trabajo de fósforo 0.01 mg/ mL
- Soluciones estándar de fósforo para curva de calibración (0; 0.01; 0.02; 0.03; 0.04; 0.05 y 0.06 mg/ mL)

## **Preparación de soluciones**

### **Solución de molibdato de sodio**

- En un vaso de precipitación de 1000 mL, se colocó 300 mL de agua tipo 1 y se agregó, cuidadosamente, por las paredes 140 mL de ácido sulfúrico concentrado.
- Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se añadió 12.5 g de molibdato de sodio dihidratado. Se mezcló la solución con una varilla de vidrio y se transfirió a un balón de aforo de 500 mL.
- Se lavó el contenido del vaso con tres porciones de 10 mL de agua tipo 1. Finalmente se aforó con agua tipo 1.

### **Solución de ácido ascórbico**

- El día en el que se requirió utilizar, se pesó 5 g de ácido ascórbico en un vaso de precipitación de 100 mL. Se agregó 60 mL de agua tipo 1 y se mezcló con ayuda de un agitador magnético.
- Se transfirió el contenido a un balón de aforo de 100 mL. Se lavó el contenido del vaso con tres porciones de 10 mL de agua tipo 1 antes de aforar con agua tipo 1.

### **Solución de ácido ascórbico - molibdato**

- Se transfirió 250 mL de la solución de molibdato de sodio a un balón aforado de 500 mL. Inmediatamente se agregaron 100 mL de la solución de ácido ascórbico.
- Con agua tipo 1 se llevó a la solución hasta la línea de aforo.

### **Solución estándar stock de fósforo**

- Se pesó, en un vidrio de reloj, 2 g de fosfato monobásico de potasio para secarlos en estufa durante dos horas a  $101 \pm 2$  °C.
- Se disolvió en un vaso de precipitación de 100 mL 1.0967 g de fosfato monobásico de potasio seco en 50 mL de agua tipo 1.
- Se transfirió el contenido a un balón volumétrico de 250 mL. Se lavó el contenido del vaso tres veces con 10 mL de agua tipo 1 y luego se procedió a aforar el balón hasta los 250 mL.

### **Solución estándar de trabajo de fósforo**

- Con una pipeta se tomó 5 mL de la solución estándar stock de fósforo y se colocó en un balón aforado de 500 mL.
- Se agregó agua tipo 1 hasta aforar la disolución.

### **Soluciones estándar de fósforo para curva de calibración**

- A partir de la solución estándar de trabajo de fósforo se tomó con la pipeta volúmenes de 0, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 mL y se colocaron en balones de aforo de 50 mL por separado.
- Se agregó agua tipo 1 hasta completar 15 mL en cada balón.

### **Procedimiento**

Dependiendo del contenido de fósforo esperado, se tomó con la pipeta un volumen específico de la muestra problema (1 mL para el brócoli y 4 mL para la acelga.) y se colocó en un balón de aforo de 50 mL, luego se añadió, tanto a la solución de prueba como a las soluciones estándar, agua tipo 1 hasta alcanzar aproximadamente 15 mL. Posteriormente, desde una bureta, fueron añadidos 20 mL de solución ácido ascórbico - molibdato. Se insertó una tira de papel filtro entre el balón y su tapa para evitar que se cierre herméticamente, adicionalmente, se colocó una tuerca metálica alrededor de cada balón de aforo para asegurar su inmersión en el baño térmico, donde fueron colocados con una temperatura de  $95 \pm 1$  °C por quince minutos. Después de este tiempo, fueron retirados y enfriados dentro de una cubeta plástica que contenía agua fría. Finalmente se aforó con agua tipo 1.

Cada solución fue transferida a las celdas plásticas de 1 cm y se midió la absorbancia de las soluciones estándar y de la solución problema a una longitud de onda de  $823 \pm 1$  nm (la medición se realizó dentro de una hora a partir del desarrollo de color).

### **Cálculos**

$$P \text{ (g/100 g)} = 100 \times \frac{\left(\frac{V_2}{V_1}\right) \times P}{W} \quad (2.3)$$

Donde:

$V_1$  = volumen empleado de la solución en la reacción colorimétrica (mL)

$V_2$  = volumen del balón de aforo que contiene las cenizas de la muestra (mL)

P = cantidad de fósforo determinado mediante la curva de los estándares correspondientes  
a la absorbancia del analito (mg)

W = peso de la muestra empleada (mg)

## CAPÍTULO 3

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Determinación de Humedad y Cenizas

Se efectuaron los análisis de humedad, cenizas y la determinación de fósforo en dos variedades de hortalizas: brócoli y acelga, que fueron muestreadas en dos supermercados populares del Distrito Metropolitano de Quito. El porcentaje de humedad es importante para cualquier muestra, y para un alimento aún más, debido a que, dependiendo de la cantidad de agua presente puede facilitarse el desarrollo de bacterias y microorganismos, afectando la textura y frescura del alimento. Por otra parte, el porcentaje de cenizas del alimento se relaciona directamente con la cantidad de minerales totales que este contenga.

En las Tablas 3.1 y 3.2 se muestran los resultados del análisis proximal efectuado en las hortalizas en estudio. Los porcentajes de humedad de ambas variedades muestran una ligera diferencia, siendo la acelga aquella que posee un porcentaje mayor de agua en su composición en comparación al brócoli. Así mismo, el brócoli presenta un coeficiente de variación menor con respecto al de la acelga, con un valor del 0.55 % frente a un 1.30 % de esta última; como se observa en la Tabla 3.1. Es el lote 2 el que aporta con dicha variación, lo cual pudo deberse a que las condiciones de cultivo de las muestras pudieron ser diferentes o en su defecto a errores propios del método (aleatorios) y sistemáticos, como el tratamiento previo de la muestra (separación de la porción comestible y homogenización de la misma). Sin embargo, todos los coeficientes de variación fueron menores a 10 %, por lo cual se puede considerar que los análisis fueron precisos.

**Tabla 3.1. Contenido de humedad y cenizas en los lotes de las hortalizas estudiadas.**

	<b>Brócoli</b> ( $\bar{x} \pm s$ )		<b>Acelga</b> ( $\bar{x} \pm s$ )	
	% Humedad	% Cenizas	% Humedad	% Cenizas
Lote 1	86.89 $\pm$ 0.10	1.13 $\pm$ 0.07	89.92 $\pm$ 0.52	1.31 $\pm$ 0.02
Lote 2	86.48 $\pm$ 0.66	1.07 $\pm$ 0.03	90.99 $\pm$ 1.53	1.28 $\pm$ 0.04

$\bar{x}$ : promedio; s: desviación estándar

**Tabla 3.2. Contenido global de humedad y cenizas de las hortalizas estudiadas.**

	<b>Brócoli</b>		<b>Acelga</b>	
	% Humedad	% Cenizas	% Humedad	% Cenizas
$\bar{x}$	86.69	1.10	90.46	1.30
% CV	0.55	5.46	1.30	2.77

% CV: coeficiente de variación expresado en porcentaje

La acelga, como se puede observar en la Tabla 3.2, presenta un porcentaje de cenizas ligeramente mayor al del brócoli (1.3 % y 1.1 % respectivamente), lo cual indica que posee una cantidad superior de minerales. Además, la acelga tiene un coeficiente de variación menor al del brócoli; a diferencia del caso del porcentaje de humedad, no se observa que un lote en particular aporte con la variación (ver datos en Tabla 3.1). En todo caso, a pesar de haber obtenido una mayor fluctuación en los datos, los resultados indican una precisión satisfactoria en los análisis efectuados al tomar en consideración que el coeficiente de variación conseguido no sobrepasa el 6 %.

Si se consideran los datos de la Tabla de Composición de Alimentos Ecuatorianos de 1965, mostrados en el anexo 1, se puede afirmar que los porcentajes de cenizas para ambas muestras, poseen un valor medio en comparación con otras variedades de hortalizas como: el paico, el bledo o el perejil, cuyos porcentajes de cenizas superan el 2 %, o como especies

tales como: la cebolla paitaña, la lechuga o el zambo, cuyo porcentaje de cenizas no rebasa el 0.5 %.

### 3.2. Determinación de fósforo por vía seca

Como se puede apreciar en la Tabla 3.3 la hortaliza con mayor contenido de fósforo es el brócoli con un promedio de 108 mg/100 g de muestra en base húmeda, en comparación a la acelga que muestra un valor alrededor de 33 mg/100 g. En ambos casos el coeficiente de variación es bajo (menor al 3 %), más aún, es semejante para las dos hortalizas analizadas.

**Tabla 3.3. Concentración de fósforo (mg/100 g) empleando digestión por vía seca.**

	Brócoli		Acelga	
	$\bar{x}$	% CV	$\bar{x}$	% CV
Lote 1	106.1	2.08	33.6	0.45
Lote 2	110.5	1.39	32.0	0.67
Global	108.3	2.74	32.8	2.75
Tabla de 1965	108	-	34	-

Al comparar el global de los resultados obtenidos sobre el contenido de fósforo en el brócoli y la acelga con lo reportado en la Tabla de Composición de Alimentos Ecuatorianos de 1965 (detallada en el Anexo 1), se aprecia a primera instancia que guardan cierta similitud, debido a que la diferencia es menor a un gramo y medio. Sin embargo, si se consideran los valores por separado (lotes independientes), se encuentran mayores variaciones con respecto a los del año 1965, tal como se estimaba que ocurriría en este trabajo, debido a que las condiciones y técnicas agrícolas han ido cambiando desde aquel entonces [41], así como también el mejoramiento de métodos y equipos para la determinación de los nutrientes en los alimentos. Para establecer si en efecto, los resultados

obtenidos presentan o no diferencias significativas con los de la Tabla del año 1965 (anexo 1), se aplicarán pruebas estadísticas en los apartados posteriores.

### 3.3. Determinación de fósforo por vía húmeda

Se probaron diferentes condiciones para la digestión por microondas propias de cada ensayo, tal como se detalla en la sección 2.3.4; en total se efectuaron 72 análisis. En las Tablas 3.4 y 3.5 se muestran los promedios de los resultados obtenidos, los cuales indican valores inferiores a los mostrados anteriormente para las mismas muestras tratadas con digestión por vía seca.

**Tabla 3.4. Concentración de fósforo (mg/100 g) empleando digestión húmeda asistida por microondas con ácido nítrico.**

Ensayo	Brócoli		Acelga	
	$\bar{x}$	% CV	$\bar{x}$	% CV
1	-1.170	-187.0	-0.559	-28.30
2	-1.616	-87.05	-0.559	-21.39
3	-2.143	-53.19	-0.366	-55.49

En la Tabla 3.4 se muestran resultados negativos, debido a que los valores de absorbancia fueron igualmente negativos. Todas las soluciones obtenidas carecían de color, es decir que no se consiguió la formación del complejo azul al digerir las soluciones con ácido nítrico. En virtud de ello, se decidió probar cambiando el reactivo disgregante de 100% ácido nítrico a una mezcla 1:4 de ácidos nítrico y clorhídrico, respectivamente, con lo cual se obtuvieron los resultados de la Tabla 3.5.

**Tabla 3.5. Concentración de fósforo (mg/ 100 g) empleando digestión húmeda asistida por microondas con una mezcla de ácidos nítrico y clorhídrico.**

Ensayo	Brócoli		Acelga	
	$\bar{x}$	% CV	$\bar{x}$	% CV
1	41.96	5.36	11.81	7.79
2	36.39	3.24	12.66	6.61
3	48.03	8.65	24.12	11.42

El mayor contenido de fósforo se obtuvo con las condiciones del tercer ensayo (220 °C, 90 min) para ambas hortalizas, con un valor cercano a los 48 mg/100 g para el brócoli y 24 mg/100 g en base húmeda para la acelga. Si se toman como valores verdaderos los obtenidos con el método estandarizado (digestión vía seca), se observa que el porcentaje de analito logrado es menor al 40 % en los dos primeros ensayos y apenas del 44 y 72 % para brócoli y acelga respectivamente en el tercer ensayo, lo cual, si bien es una mejora respecto a los resultados obtenidos mediante la digestión asistida por microondas con ácido nítrico (ver Tabla 3.4), no llega a ser satisfactorio. Por otra parte, la Tabla 3.5 también mostró que, entre los tres ensayos de digestión, el tercero presentó los mayores coeficientes de variación, llegando incluso a sobrepasar el 10 % en el caso de la acelga, por lo que, a pesar de que se obtiene un mayor contenido de fósforo con la mezcla 1:4 de ácidos nítrico y clorhídrico, la precisión del ensayo no es la óptima.

Al efectuar los ensayos con la digestión vía húmeda se notó que las soluciones desarrollaban color mientras se encontraban en el baño térmico, pero al removerlas de éste transcurridos los 15 minutos como indica el método, el color desaparecía o cambiaba. En función de ello, se decidió verificar el comportamiento del complejo coloreado de azul de molibdeno a diferentes tiempos de reacción dentro del baño térmico, cuyos resultados se

detallan en las Tablas 3.6 y 3.7. Cabe señalar que todos los ensayos se llevaron a cabo en el mismo instrumento, el cual contaba con control automático de temperatura, por lo que se descartó que la variabilidad en el desarrollo de color se deba a errores en el suministro de temperatura durante la lectura de absorbancia.

**Tabla 3.6. Variación de la concentración de fósforo en brócoli (mg/ 100 g) en función del tiempo de reacción en baño térmico.**

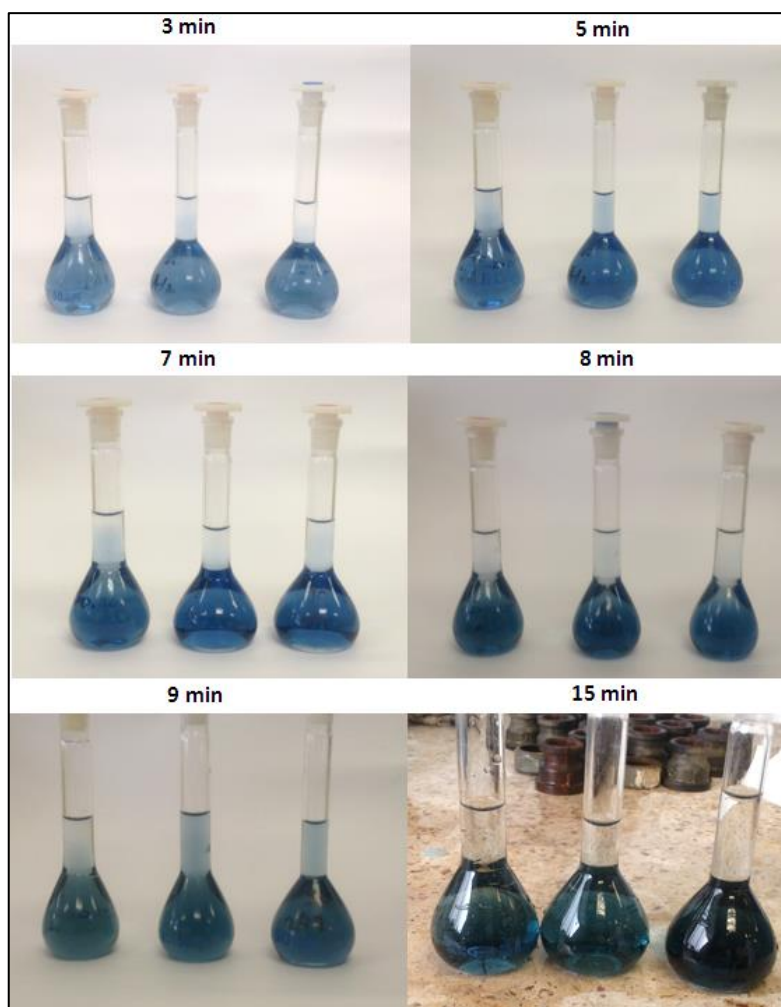
Ensayo	$(\bar{x} \pm s)$	Tiempo					
		3 min	5 min	7 min	8 min	9min	15 min
1	$\bar{x}$	50.45	61.06	66.09	80.11	40.81	41.96
	s	2.53	0.30	1.35	3.84	6.73	2.24
2	$\bar{x}$	56.14	60.40	65.56	80.19	71.69	36.39
	s	2.36	3.79	3.71	3.78	0.95	1.18
3	$\bar{x}$	46.49	60.04	68.17	81.19	75.39	48.03
	s	1.20	3.63	2.98	1.46	2.74	4.16

**Tabla 3.7. Variación de la concentración de fósforo en acelga (mg/ 100 g) en función del tiempo de reacción en baño térmico.**

Ensayo	$(\bar{x} \pm s)$	Tiempo en baño térmico					
		3 min	5 min	7 min	8 min	9min	15 min
1	$\bar{x}$	15.45	22.25	23.91	17.95	18.15	11.81
	s	0.49	0.21	0.24	0.25	0.14	0.92
2	$\bar{x}$	15.70	22.85	26.60	20.01	19.24	12.66
	s	0.14	1.34	0.14	0.13	1.91	0.84
3	$\bar{x}$	17.65	25.55	27.50	21.15	15.72	24.12
	s	0.49	1.34	0.42	1.63	4.93	2.75

Como se puede observar en las Tablas 3.6 y 3.7, con las tres condiciones de digestión ensayadas, los valores de la concentración de fósforo continuaron aumentando de manera proporcional al tiempo en el baño hasta el minuto 8 para el brócoli y hasta el minuto 7 para la acelga, en donde alcanzaron un máximo, luego empezaron a decrecer de manera precipitada hasta obtener valores cercanos o incluso menores a los valores del minuto 3.

Al considerar lo ocurrido con las muestras digeridas únicamente con ácido nítrico y las muestras digeridas con una mezcla 1:4 de ácidos nítrico y clorhídrico, respectivamente, se presume que el ácido nítrico es el reactivo que interfiere en la correcta formación del complejo de azul de molibdeno, ocasionando la inestabilidad del mismo conforme transcurre el tiempo. En la Figura 3.1 se puede apreciar como la coloración de las soluciones, obtenidas por digestión asistida por microondas con la mezcla de ácidos, va cambiando. Ya que en primera instancia presentó una coloración azul, propia del complejo azul de molibdeno, durante los primeros siete minutos; sin embargo, a partir de este minuto, el color azul empezó a tornarse más oscuro hasta llegar a un color verde azulado oscuro en el minuto quince.



**Figura 3.1. Variación de la coloración de la solución en función del tiempo en el baño térmico en la determinación de fósforo de la acelga**

Cabe mencionar que se midió el pH en cada una de las soluciones de las muestras digeridas por vía seca y vía húmeda asistida por microondas antes y después del procedimiento de desarrollo de color, notándose que el pH se encontraba entre 2.5 y 2.7 respectivamente, por lo cual, la discrepancia de los resultados obtenidos en cuanto a la concentración de fósforo no es atribuible al pH. Es posible que, un factor que pudo haber influenciado sobre la ligera variación en el minuto donde se consiguió obtener la concentración más alta de fósforo, para brócoli y para acelga, sea el tiempo que transcurre desde que entra en contacto la solución de ácido ascórbico - molibdato con la muestra.

Se ensayó también la posibilidad de una digestión húmeda por microondas empleando únicamente ácido clorhídrico como reactivo disgregante; sin embargo, la muestra no logró ser digerida completamente con ninguno de los ensayos y de las condiciones de tiempo y temperatura propuestos en este trabajo, quedando como remanente aproximadamente la mitad de la misma, y donde la solución obtenida presentaba un color rojo ladrillo (ver Figura 3.2), lo cual impidió la medición del fósforo.



**Figura 3.2. Digestión húmeda asistida por microondas empleando ácido clorhídrico.**

Izquierda: Remanentes de muestra después de la digestión. Centro: Soluciones antes del desarrollo de color. Derecha: Soluciones después del desarrollo de color.

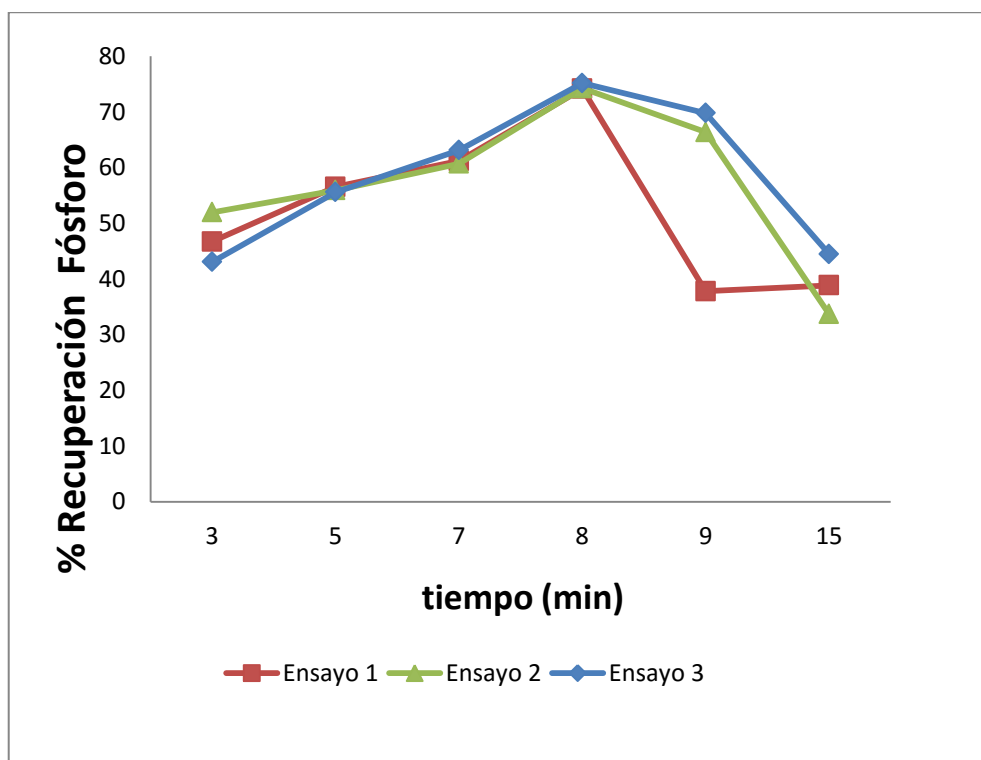
La diferencia de color que presentaron las muestras digeridas por ambos métodos, un color amarillento en las soluciones obtenidas mediante la digestión asistida por microondas, mientras que incoloras al emplear la digestión vía seca, derivaron en la discrepancia del desarrollo de color azul que se midió a  $823 \pm 1$  nm en el espectrofotómetro Ultravioleta - Visible. Por lo cual, se comparó lo presentado en este trabajo con un estudio efectuado en el tejido foliar de caña, en el cual también se empleó la digestión asistida por microondas, pero con la metodología de Olsen modificado (solución ácida de molibdato de amonio

combinado con tartrato doble de potasio y antimonio y ácido sulfúrico concentrado) para la determinación de fósforo. En este estudio se puede apreciar que de igual forma se produjeron diferencias entre los resultados obtenidos mediante la digestión asistida por microondas con respecto a los obtenidos con la digestión por vía seca, en cerca de la mitad de los resultados cuando se cuantifica colorimétricamente, mientras que, al utilizar otro método de detección como la Fluorescencia de rayos - X de reflexión total ( TXRF, por sus siglas en inglés *Total Reflection X- ray Fluorescence*), los resultados variaron en un 30 % respecto a las muestras digeridas con los diferentes métodos empleados, se consiguen valores superiores de contenido de fósforo en comparación a los obtenidos por cuantificación colorimétrica [42]. Sin embargo, si se tiene en cuenta que las soluciones digeridas por microondas presentan una coloración amarilla, es posible que al utilizar otro método colorimétrico como el del ácido vanadomolibdatofosfórico, en donde se forma un complejo estable de color amarillo, el cual se lee en la región de 420 - 480 nm, se obtengan resultados satisfactorios, ya que con este método el desarrollo de color no se ve afectado marcadamente por la presencia de ácidos como: clorhídrico, sulfúrico, acético o nítrico [22]. De tal manera, que al examinar los resultados presentados en un estudio realizado sobre el contenido de fósforo en tejido de pescado por Espectrofotometría Ultravioleta - Visible usando el método de vanadomolibdato mencionado anteriormente, se apreciaron similitudes en la determinación de fósforo con ambos métodos de digestión, logrando recuperaciones cercanas al 90 % empleando ácido nítrico en la digestión en horno de microondas [43].

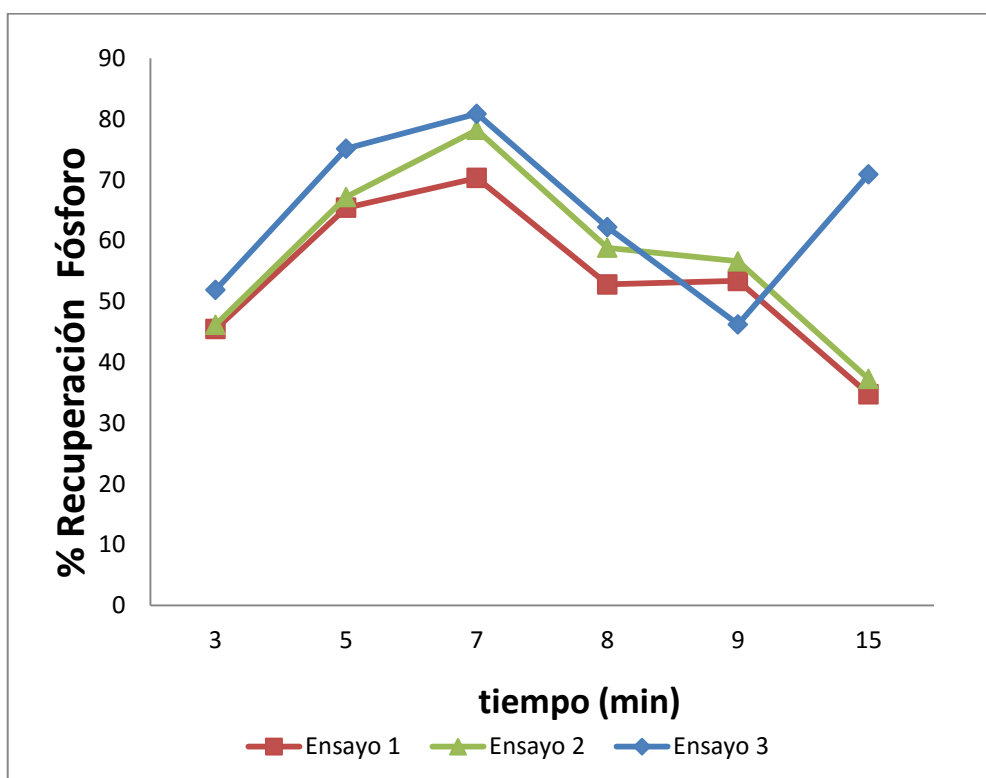
Con lo mostrado, se hace evidente, que el desarrollo del color azul perteneciente al cromóforo "azul de molibdeno", está sujeto a restricciones al emplear la digestión asistida por microondas, como por ejemplo: el color de las soluciones de las muestras digeridas y la inestabilidad del cromóforo ocasionada por el ácido nítrico.

Para determinar el porcentaje de recuperación que se alcanzó al emplear la digestión húmeda asistida por microondas con una mezcla de ácidos nítrico y clorhídrico, se tomó como base los resultados expuestos en las Tablas 3.6 y 3.7, y se procedió a la elaboración de una gráfica en función de porcentaje de recuperación y tiempo de reacción para cada hortaliza estudiada.

Como se muestra en las Figuras 3.3 y 3.4, los mayores porcentajes de recuperación alcanzados tanto para el brócoli como para la acelga fueron al emplear las condiciones del tercer ensayo (220 °C, 90 min), logrando un 75 % en el primer caso y un 81 % para el segundo caso respectivamente (ver Figuras 3.3 y 3.4); mientras que, los menores porcentajes de recuperación conseguidos fueron al usar las condiciones del primer ensayo (180 °C, 30 min), teniendo valores de 74 % para el brócoli y 70 % para la acelga.



**Figura 3.3. Porcentaje de recuperación de fósforo en el brócoli en función del tiempo de reacción en el baño térmico.**



**Figura 3.4. Porcentaje de recuperación de fósforo en la acelga en función del tiempo de reacción en el baño térmico.**

La recuperación de fósforo tuvo un resultado medianamente satisfactorio al haber alcanzado porcentajes superiores al 70 % en todos los casos, tanto con concentraciones relativamente bajas de fósforo (34 mg/100 g) como es el caso de la acelga, y con concentraciones relativamente altas de fósforo (108 mg/100 g) como es el caso del brócoli, todo esto dentro de lo que concierne a hortalizas.

Sin embargo, fue necesario evaluar si la diferencia de resultados entre ambos métodos ejecutados fue o no significativa, lo cual se realizó con pruebas estadísticas, tal como se describe en el siguiente apartado.

### 3.4. Tratamiento estadístico de resultados

Este trabajo tuvo dos partes, la primera parte fue la comparación de los parámetros analizados (humedad, ceniza, fósforo) con los reportados en la Tabla de Composición de Alimentos Ecuatorianos de 1965 para cada hortaliza estudiada; estos últimos se muestran en la Tabla 3.8. Mientras que, la segunda parte se basó en la comparación de los valores obtenidos con el método estandarizado (digestión vía seca) con los obtenidos mediante la digestión húmeda asistida por microondas.

**Tabla 3.8. Datos de la Tabla de Composición de Alimentos Ecuatorianos para cada hortaliza estudiada [15].**

<b>Alimento</b>	<b>Humedad (%)</b>	<b>Cenizas (%)</b>	<b>Fósforo (mg/100g)</b>
Acelga cruda (hojas)	91.4	1.3	34
Brócoli	85.5	1.1	108

Para efectuar la prueba  $t$  de Student se tomó el promedio total de cada parámetro analizado para cada una de las dos variedades de hortalizas estudiadas. Además, se empleó como  $t$  teórico 2.5706 para un tamaño de muestra de seis con cinco grados de libertad y un nivel de confianza del 95 % presentado en la tabla  $t$  de Student (anexo 2). Los resultados obtenidos se exhiben a continuación en las Tablas 3.9 y 3.10.

**Tabla 3.9. Comparación de medias e intervalos de confianza obtenidos para humedad, cenizas y fósforo por digestión vía seca en brócoli.**

Parámetro	t exp	t teo	Resultado		Intervalo de Confianza
<b>Humedad</b>	6.073	2.570	t exp > t teo	H <sub>0</sub> rechazada	86.18 - 87.19
<b>Cenizas</b>	0.034		t exp < t teo	H <sub>0</sub> aceptada	1.038 - 1.164
<b>Fósforo</b>	0.251		t exp < t teo	H <sub>0</sub> aceptada	105.2 - 111.4

**Tabla 3.10. Comparación de medias e intervalos de confianza obtenidos para humedad, cenizas y fósforo por digestión vía seca en acelga.**

Parámetro	t exp	t teo	Resultado		Intervalo de Confianza
<b>Humedad</b>	1.970	2.570	t exp > t teo	H <sub>0</sub> rechazada	89.22 - 91.69
<b>Cenizas</b>	0.295		t exp < t teo	H <sub>0</sub> aceptada	1.258 - 1.333
<b>Fósforo</b>	3.121		t exp < t teo	H <sub>0</sub> aceptada	31.90 - 33.80

Con el análisis de la prueba *t* de Student se determinó que los resultados obtenidos tanto para las cenizas como para el fósforo, en el brócoli, se encuentran dentro de los intervalos de confianza, por lo que no presentan diferencias significativas con respecto a los valores expuestos en la Tabla de Composición de Alimentos de 1965 [15]; sin embargo, en el caso de la humedad, se obtuvo una diferencia significativa al estar fuera del intervalo de confianza, así como también al presentar una *t* exp mayor a la *t* teo, como se aprecia en la Tabla 3.9. En el caso de la acelga, los parámetros de humedad y cenizas se encuentran dentro de los intervalos de confianza, por lo cual no existe ninguna diferencia significativa; sin embargo, ocurre lo contrario en el caso del fósforo; ya que a pesar de haber obtenido en este trabajo una concentración de 32.85 mg/100 g que se asemeja a la reportada en la

Tabla del año 1965, 34 mg/100 g, la prueba indica la existencia de una diferencia significativa. Por lo cual, se establece que parte de los datos reportados en la Tabla de Composición de Alimentos ecuatorianos de 1965 no presentan discrepancias con los obtenidos en este trabajo, salvo los casos de humedad en el brócoli y del fósforo en la acelga.

Adicionalmente, se realizó la prueba de  $t$  de Student para comparar los resultados, de fósforo en brócoli y acelga, obtenidos por el método estandarizado propuesto por la AOAC, con los de digestión húmeda asistida por microondas; en este caso, se emplearon únicamente los valores de fósforo que indicaron el mayor porcentaje de recuperación. Como se conoce la media, la desviación estándar y el número de repeticiones realizadas en cada método utilizado, se calcula el valor de  $t$  con las ecuaciones 3.1 y 3.2:

$$t = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}} \quad (3.1)$$

$$g.l. = \frac{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}{\frac{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}{\frac{n_1}{n_1+1} + \frac{n_2}{n_2+1}}} - 2 \quad (3.2)$$

Donde:

$\bar{x}_1$  = media del primer método

$\bar{x}_2$  = media del segundo método

S1 = desviación estándar del primer método

S2 = desviación estándar del segundo método

n1 = tamaño de muestra del primer método

n2 = tamaño de muestra del segundo método

**Tabla 3.11. Comparación de medias de la concentración de fósforo en hortalizas obtenida mediante digestión vía seca y vía húmeda por microondas.**

<b>Hortaliza</b>	<b>Método 1 (mg P/100 g)</b>	<b>Método 2 (mg P/100 g)</b>	<b>t exp</b>	<b>t teo</b>	<b>Resultado</b>
<b>Brócoli</b>	108.3	81.2	17.285	2.306	H <sub>0</sub> rechazada
<b>Acelga</b>	32.8	27.5	40.798	2.019	H <sub>0</sub> rechazada

Método 1: digestión vía seca

Método 2: digestión húmeda asistida por microondas (HNO<sub>3</sub>-HCl, 220°C, 90 min)

En la Tabla 3.11 se muestra como la hipótesis nula es rechazada para ambas hortalizas ya que, la  $t_{exp}$  es mayor que la  $t_{teo}$ , lo cual hace alusión a la existencia de diferencias significativas entre ambos métodos. A pesar de utilizar los mejores valores de recuperación alcanzados con la digestión húmeda asistida por microondas, existe una discrepancia con los obtenidos al emplear el método estandarizado de digestión vía seca propuesto por la AOAC, por lo cual, se establece que la digestión húmeda asistida por microondas no puede reemplazar a la digestión vía seca.

A continuación se realizó el ANOVA entre lotes de una misma variedad de hortalizas, y para ello se tomó como F teórico 7.709, que corresponde al valor obtenido con un grado de libertad en el numerador, y cuatro grados de libertad en el denominador y con una confianza de 95 %, según se indica en el anexo 2.

**Tabla 3.12. Análisis de varianza de los parámetros estudiados en el brócoli.**

Variación	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F exp	Resultado	
<b>Humedad</b>					
<b>Entre</b>	0.255	0.255	1.146	F exp < F teo	H <sub>0</sub> aceptada
<b>Dentro</b>	0.889	0.222			
<b>Total</b>	1.144	0.477			
<b>Cenizas</b>					
<b>Entre</b>	0.006	0.006	1.788	F exp < F teo	H <sub>0</sub> aceptada
<b>Dentro</b>	0.012	0.003			
<b>Total</b>	0.018	0.009			
<b>Fósforo (vía seca)</b>					
<b>Entre</b>	29.719	29.719	8.218	F exp > F teo	H <sub>0</sub> rechazada
<b>Dentro</b>	14.465	3.616			
<b>Total</b>	44.184	33.336			

**Tabla 3.13. Análisis de varianza de los parámetros estudiados en la acelga.**

Variación	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F exp	Resultado	
<b>Humedad</b>					
<b>Entre</b>	1.703	1.703	1.312	F exp < F teo	H <sub>0</sub> aceptada
<b>Dentro</b>	5.194	1.298			
<b>Total</b>	6.897	3.002			
<b>Cenizas</b>					
<b>Entre</b>	0.002	0.002	1.721	F exp < F teo	H <sub>0</sub> aceptada
<b>Dentro</b>	0.005	0.001			
<b>Total</b>	0.006	0.003			
<b>Fósforo (vía seca)</b>					
<b>Entre</b>	3.953	3.953	114.82	F exp > F teo	H <sub>0</sub> rechazada
<b>Dentro</b>	0.138	0.034			
<b>Total</b>	4.091	3.987			

Como se aprecia en las Tablas 3.12 y 3.13 para los parámetros de humedad y cenizas, la hipótesis nula es aceptada en ambas hortalizas, es decir, todas las medias de los grupos provienen de una misma población. Sin embargo, con el parámetro del fósforo, tanto para el brócoli como para la acelga, se presentan diferencias significativas entre sus medias,

esto debido a que la F experimental es superior a la F teórica. Esto radica en que existe una diferencia relativamente pequeña entre los valores de fósforo para cada lote (grupo), pero no lo suficiente como para ser consideradas pertenecientes a una misma población. Estos resultados pueden deberse a factores como: las diferentes condiciones de cuidado en los cultivos empleadas, el sector de donde fueron tomadas las muestras, por citar algunos.

También se estableció si existen diferencias significativas entre los tres ensayos propuestos para la digestión húmeda asistida por microondas con la mezcla de ácidos nítrico y clorhídrico, en base a los ensayos realizados de acuerdo al tiempo de reacción en el baño térmico donde se consiguió el mayor porcentaje de recuperación de fósforo (minutos 8 y 7 para el brócoli y la acelga respectivamente). Para ello se empleó un F teórico de 9.552 (grados de libertad 2 y 3) con una confianza de 95 %, tomado de la tabla F mostrada en el anexo 2.

**Tabla 3.14. Análisis de varianza de los ensayos de digestión húmeda asistida por microondas.**

Variación	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F exp	Resultado	
<b>Brócoli</b>					
<b>Entre</b>	1.480	0.740	0.071	F <sub>exp</sub> < F <sub>teo</sub>	H <sub>0</sub> aceptada
<b>Dentro</b>	31.159	10.387			
<b>Total</b>	32.639	11.127			
<b>Acelga</b>					
<b>Entre</b>	14.040	7.020	75.24	F <sub>exp</sub> > F <sub>teo</sub>	H <sub>0</sub> rechazada
<b>Dentro</b>	0.280	0.093			
<b>Total</b>	14.320	7.113			

En la Tabla 3.14 se aprecia la existencia de diferencias significativas en el caso de la acelga, lo cual sugiere la presencia de una o más medias que difieren entre sí, lo cual se

determinará con la prueba de Tukey; por su parte, las medias obtenidas en cada nivel, para el brócoli, no muestran diferencias significativas. Estos resultados pueden ser un indicativo de que los porcentajes de recuperación de fósforo son similares si empleamos cualesquiera de los ensayos de digestión propuestos en este trabajo al trabajar con concentraciones relativamente altas, como el brócoli (108 mg/100 g), pero si las muestras presentan concentraciones relativamente bajas, como la acelga (34 mg/100 g), los porcentajes de recuperación variarán dependiendo de las condiciones empleadas durante la digestión por microondas.

La prueba de Tukey se aplicó una vez realizado el análisis de varianza (ANOVA), en los casos donde la hipótesis nula fue rechazada. Mediante esta prueba se puede establecer de mejor manera cuales son las medias que difieren al compararlas entre sí. Los resultados de la Tabla 3.15, muestran que las condiciones del primer ensayo llevan a valores de fósforo que son significativamente diferentes de los obtenidos bajo las condiciones de los ensayos 2 y 3.

**Tabla 3.15. Prueba de Tukey para los ensayos de digestión húmeda asistida por microondas en acelga.**

<b>Alimento</b>	<b>Comparación</b>	<b>Diferencia</b>	<b>HSD</b>	<b>Resultado</b>
Acelga	1 con 2	2.661	1.041	H <sub>0</sub> rechazada
	1 con 3	3.546		H <sub>0</sub> rechazada
	2 con 3	0.884		H <sub>0</sub> aceptada

## CAPÍTULO 4

### 4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 4.1. Conclusiones

- De acuerdo a los resultados obtenidos, se determinó que el método de digestión húmeda asistida por microondas no es viable para la determinación de fósforo por desarrollo colorimétrico de azul de molibdeno, ya que reporta valores mucho menores a los conseguidos mediante el método estandarizado de digestión por vía seca, obteniendo en el mejor de los casos una concentración que representa alrededor del 81 % del valor considerado como verdadero (obtenido mediante digestión vía seca).
- Los resultados obtenidos mediante la digestión por vía seca, muestran que entre las dos hortalizas estudiadas, el brócoli es el que posee un mayor contenido de fósforo con 108 mg/100 g, frente al contenido de acelga de 33 mg/100 g de alimento.
- Los valores conseguidos al emplear la digestión por microondas apuntan a que el ácido nítrico interfiere con la adecuada formación del cromóforo "azul de molibdeno", debido a que al usar únicamente este ácido como reactivo disgregante, no se produce el desarrollo de color azul en la mayoría de los casos y, en los pocos que se produce, este desaparece al poco tiempo. Por otra parte, al utilizar la mezcla de los ácidos nítrico y clorhídrico en proporción 1:4, se genera el color azul, pero no con la misma intensidad y constancia, ya que al final del tiempo de reacción (quince minutos) se torna en verde

azulado, lo cual no ocurre en la digestión vía seca, en donde se emplea únicamente el ácido clorhídrico.

- La digestión asistida por microondas empleando solamente ácido clorhídrico no se considera exitosa con ninguna de las condiciones de tiempo y temperatura ensayadas en este trabajo, debido a que la muestra no pudo ser digerida completamente, quedando cerca de la mitad del sólido remanente en el tubo digestor.
- Al utilizar la digestión asistida por microondas con la mezcla de ácidos nítrico y clorhídrico, se observa una variación de la concentración con relación al tiempo de reacción dentro del baño térmico. Se obtuvo como valor máximo 81 mg/100 g en el minuto 8 para el brócoli y 28 mg/100 g al minuto 7 para la acelga, los cuales representan el 75 y 81% de recuperación respectivamente.
- Los resultados obtenidos entre los métodos de digestión por vía seca y vía húmeda asistida por microondas difieren significativamente; así mismo, las diferentes condiciones empleadas para la digestión asistida por microondas proporcionan resultados que difieren significativamente entre sí.
- Gran parte de los datos reportados en la Tabla de Composición de Alimentos Ecuatorianos del año 1965 no presentan diferencias significativas con los presentados en este trabajo, las excepciones son el contenido de humedad del brócoli y el de fósforo en la acelga.

## 4.2. Recomendaciones

- La utilización de crisoles de cuarzo en lugar de los de porcelana para la calcinación de muestras en el método de digestión de vía seca es clave, ya que evita contaminaciones con componentes propios de la porcelana.
- La temperatura del baño térmico debe mantenerse constante en todas las determinaciones; por lo cual, se sugiere un baño térmico con control de temperatura, y ajustarlo a  $95 \pm 2$  °C.
- Debe efectuarse un estudio que contemple un muestreo a lo largo de un mayor tiempo, así como también, la toma de más muestras procedentes de diferentes lugares con el fin de determinar si existen diferencias significativas entre el contenido de fósforo obtenido en este trabajo con el reportado por la Tabla del año 1965.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] Skoog, D, West, D., Holler, F. & Crouch, S., (2015), *Fundamentos de Química Analítica*, (9a.ed.), México D.F., México: Cengage Learning Editores S.A.
- [2] Shirin, K., Naseem, S., Bashir, E., Imad, S. & Shafiq, S., (2008), A comparison of digestion methods for the estimation of elements in *Dodonaea Viscosa*: a native flora of Wadh, Balochistan, Pakistan. *J. Chem. Soc. Pak*, 1 (30), 90-94.
- [3] Rodríguez, C. (2013), Estudio de la técnica de Extracción Asistida por Microondas (MAE) para su aplicación en la determinación de Hidrocarburos Totales de Petróleo (TPH's) en suelos (Disertación de Licenciatura en Química), Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito.
- [4] Silva, P. (2012), Digestión en horno de microondas para determinación de contenido de hierro y zinc totales en alimentos. *Tecnología en Marcha*, 3 (25), 96-100.
- [5] Pinzón, G. (2015), Determinación de los niveles de plomo y cadmio en leche procesada en la ciudad de Bogotá D.C. (Tesis de Maestría), Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- [6] Hernández, M. & Sastre, G., (1999), *Tratado de Nutrición*, Madrid, España: Ediciones Díaz Santos.
- [7] Ayuntamiento de Valencia, (2010), Los Micronutrientes: Los Minerales. Los Macronutrientes: El Agua, *Guía de Nutrición y Alimentación Saludable*, 1 (5), 16-17.

[8] Food and Agriculture Organization, (2011), Producción de hortalizas, Recuperado de: <http://www.fao.org/3/a-as972s.pdf>.

[9] Rozano, V., Quiróz, C., Acosta, J., Pimentel, L. & Quiñones, E., (2005), Hortalizas, las llaves de la energía, *Revista Digital Universitaria*, 9 (6), 2-10.

[10] Food and Agriculture Organization, (1999). Definiciones para los fines del Codex Alimentarius, Recuperado de: <http://www.fao.org/docrep/w5975s/w5975s08.htm>.

[11] Zimmerman, M. & Snow, B., (2012), Essentials of Nutrition: A Functional Approach, Recuperado de: <http://2012books.lardbucket.org/pdfs/an-introduction-to-nutrition.pdf>.

[12] Universidad Nacional de Educación a Distancia (UNED-España), (2016), Guía de Alimentación y Salud, Recuperado de: [http://www2.uned.es/pea-nutricion-y-dietetica-I/guia/guia\\_nutricion/compo\\_minerales.htm](http://www2.uned.es/pea-nutricion-y-dietetica-I/guia/guia_nutricion/compo_minerales.htm).

[13] Institute of Medicine, (1997), Dietary Reference Intakes For Calcium, Phosphorus, Magnesium, Vitamin D, and Fluoride, Recuperado de: <http://iom.nationalacademies.org/Activities/Nutrition/SummaryDRIs/~//media/Files/Activity%20Files/Nutrition/DRIs/New%20Material/5DRI%20Values%20SummaryTables%2014.pdf>.

[14] Willett, W. & Skerrett, P., (2005), Eat, Drink and Be Healthy, Recuperado de: <https://cdn1.sph.harvard.edu/wp-content/uploads/sites/30/2012/09/Healthy-Eating-Pyramid-handout.pdf>.

- [15] Instituto Nacional de Nutrición, (1965), Tabla de Composición de los Alimentos Ecuatorianos, Quito-Ecuador, 11-13.
- [16] Código Alimentario Español, (1967), Alimentos, productos y útiles alimentarios, Recuperado de: <https://www.boe.es/datos/pdfs/BOE/1967/248/R14180-14448.pdf>.
- [17] Zudaire, M. & Yold, G., (2004), Hortalizas, *Guía Práctica Consumer: Hortalizas y Verduras*, Elorrio, España: Fundación Grupo Eroski para el Consumidor.
- [18] Willett, W. y Skerrett, P., (2005), Eat, Drink and Be Healthy, Recuperado de: <https://cdn1.sph.harvard.edu/wp-content/uploads/sites/30/2012/09/Healthy-Eating-Pyramid-handout.pdf>.
- [16] Soengas, P., Sotelo, T, Velasco, P. & Cartea, M., (2011), Antioxidant properties of Brassica vegetables, *Functional Plant Science and Biotechnology*, 2 ( 5), 44-46.
- [20] Fundación Argentina de Nutrición, (2009), Beneficios de las verduras de hoja verde, Recuperado de: <http://www.fanutricion.org.ar/shop/detallenot.asp?notid=12>.
- [21] Gómez, M. & Namesny, A., (2008), *Guía de las mejores frutas y hortalizas*, Tarragona, España: Ediciones de Horticultura, S.L.
- [22] Masson, L., (1994), Análisis proximal de calcio y fosforo en harinas de pescado, Recuperado de: <http://www.fao.org/docrep/field/003/ab482s/ab482s02.htm>.

[23] Jastrzebska, A., Brudja, B., Szymanski, T. & Szyk, E., (2003), Determination of phosphorus in food samples by X-ray fluorescence spectrometry and standard spectrophotometric method, *Food Chemistry*, (83), 463-467.

[24] Cámara, C. & Pérez-Conde, C., (2012), *Análisis químico de trazas*, Madrid, España: Editorial Síntesis.

[25] Lachica, M., (1997), Métodos de digestión de material vegetal. Aplicación del horno de microondas, *Información Tecnológica*, 4 (8), 367-368.

[26] California Environmental Protection Agency, (2000), Microwave-Accelerated Reaction System, Model MARS-X, for the Extraction of Organic Pollutants from Solid Matrices, CEM Corporation, United States, Recuperado de: <http://www.p2pays.org/ref/14/13364.pdf>.

[27] García, V., Galindo, H., Torres, T. & Rondón, E., (2001), La molécula de agua y el efecto microondas, Memorias del II Encuentro con la Física, Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela.

[28] Jara, J., (2013), Cómo calienta la comida el microondas [Figura], Recuperado de: <http://www.hablandodeciencia.com/articulos/2013/06/21/como-calienta-la-comida-el-microondas/>.

[29] Communications & Power Industries, (2007), Magnetron Theory of Operation, Recuperado de: <http://www.cpii.com/docs/related/2/Mag%20tech%20art.pdf>.

[30] Figueroa, F., (2011), El Magnetron y el horno de microondas [Figura], Recuperado de: <https://www.fayerwayer.com/2011/05/el-magnetron-y-el-horno-microondas-viva-el-ingenio/>.

[31] CEM, (2014), MARS 6 Sistema de reacción por microondas: Soluciones Simplificadas, Recuperado de: [http://www.amco-instruments.com/pdf2/516\\_Broch\\_MARS6\\_B098-Spanish.pdf](http://www.amco-instruments.com/pdf2/516_Broch_MARS6_B098-Spanish.pdf).

[32] Sosa, I. & López, J., (2004), Espectrofotometría de absorción, Recuperado de: [http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/espectrometria\\_de\\_absorcion.pdf](http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/espectrometria_de_absorcion.pdf).

[33] Skoog D., Holler F. & Nieman T., (2001). *Principios de Análisis Instrumental*, (5a.ed.), Madrid, España: Edigrafos.S.A.

[34] Olsen, E., (1975), *Modern Optical Methods of Analysis*, New York, USA: McGraw Hill Book Company.

[35] Owen, T., (2000). Fundamentos de la espectroscopia UV-visible moderna, Recuperado de: <http://www.agilent.com/cs/library/primers/public/5980-1397ES.pdf>.

[36] Alberto, M., (2013), Espectrofotómetro UV-Visible, Recuperado de: <http://avibert.blogspot.com/2013/11/espectrofotometro-uv-visible-esquema.html>.

[37] Harris, D., (2003), *Quantitative Chemical Analysis*, New York, USA: W. H. Freeman and Company.

- [38] Miller J., (1993), *Estadística para Química Analítica*, Delaware, USA: Addison-Wesley Iberoamericana.
- [39] Zubcoff, J, (2011), Análisis de la varianza de un factor (ANOVA) Test a posteriori, Recuperado de: <http://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/17008/1/ANOVA.PDF>.
- [40] Horwitz, W., (2005), *Official Methods of Analysis of AOAC International*, (18a.ed.), USA.
- [41] Arteaga, M., (2011), Aclimatación de 12 híbridos de brócoli (*Barssica oleracea. L.* Var. Itálica) en el cantón Riobamba provincia de Chimborazo (Tesis de Ingeniería), Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba.
- [42] Mendoza, B., Parra, L., Almas, L. & Rodríguez, V. (2014), Evaluación de dos métodos de digestión ácida en el análisis de tejido de caña (*Saccharum officinarum L.*). *Ciencia y Tecnología*, 2 (7), 9-16.
- [43] Tanner, D, Leonard, E & Brazner, J., (1999), Microwave digestion method for phosphorus determination of fish tissue, *American Society of Limnology and Oceanography*, 44 (3), 708-709.

## **ANEXOS**

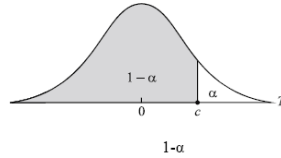
**ANEXO 1: TABLA DE COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LAS HORTALIZAS  
ECUATORIANAS DE 1965 [15].**

<b>Alimento</b>	<b>Humedad</b>	<b>Calorías</b>	<b>Carbohidratos Totales</b>	<b>Cenizas</b>	<b>Fósforo</b>
Acelga cruda (hojas)	91.4	26	4.3	1.3	34
Achogcha del país	94.3	16	4.1	0.7	32
Ají rocoto amarillo	90.6	31	7.5	0.5	23
Ají rocoto rojo	91.0	31	7.1	0.5	17
Ajo	67.1	12.1	29.2	0.7	70
Apio (hojas)	87.1	39	6.9	1.9	116
Asnayuyo	79.4	62	6.2	1.8	96
Berenjena	90.6	27	3.8	0.5	96
Berro (hojas)	89.7	30	4.0	1.3	195
Bledo	81.1	56	9.7	2.8	111
Brócoli	85.5	44	6.3	1.1	108
Cebolla blanca	86.9	44	11.1	0.5	44
Cebolla colorada	85.3	54	11.7	0.6	48
Cebolla perla	82.3	66	16.6	0.4	16
Cebolla paiteña	85.7	52	12.6	0.4	29
Col	92.4	25	5.2	0.5	30
Col de brucas	87.9	36	7.3	1.0	75
Col chaucha	92.3	24	4.7	0.6	45
Col verde	91.9	26	6.3	0.5	33
Col morada	90.7	30	7.0	0.5	33
Coliflor	91.5	26	5.1	0.7	59
Culantro	86.7	40	6.6	1.5	83
Calabaza	96.5	16	2.1	0.2	12
Espinaca	93.0	20	3.6	1.2	26
Guacamullo	90.1	31	5.1	1.5	52
Jitomate	93.4	24	5.2	0.4	29
Lechuga	96.6	11	2.2	0.3	23
Lechuga crespa	95.8	14	2.9	0.3	32

Nabo (hojas)	90.1	28	4.1	1.4	55
Paico	85.1	44	7.4	2.1	60
Palmito	91.7	24	2.6	1.0	109
Perejil	80.5	63	13.1	2.1	105
Pimiento	91.9	29	6.3	0.4	27
Rábano blanco	95.6	15	3.1	0.5	19
Rábano rojo	93.5	23	5.2	0.5	37
Remolacha cruda	88.4	41	9.5	0.7	36
Tomate riñón	92.8	27	5.1	0.5	28
Vainita cruda	91.3	33	5.8	0.6	49
Zambo tierno	92.7	27	6.0	0.4	41
Zambo maduro	91.4	31	7.5	0.4	6
Zanahoria amarilla	88.4	42	10.0	0.7	30
Zapallo	90.4	31	8.3	0.8	13

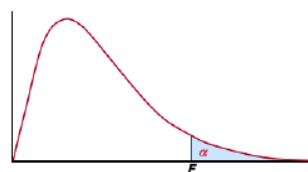
## ANEXO 2: TABLAS ESTADÍSTICAS

### ➤ DISTRIBUCIÓN t DE STUDENT



Grados de libertad	0.25	0.1	0.05	0.025	0.01	0.005
1	1.0000	3.0777	6.3137	12.7062	31.8210	63.6559
2	0.8165	1.8856	2.9200	4.3027	6.9645	9.9250
3	0.7649	1.6377	2.3534	3.1824	4.5407	5.8408
4	0.7407	1.5332	2.1318	2.7765	3.7469	4.6041
5	0.7267	1.4759	2.0150	2.5706	3.3649	4.0321
6	0.7176	1.4398	1.9432	2.4469	3.1427	3.7074
7	0.7111	1.4149	1.8946	2.3646	2.9979	3.4995
8	0.7064	1.3968	1.8595	2.3060	2.8965	3.3554
9	0.7027	1.3830	1.8331	2.2622	2.8214	3.2498
10	0.6998	1.3722	1.8125	2.2281	2.7638	3.1693
11	0.6974	1.3634	1.7959	2.2010	2.7181	3.1058
12	0.6955	1.3562	1.7823	2.1788	2.6810	3.0545
13	0.6938	1.3502	1.7709	2.1604	2.6503	3.0123
14	0.6924	1.3450	1.7613	2.1448	2.6245	2.9768
15	0.6912	1.3406	1.7531	2.1315	2.6025	2.9467
16	0.6901	1.3368	1.7459	2.1199	2.5835	2.9208
17	0.6892	1.3334	1.7396	2.1098	2.5669	2.8982
18	0.6884	1.3304	1.7341	2.1009	2.5524	2.8784
19	0.6876	1.3277	1.7291	2.0930	2.5395	2.8609
20	0.6870	1.3253	1.7247	2.0860	2.5280	2.8453
21	0.6864	1.3232	1.7207	2.0796	2.5176	2.8314
22	0.6858	1.3212	1.7171	2.0739	2.5083	2.8188
23	0.6853	1.3195	1.7139	2.0687	2.4999	2.8073
24	0.6848	1.3178	1.7109	2.0639	2.4922	2.7970
25	0.6844	1.3163	1.7081	2.0595	2.4851	2.7874
26	0.6840	1.3150	1.7056	2.0555	2.4786	2.7787
27	0.6837	1.3137	1.7033	2.0518	2.4727	2.7707
28	0.6834	1.3125	1.7011	2.0484	2.4671	2.7633
29	0.6830	1.3114	1.6991	2.0452	2.4620	2.7564
30	0.6828	1.3104	1.6973	2.0423	2.4573	2.7500
31	0.6825	1.3095	1.6955	2.0395	2.4528	2.7440
32	0.6822	1.3086	1.6939	2.0369	2.4487	2.7385
33	0.6820	1.3077	1.6924	2.0345	2.4448	2.7333
34	0.6818	1.3070	1.6909	2.0322	2.4411	2.7284
35	0.6816	1.3062	1.6896	2.0301	2.4377	2.7238
36	0.6814	1.3055	1.6883	2.0281	2.4345	2.7195
37	0.6812	1.3049	1.6871	2.0262	2.4314	2.7154
38	0.6810	1.3042	1.6860	2.0244	2.4286	2.7116
39	0.6808	1.3036	1.6849	2.0227	2.4258	2.7079
40	0.6807	1.3031	1.6839	2.0211	2.4233	2.7045
41	0.6805	1.3025	1.6829	2.0195	2.4208	2.7012
42	0.6804	1.3020	1.6820	2.0181	2.4185	2.6981
43	0.6802	1.3016	1.6811	2.0167	2.4163	2.6951
44	0.6801	1.3011	1.6802	2.0154	2.4141	2.6923
45	0.6800	1.3007	1.6794	2.0141	2.4121	2.6896
46	0.6799	1.3002	1.6787	2.0129	2.4102	2.6870
47	0.6797	1.2998	1.6779	2.0117	2.4083	2.6846
48	0.6796	1.2994	1.6772	2.0106	2.4066	2.6822
49	0.6795	1.2991	1.6766	2.0096	2.4049	2.6800

➤ **DISTRIBUCIÓN DE FISHER-SNEDCOR**



*Grados de libertad del numerador*

	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>1</b>	161.45	199.50	215.71	224.58	230.16
<b>2</b>	18.513	19.000	19.164	19.247	19.296
<b>3</b>	10.128	9.552	9.277	9.117	9.013
<b>4</b>	7.709	6.944	6.591	6.388	6.256
<b>5</b>	6.608	5.786	5.409	5.192	5.050
<b>6</b>	5.987	5.143	4.757	4.534	4.387
<b>7</b>	5.591	4.737	4.347	4.120	3.972
<b>8</b>	5.318	4.459	4.066	3.838	3.688
<b>9</b>	5.117	4.256	3.863	3.633	3.482
<b>10</b>	4.965	4.103	3.708	3.478	3.326
<b>11</b>	4.844	3.982	3.587	3.357	3.204
<b>12</b>	4.747	3.885	3.490	3.259	3.106
<b>13</b>	4.667	3.806	3.411	3.179	3.025
<b>14</b>	4.600	3.739	3.344	3.112	2.958
<b>15</b>	4.543	3.682	3.287	3.056	2.901
<b>16</b>	4.494	3.634	3.239	3.007	2.852
<b>17</b>	4.451	3.592	3.197	2.965	2.810
<b>18</b>	4.414	3.555	3.160	2.928	2.773
<b>19</b>	4.381	3.522	3.127	2.895	2.740
<b>20</b>	4.351	3.493	3.098	2.866	2.711
<b>21</b>	4.325	3.467	3.072	2.840	2.685
<b>22</b>	4.301	3.443	3.049	2.817	2.661
<b>23</b>	4.279	3.422	3.028	2.796	2.640
<b>24</b>	4.260	3.403	3.009	2.776	2.621
<b>25</b>	4.242	3.385	2.991	2.759	2.603
<b>26</b>	4.225	3.369	2.975	2.743	2.587
<b>27</b>	4.210	3.354	2.960	2.728	2.572
<b>28</b>	4.196	3.340	2.947	2.714	2.558
<b>29</b>	4.183	3.328	2.934	2.701	2.545
<b>30</b>	4.171	3.316	2.922	2.690	2.534
<b>35</b>	4.121	3.267	2.874	2.641	2.485
<b>40</b>	4.085	3.232	2.839	2.606	2.449
<b>45</b>	4.057	3.204	2.812	2.579	2.422
<b>50</b>	4.034	3.183	2.790	2.557	2.400
<b>60</b>	4.001	3.150	2.758	2.525	2.368
<b>70</b>	3.978	3.128	2.736	2.503	2.346
<b>80</b>	3.960	3.111	2.719	2.486	2.329
<b>90</b>	3.947	3.098	2.706	2.473	2.316
<b>100</b>	3.936	3.087	2.696	2.463	2.305
<b>120</b>	3.920	3.072	2.680	2.447	2.290

*Grados de libertad del denominador*

➤ TABLA DE TUKEY

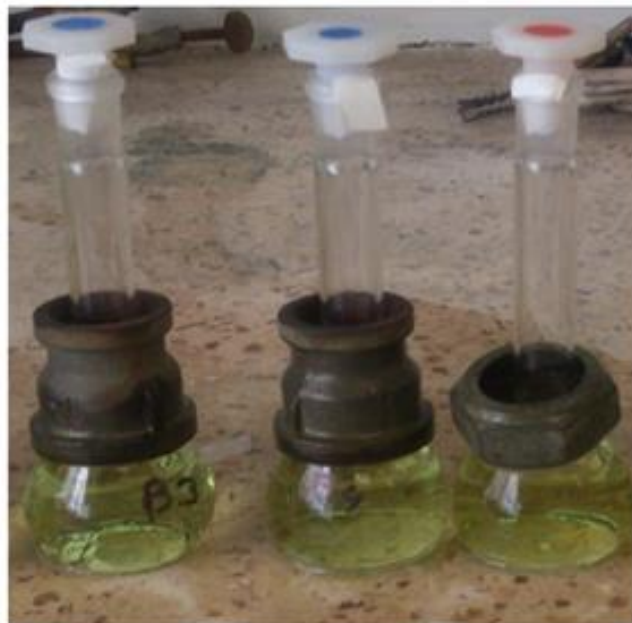
$\alpha = 0.05$	$n$													
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
$m$														
2	6.08	8.33	9.80	10.88	11.73	12.43	13.03	13.54	13.99	14.40	14.76	15.09	15.39	15.67
3	4.50	5.91	6.82	7.50	8.04	8.48	8.85	9.18	9.46	9.72	9.95	10.15	10.35	10.52
4	3.93	5.04	5.76	6.29	6.71	7.05	7.35	7.60	7.83	8.03	8.21	8.37	8.52	8.66
5	3.64	4.60	5.22	5.67	6.03	6.33	6.58	6.80	6.99	7.17	7.32	7.47	7.60	7.72
6	3.46	4.34	4.90	5.30	5.63	5.90	6.12	6.32	6.49	6.65	6.79	6.92	7.03	7.14
7	3.34	4.16	4.68	5.06	5.36	5.61	5.82	6.00	6.16	6.30	6.43	6.55	6.66	6.76
8	3.26	4.04	4.53	4.89	5.17	5.40	5.60	5.77	5.92	6.05	6.18	6.29	6.39	6.48
9	3.20	3.95	4.41	4.76	5.02	5.24	5.43	5.59	5.74	5.87	5.98	6.09	6.19	6.28
10	3.15	3.88	4.33	4.65	4.91	5.12	5.30	5.46	5.60	5.72	5.83	5.93	6.03	6.11
11	3.11	3.82	4.26	4.57	4.82	5.03	5.20	5.35	5.49	5.61	5.71	5.81	5.90	5.98
12	3.08	3.77	4.20	4.51	4.75	4.95	5.12	5.27	5.39	5.51	5.61	5.71	5.80	5.88
13	3.06	3.73	4.15	4.45	4.69	4.88	5.05	5.19	5.32	5.43	5.53	5.63	5.71	5.79
14	3.03	3.70	4.11	4.41	4.64	4.83	4.99	5.13	5.25	5.36	5.46	5.55	5.64	5.71
15	3.01	3.67	4.08	4.37	4.59	4.78	4.94	5.08	5.20	5.31	5.40	5.49	5.57	5.65
16	3.00	3.65	4.05	4.33	4.56	4.74	4.90	5.03	5.15	5.26	5.35	5.44	5.52	5.59
17	2.98	3.63	4.02	4.30	4.52	4.70	4.86	4.99	5.11	5.21	5.31	5.39	5.47	5.54
18	2.97	3.61	4.00	4.28	4.49	4.67	4.82	4.96	5.07	5.17	5.27	5.35	5.43	5.50
19	2.96	3.59	3.98	4.25	4.47	4.65	4.79	4.92	5.04	5.14	5.23	5.31	5.39	5.46
20	2.95	3.58	3.96	4.23	4.45	4.62	4.77	4.90	5.01	5.11	5.20	5.28	5.36	5.43
21	2.94	3.56	3.94	4.21	4.42	4.60	4.74	4.87	4.98	5.08	5.17	5.25	5.33	5.40
22	2.93	3.55	3.93	4.20	4.41	4.58	4.72	4.85	4.96	5.06	5.14	5.23	5.30	5.37
23	2.93	3.54	3.91	4.18	4.39	4.56	4.70	4.83	4.94	5.03	5.12	5.20	5.27	5.34
24	2.92	3.53	3.90	4.17	4.37	4.54	4.68	4.81	4.92	5.01	5.10	5.18	5.25	5.32
25	2.91	3.52	3.89	4.15	4.36	4.53	4.67	4.79	4.90	4.99	5.08	5.16	5.23	5.30
26	2.91	3.51	3.88	4.14	4.35	4.51	4.65	4.77	4.88	4.98	5.06	5.14	5.21	5.28
27	2.90	3.51	3.87	4.13	4.33	4.50	4.64	4.76	4.86	4.96	5.04	5.12	5.19	5.26
28	2.90	3.50	3.86	4.12	4.32	4.49	4.62	4.74	4.85	4.94	5.03	5.11	5.18	5.24
29	2.89	3.49	3.85	4.11	4.31	4.47	4.61	4.73	4.84	4.93	5.01	5.09	5.16	5.23
30	2.89	3.49	3.85	4.10	4.30	4.46	4.60	4.72	4.82	4.92	5.00	5.08	5.15	5.21
31	2.88	3.48	3.84	4.09	4.29	4.45	4.59	4.71	4.81	4.90	4.99	5.06	5.13	5.20
32	2.88	3.48	3.83	4.09	4.28	4.45	4.58	4.70	4.80	4.89	4.98	5.05	5.12	5.18
33	2.88	3.47	3.83	4.08	4.28	4.44	4.57	4.69	4.79	4.88	4.97	5.04	5.11	5.17
34	2.87	3.47	3.82	4.07	4.27	4.43	4.56	4.68	4.78	4.87	4.96	5.03	5.10	5.16
35	2.87	3.46	3.81	4.07	4.26	4.42	4.56	4.67	4.77	4.86	4.95	5.02	5.09	5.15
36	2.87	3.46	3.81	4.06	4.25	4.41	4.55	4.66	4.76	4.85	4.94	5.01	5.08	5.14
37	2.87	3.45	3.80	4.05	4.25	4.41	4.54	4.66	4.76	4.85	4.93	5.00	5.07	5.13
38	2.86	3.45	3.80	4.05	4.24	4.40	4.53	4.65	4.75	4.84	4.92	4.99	5.06	5.12
39	2.86	3.45	3.79	4.04	4.24	4.39	4.53	4.64	4.74	4.83	4.91	4.98	5.05	5.11
40	2.86	3.44	3.79	4.04	4.23	4.39	4.52	4.63	4.73	4.82	4.90	4.98	5.04	5.11
41	2.86	3.44	3.79	4.03	4.23	4.38	4.51	4.63	4.73	4.82	4.90	4.97	5.04	5.10
42	2.85	3.44	3.78	4.03	4.22	4.38	4.51	4.62	4.72	4.81	4.89	4.96	5.03	5.09
43	2.85	3.43	3.78	4.03	4.22	4.37	4.50	4.62	4.72	4.80	4.88	4.96	5.02	5.08
44	2.85	3.43	3.78	4.02	4.21	4.37	4.50	4.61	4.71	4.80	4.88	4.95	5.02	5.08
45	2.85	3.43	3.77	4.02	4.21	4.36	4.49	4.61	4.70	4.79	4.87	4.94	5.01	5.07
46	2.85	3.42	3.77	4.01	4.20	4.36	4.49	4.60	4.70	4.79	4.87	4.94	5.00	5.06
47	2.85	3.42	3.77	4.01	4.20	4.36	4.48	4.60	4.69	4.78	4.86	4.93	5.00	5.06
48	2.84	3.42	3.76	4.01	4.20	4.35	4.48	4.59	4.69	4.78	4.86	4.93	4.99	5.05
49	2.84	3.42	3.76	4.00	4.19	4.35	4.48	4.59	4.69	4.77	4.85	4.92	4.99	5.05
50	2.84	3.42	3.76	4.00	4.19	4.34	4.47	4.58	4.68	4.77	4.85	4.92	4.98	5.04

**ANEXO 3: IMÁGENES DEL DESARROLLO DE COLOR PARA LA DETERMINACIÓN DE FÓSFORO CON CADA MÉTODO DE DIGESTIÓN**

➤ **Digestión vía seca**



➤ **Digestión húmeda asistida por microondas con ácido nítrico**



- **Digestión húmeda asistida por microondas con mezcla 1:4 de ácidos nítrico y clorhídrico**

