

**CONSEJO DE EDUCACIÓN TÉCNICO PROFESIONAL
INSTITUTO TECNOLÓGICO SUPERIOR BUCEO**

Determinación de fósforo en un alimento achocolatado



Silvana Flecchia, Vilma Rouco, Gabriela Scaglione, Patricia Vazquez

Julio de 2009

RESUMEN

El trabajo es seleccionado considerando técnicas analíticas y operaciones básicas de laboratorio que formalizan el perfil del alumno que egresa del Bachillerato de Química Básica e Industrial. De esta manera, la actividad propuesta es un ejemplo de proyecto de egreso de alumnos del tercer año, realizado por primera vez en el año 2007.

El objetivo de esta actividad es determinar el contenido de fósforo total en una muestra de chocolate en polvo comercial. El análisis de fósforo incluye la conversión de las formas fosforadas presentes en la muestra en ortofosfato disuelto y su determinación mediante espectrofotometría de absorción visible mediante desarrollo de color por formación de azul de molibdeno (APHA, 4500-P E).

Básicamente el desarrollo experimental del taller atiende aspectos relacionados con: toma de muestra, mineralización mediante calcinación y puesta en solución considerando la composición media de la ceniza. Así mismo, la medida instrumental requiere la determinación del espectro de absorción en el visible del azul de molibdeno y la construcción de una curva de calibración utilizando como patrón fosfato diácido de potasio estandarizado mediante volumetría ácido-base.

INTRODUCCIÓN

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

El fósforo es un mineral esencial para todos los organismos vivos. Participa en el metabolismo del organismo animal donde juega un papel muy importante en el desarrollo y mantenimiento de las estructuras óseas. Forma parte de importantes compuestos orgánicos como los ácidos nucleicos, algunas coenzimas y los fosfolípidos que integran y dan flexibilidad a las membranas celulares. Se destaca por ser componente del trifosfato de adenosina (ATP) de gran importancia en el metabolismo por el papel que juega en el almacenamiento y transporte de la energía producida en los procesos de fotosíntesis y respiración.

El fósforo es uno de los principales micronutrientes minerales, siendo la ingesta media diaria recomendada 1250 mg para el niño y 700 mg para el adulto.

Dada la notable importancia del fósforo en el desarrollo de la vida, el alcance de su determinación en alimentos es que su valor constituye uno de los parámetros determinantes de la calidad nutricional del producto considerado.

En los alimentos el fósforo se encuentra casi exclusivamente en forma de fosfato. En los alimentos elaborados, las principales fuentes de este micronutriente son las materias primas de origen natural que se utilizan para la fabricación del alimento, pero también, lo son los aditivos alimentarios que se agregan con distintos fines (estabilizante, antihumectante, regulador de la acidez, etc.). Por tanto, el fosfato contenido en alimentos puede encontrarse tanto en formas simples como complejas y estas formas pueden clasificarse en fosfatos simples y condensados, fosfatos inorgánicos y fosfatos ligados a moléculas orgánicas más o menos complejas. A su vez, esas formas pueden ser solubles o poco solubles.

La actividad propuesta trata los componentes fundamentales de un análisis: tratamiento de muestra, aplicación de una técnica analítica y tratamiento de datos.

El tratamiento de muestra es la primera etapa del análisis de una muestra real y consiste en someter la muestra a un tratamiento que la adecue para las etapas subsiguientes del análisis. El tratamiento depende del analito y de su concentración, de la naturaleza de la muestra y de la técnica analítica entre otros. Las etapas del tratamiento de muestra pueden implicar transformaciones sustanciales en el analito y son críticas puesto que, en general, insumen más tiempo, son más costosas, es donde se cometen más errores y gobiernan la precisión y exactitud del resultado. Por lo tanto, es recomendable elegir el tratamiento más sencillo que permita obtener resultados de calidad adecuada.

Las etapas de aplicación de la técnica analítica son de medición y permiten obtener datos sobre la composición de la muestra. El tratamiento de datos permite expresar un resultado.

Particularmente, el objetivo de esta actividad es determinar el contenido de fósforo total en una muestra de un alimento achocolatado (Vascolet®). Para ello, una vez efectuada la toma de una muestra representativa del total, una toma de la muestra de laboratorio se mineraliza, se lleva a solución y se mide por espectrofotometría de absorción molecular visible. Los datos se tratan mediante procedimientos estadísticos sencillos y se expresa un resultado.

Es oportuno observar que tanto el proceso de mineralización como la técnica de análisis que se aplican en esta actividad son ampliamente utilizados, como tal o en alguna de sus variantes, en numerosas aplicaciones industriales, agrícolas, bioquímicas y clínicas entre otras.

Es por los motivos arriba citados que se cree que esta actividad ciertamente ejemplifica los conocimientos, las técnicas analíticas y operaciones básicas de laboratorio que formalizan el perfil del alumno que egresa del Bachillerato de Química Básica e Industrial. De esta manera, la

actividad que se propone es un ejemplo de proyecto de egreso de alumnos de tercer año, realizado por primera vez en el año 2007.

MUESTRA

La muestra a estudiar es un producto achocolatado, Vascolet Calcio-N[®] fabricado por Nestlé. Es un producto en polvo y en su etiqueta declara la composición nutricional que se muestra en la siguiente tabla.

Componente	Contenido*
Carbohidratos	17 g
Proteínas	0,9 g
Grasas totales	0
Grasas Saturada	0
Grasas Trans	0
Fibra alimentaria	0,9 g
Na	0 mg
Ca	100 mg
Mg	24 mg
P	80 mg
*por cada 20 g de producto	

MÉTODO

DISCUSIÓN GENERAL

Dado que en el producto que se analiza, el fósforo se puede presentar en combinación con material orgánico, un método adecuado para determinar el contenido de fósforo total debe incluir las etapas necesarias de tratamiento de muestra para que se elimine la materia orgánica eficazmente y se libere el fósforo como ortofosfato soluble que es la forma en la que debe encontrarse el analito para poder aplicar un método espectrofotométrico de medida.

Para realizar un análisis representativo del producto, este deberá constar de un muestreo que haya sido efectuado en determinadas condiciones, de forma que la muestra refleje el producto en su totalidad. Para este caso en particular, se realiza un tratamiento de muestra que consta de 10 muestreos sucesivos a diferentes alturas y posiciones del sachet. Estas porciones de muestra son homogeneizadas y envasadas en un recipiente (muestra de laboratorio). De ésta se realizan cinco tomas para obtener cinco replicas genuinas.

Para la eliminación de la materia orgánica, se programa que cada una de las replicas se someta a un tratamiento de mineralización por vía seca y que el residuo mineral (ceniza), se tome cuantitativamente con ácido a efecto de disolver e hidrolizar completamente las formas fosfatadas en las que se encuentra el analito en el residuo mineral. De esta forma, la solución que se obtiene contiene el analito en forma de ortofosfato soluble que se mide mediante espectrofotometría de absorción molecular visible. Para la aplicación de este método, y debido a que el ortofosfato, no absorbe radiación electromagnética en el visible, el analito se debe transformar, de forma cuantitativa, específica y reproducible, en un cromóforo cuya intensidad de color sea proporcional al contenido de fósforo en la muestra. Para ello se decide utilizar la transformación que lleva a la formación de "azul de molibdeno" por reacción de fosfato con molibdato de amonio, tartrato de antimonio y potasio y ácido ascórbico en medio ácido, utilizando como referencia el método descrito en APHA, 4500-P E.

Para poder realizar las medidas instrumentales, se propone obtener el espectro de absorción en el visible del cromóforo a medir. La utilidad de obtener el espectro de absorción se explica considerando que de esta forma se puede determinar la longitud de onda del máximo de absorción del analito en las condiciones de trabajo. De esta forma, la longitud de onda que se emplea para las medidas es la que se establece experimentalmente y no la que reporta el método de referencia, evitando el posible apartamiento de la linealidad por causas instrumentales¹ y la pérdida de calidad del resultado.

A su vez, se diseña la construcción de una curva de calibración utilizando cinco patrones de fósforo que se preparan por dilución de una solución patrón de fósforo (solución stock). La misma, se prepara directamente por disolución en agua de fosfato diácido de potasio cuya pureza² se determina previamente por volumetría ácido-base con hidróxido de sodio patrón secundario y fenolftaleína como indicador³.

DISEÑO EXPERIMENTAL Y CÁLCULO DE TOMA

La toma de la muestra de laboratorio que se debe mamar se calcula aproximadamente considerando los siguientes datos:

- ✓ Contenido de fósforo en la muestra: declarado por el fabricante: 80 mg por cada 20 g de producto, que es equivalente a 0,4 % (m/m).
- ✓ Rango de Linealidad: 0,10 a 1,35 ppm de fósforo para un camino óptico de 1 cm, según método APHA 4500-P E.

De acuerdo con el rango de linealidad y el contenido de fósforo estimado, se decide construir una curva de calibración tomando un intervalo de concentración de 0,8 a 1,2 ppm de fósforo con una variación de 0,1 ppm. De esta forma, la toma de muestra se calcula fijando la concentración de la solución a medir en el entorno de 1,0 ppm de fósforo.

Considerando un método sencillo y que involucre el menor número de etapas posible, se plantea mineralizar el producto, tomar la ceniza con HCl y H₂O, desarrollar color y medir absorbancia de la solución según se muestra en el **esquema 1**.

De esta forma, la masa de producto a tomar (m_M) se calcula considerando:

$$\% (m/m) = (m_P / m_M) \times 100$$

siendo:

- % (m/m): porcentaje masa/masa de P en la muestra
- m_P : masa de P en la toma de muestra, expresada en g
- m_M : masa de muestra a tomar, expresada en g

Sustituyendo m_P por $C_{SP} \times V_{ML}$, resulta:

$$\% (m/m) = [(C_{SP} \times V_{ML} \times 10^{-3}) / m_M] \times 100$$

siendo

- C_{SP} : concentración de P en la solución de medida, expresada en ppm
- V_{ML} : volumen de la solución de medida, expresado en L

Reordenando:

$$m_M = (C_{SP} \times V_{ML} \times 10^{-1}) / \% (m/m)$$

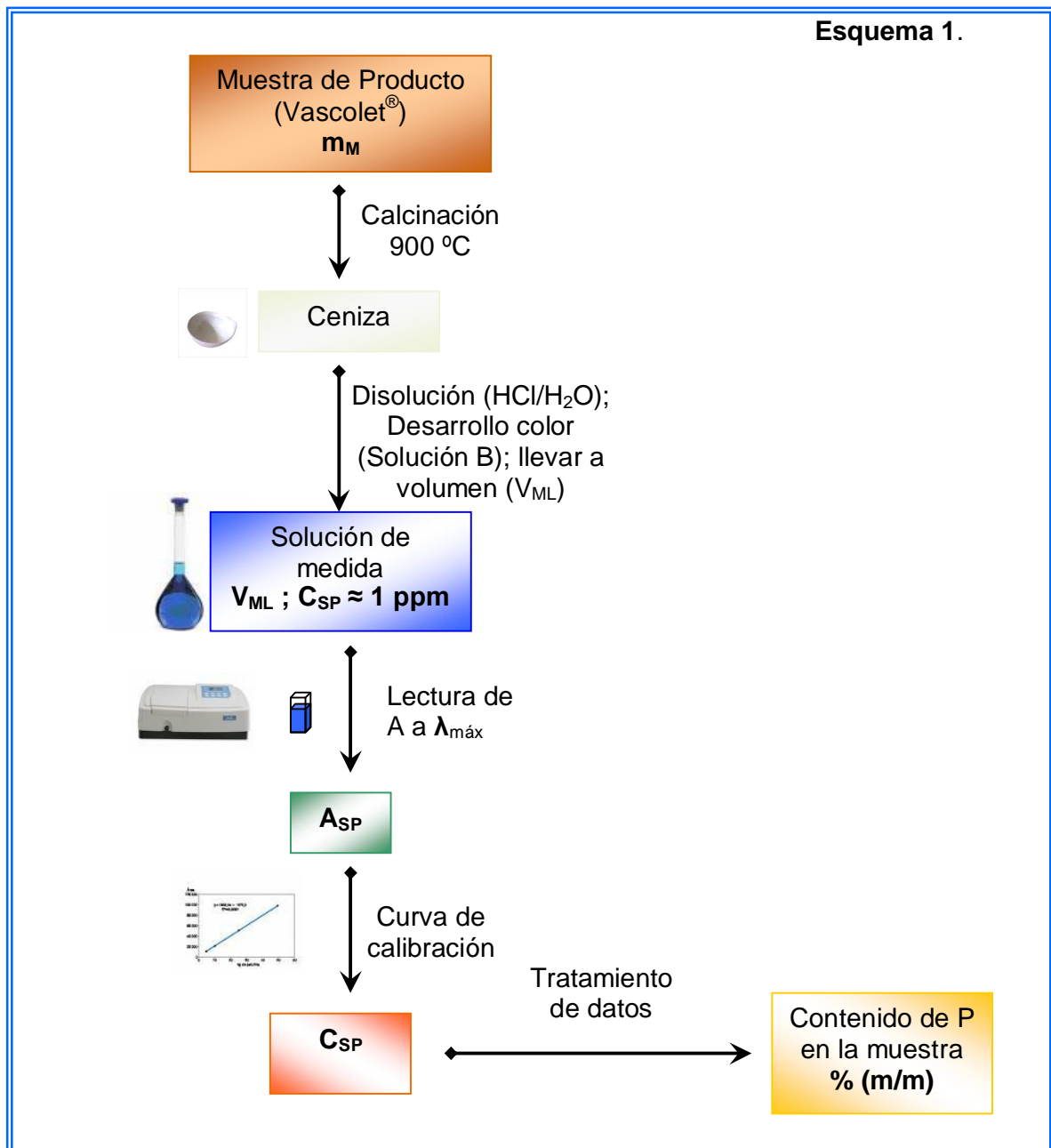
¹ Ver Anexo 3

² Ver Anexo 7

³ En la Pag.5 se muestra el esquema del método

Por tanto, fijando V_{ML} en 50,00 mL, se tiene que tomar una masa de muestra de **0,013 g**.

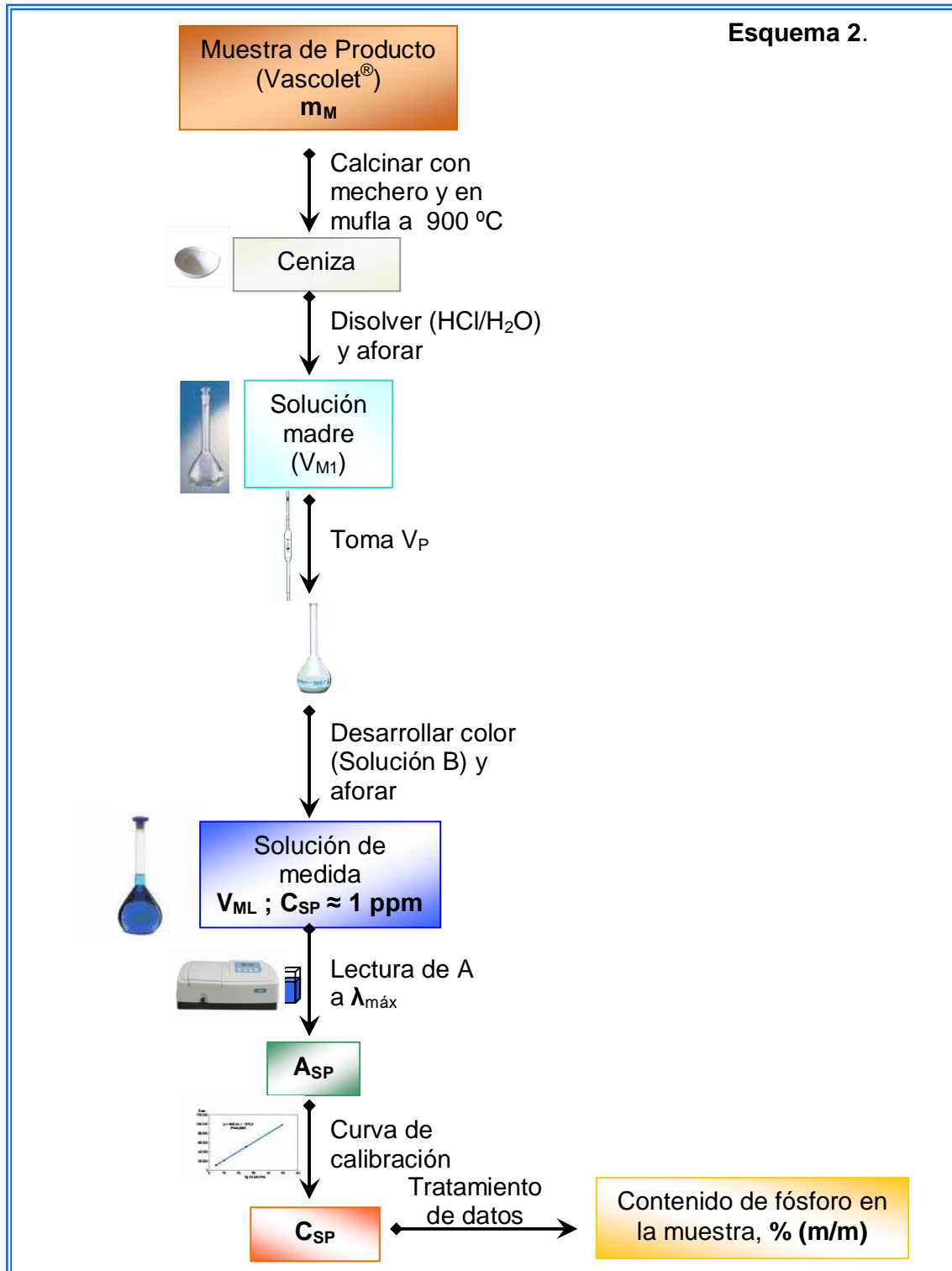
Sin embargo, la toma de una masa tan pequeña tiene una incertidumbre asociada (0,8%) no semejante a la asociada al volumen (0,1 %) y es demasiado grande para el objetivo planteado. Por tal motivo, el esquema 1 se modifica planteando preparar una solución por disolución de la ceniza que se obtiene al calcinar una masa de muestra no menor que 0,1 g (incertidumbre asociada 0,1 %) y desarrollar color en una alícuota de la solución preparada. (**Esquema 2**)



De esta manera, la masa de producto a tomar (m_M) se calcula según:

$$m_M = [(C_{SP} \times V_{ML} \times 10^{-1}) / \% (m/m)] \times (V_{M1}/V_p)$$

siendo V_{M1} el volumen de la solución preparada por disolución de la ceniza (solución madre) y V_p el volumen que se toma de solución para desarrollar color y medir absorbancia. Así, (V_{M1}/V_p) es el factor de multiplicación que se utiliza para aumentar la toma de producto y disminuir la incertidumbre asociada a la masa a un valor no mayor que 1 %. Por tanto, estableciendo un factor 10 la masa de la toma de muestra es **0,13 g**.



DISCUSIÓN DE LAS ETAPAS

Mineralización

En general, los métodos de mineralización, que se aplican a alimentos, involucran tratamientos energéticos que eliminan la matriz orgánica por oxidación e incluyen descomposición por vía seca o calcinación y descomposición por vía húmeda o digestión.

La calcinación, implica un fuerte calentamiento de la muestra en presencia de aire. Se practica en cápsulas o crisoles de cuarzo o porcelana y, en general, el proceso se comienza con calentamiento con mechero bajo campana que se continúa en mufla. La temperatura se ajusta para que la descomposición se complete en un tiempo razonable sin que ocurra pérdida de analito por formación de especies inorgánicas volátiles y sin que se alcance la temperatura de fusión del residuo mineral. En general, esta temperatura se encuentra entre 500 y 1000 °C. En estas condiciones, la porción orgánica de la muestra es completamente oxidada por el oxígeno atmosférico y se obtiene un residuo (ceniza) que se constituye por óxidos metálicos, cloruros, sulfatos y fosfatos entre otros.

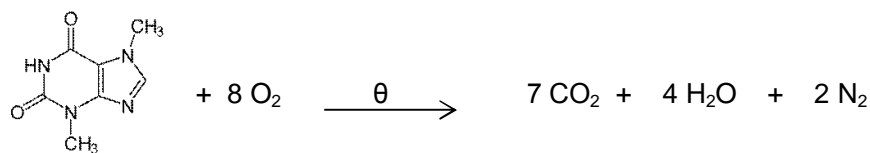
Este método se destaca por su simplicidad, breve tiempo de operación, bajo costo, escaso riesgo de contaminación y comúnmente es el método de elección para el tratamiento de muestras con elevado contenido de material orgánico como es el caso de los alimentos. El principal inconveniente deriva de la alta temperatura utilizada que, a veces, puede provocar envejecimiento de óxidos, obteniéndose residuos de difícil disolución.

La descomposición por vía húmeda, implica el calentamiento de la muestra en presencia de un ácido mineral oxidante concentrado, o mezclas de ácidos oxidantes y otros oxidantes. Los reactivos más utilizados son HNO₃ y H₂SO₄ (individualmente o en mezclas), HClO₄ (en mezcla y luego de un tratamiento previo con HNO₃) y mezclas de H₂SO₄ y H₂O₂. Con este tipo de tratamiento, los analitos, a excepción de sulfatos poco solubles, se obtienen en solución ácida bajo formas inorgánicas simples que facilita la determinación. Las principales restricciones para la selección de estos métodos se encuentran en el potencial de riesgo asociado con la operación, el tiempo de operación y el costo.

Por lo antes expuesto, y considerando la composición media de la muestra⁴, en este trabajo se procede a mineralizar la muestra mediante calcinación. Se utilizan crisoles de porcelana y la temperatura máxima se fija en 900°C.

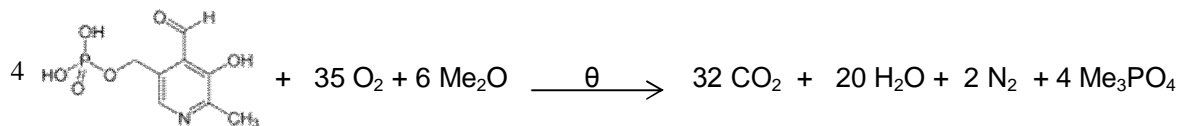
Los procesos que ocurren durante la calcinación son complejos e incluyen, además de los procesos de oxidación - reducción, procesos simultáneos de metátesis y deshidratación. Durante el proceso de calcinación, la matriz orgánica hidrocarbonada es oxidada a CO₂ y agua. Los átomos de nitrógeno, azufre, fósforo y metales que forman parte de macromoléculas constitutivas de la matriz orgánica presentes en la muestra se transforman en nitrógeno (eventualmente óxidos de nitrógeno y nitrato), sulfato, fosfato y óxidos o sales metálicas respectivamente. De esta forma, todas las especies fosforadas originalmente presentes en la muestra se encontraran en la ceniza como fosfatos metálicos.

Algunos de estos procesos, se ilustran a continuación:

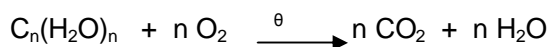


TEOBROMINA

⁴ Ver tabla en pág. 2



FOSFATO DE PIRIDOXAL⁵



CARBOHIDRATOS

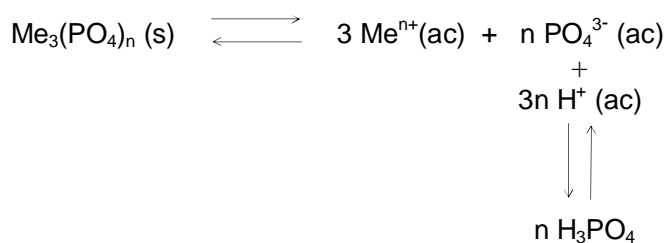
Puesta en solución

Las soluciones de muestras minerales se obtienen por tratamiento con agua, con soluciones de ácidos diluidos y concentrados, con mezclas de ácidos o por disgregación con sólidos fundidos.

Cuando una muestra se somete a un tratamiento previo de mineralización, la elección del solvente se debe realizar considerando la posible composición del residuo mineral, el o los compuestos que es posible que formen el analito y las especies interferentes en la medida del mismo, así como las propiedades del solvente como ser carácter ácido-base, poder complejante con respecto a los iones metálicos de interés, solubilidad de sus sales y seguridad de la operación. En este caso, la solubilización del residuo de calcinación (ceniza) requiere un tratamiento con ácido.

La elección de un solvente ácido se justifica considerando que al calcinar la muestra los fosfatos metálicos poco solubles en agua que se pueden formar tienen alta solubilidad en ácidos minerales debido al desplazamiento del equilibrio de solubilidad por formación de ácido débil (H₃PO₄).

Considerando la composición del cacao, base del producto que se analiza, se puede suponer que la ceniza contiene tanto fosfato de sodio y de potasio, solubles en agua, como fosfato de magnesio, de calcio, de hierro y de zinc, poco solubles en agua, pero completamente solubles en soluciones de ácidos minerales diluidos. Considerando que el H₂SO₄ puede llevar a la formación de CaSO₄ poco soluble y que el empleo de HNO₃ incorpora mayor riesgo, se decide utilizar HCl. La siguiente ecuación representa el proceso de disolución, siendo Me zinc, calcio o magnesio



Como es muy poco probable que la muestra y la matriz mineral contengan sílice (interferencia positiva) en cantidad significativa, no se considera necesario realizar un tratamiento para la separación de la misma. Por tanto, la solución madre se prepara agregando sobre la ceniza HCl concentrado en cantidad suficiente para humedecer, se toma con agua y se lleva a volumen. En caso de que el resultado se aparte significativamente del valor esperado, se repetirá la preparación de la solución tratando la ceniza con HCl 6 M y llevando a sequedad reiteradamente para deshidratar la sílice. El residuo de sequedad se toma con HCl 3 M, se filtra y el filtrado se lleva a volumen.

⁵ derivado fosforado de vitamina B6

Desarrollo de color

Los métodos para la medida de fósforo por espectrofotometría de absorción molecular visible requieren la transformación cuantitativa, específica y reproducible del analito en un cromóforo cuya intensidad de color sea proporcional al contenido de fósforo en la muestra. Los principales métodos reportados en la literatura consultada, implican la formación de heteropoliácidos:

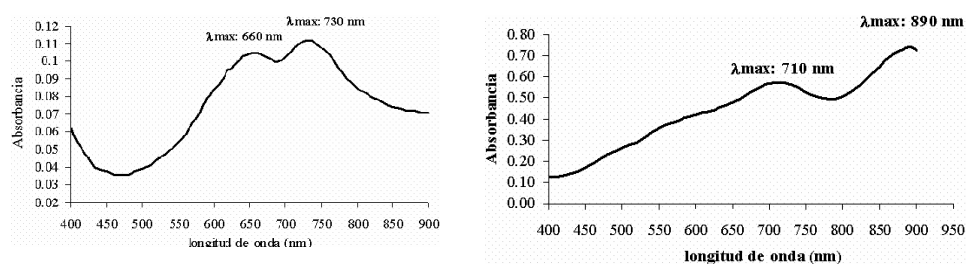
1. **vanadofosfomolibdico** por reacción de ortofosfato en solución acuosa diluida con molibdato de amonio y metavanadato en medio ácido
2. **fosfomolibdico** por reacción de ortofosfato en solución acuosa diluida con molibdato de amonio en medio ácido
3. **antimonilfosfomolibdico** por reacción de ortofosfato en solución acuosa diluida con molibdato de amonio y tartrato de antimonio y potasio en medio ácido

Los métodos que proponen la formación de **vanadofosfomolibdico** utilizan directamente la formación de este heteropoliácido para la medida instrumental puesto que al ser de color amarillo anaranjado intenso, presenta una absorptividad molar basada en fósforo suficientemente alta entre 400 y 470 nm y, dependiendo de la longitud de onda de medida, la intensidad de su color es proporcional a la concentración de fosfato en soluciones que van de 1,0 hasta 18 ppm de fósforo.

Por el contrario, los métodos que se basan en la formación de los ácidos **fosfomolibdico** y **antimonilfosfomolibdico** requieren la transformación de los ácidos en cromóforos de color azul comúnmente llamados “azul de molibdeno”. La causa fundamental para ello es que aunque el color amarillo de los ácidos **fosfomolibdico** y **antimonilfosfomolibdico** es intenso, la absorción, que se inicia a 450 nm, aumenta al disminuir la longitud de onda y el máximo de absorción se halla en el UV. Medir a 400 nm sería un buen recurso de compromiso (considerando que la intensidad de la lámpara de wolframio disminuye rápidamente al disminuir la longitud de onda) pero exigiría un ancho de rendija muy pequeño para obtener un rango de linealidad aceptable ya que se mediría en una rama de la banda de absorción⁶.

La formación de “azul de molibdeno” se realiza por reducción, siendo varios los reductores que pueden utilizarse. Los métodos de mejor resultado que reporta la literatura emplean SnCl_2 para la reducción del ácido fosfomolibdico y ácido ascórbico para la reducción del ácido antimonilfosfomolibdico. La composición del “azul de molibdeno” no se conoce con seguridad aunque se postula la siguiente: $(\text{MoO}_2 \cdot 4\text{MoO}_3)\text{H}_3\text{PO}_4$.

El color de “azul de molibdeno” es muy intenso y la absorptividad molar basada en fósforo es aproximadamente 25.000, por lo que estos métodos se caracterizan por su alta sensibilidad y pueden utilizarse para la determinación de trazas de fósforo. La absorbancia máxima se encuentra en el rojo pero el máximo de absorción depende del modo de preparación del “azul de molibdeno”. En la figura adjunta se muestran los espectros de absorción para el “azul de molibdeno” obtenido por reducción del fosfomolibdico con cloruro estannoso (a la derecha) y por reducción del antimonilfosfomolibdico con ácido ascórbico (a la izquierda)



⁶ Ver Anexo 1 y 3

Adviértase que el máximo de absorción del cromóforo obtenido en presencia de antimonio esta desplazado hacia longitudes de onda algo mayores, lo que sugiere que el antimonio sería uno de los componentes del “azul de molibdeno”. A su vez, los picos anchos y llanos demuestran que la selección de la longitud de onda no es crítica y que puede utilizarse una rendija ancha.

El principal inconveniente que presenta la medida de “azul de molibdeno” es que sus soluciones son coloidales y varían con el tiempo, precipitando eventualmente, de modo que la lectura debe tomarse antes de una o dos horas de haber preparado la mezcla. Otro motivo para realizar la medida al cabo de un tiempo fijo y corto es que el exceso de molibdato de amonio también sufre reducción y, si bien lo hace mucho más lentamente, podría sesgar el resultado por consumo de reductor.

En este caso, la determinación del analito se realiza empleando el método que utiliza ácido ascórbico para la formación de “azul de molibdeno” (APHA 4500-P E). Por tanto, sobre una alícuota de la solución madre preparada por disolución de la ceniza, se agrega una mezcla de molibdato de amonio, tartrato de antimonio y potasio y ácido ascórbico en medio ácido. Se deja reposar y se mide absorbancia antes de transcurridos 30 minutos a la longitud de onda que corresponde al máximo de absorción del espectro obtenido.

Interferencias en la medida instrumental

Las principales interferencias positivas se encuentran en los elementos que también forman heteropoliácidos con molibdeno. Ellos son arsénico bajo forma de arseniato y silicio como ortosilicato. El arseniato en concentración mayor a 0,1 ppm interfiere en la determinación. En el caso del silicato como la reducción del ácido silicomolibdico es mucho más lenta que la reducción del ácido fofomolibdico, la asignación de un tiempo breve para el desarrollo de color impide la interferencia de silicatos hasta concentraciones del orden de 10 ppm. Las interferencias negativas más importantes surgen de la presencia de especies que consumen reductor, entre ellas, sulfuro, nitrito, cromato, tiocianato, etc.

Curva de calibración

Una curva de calibración determina la relación funcional existente entre la respuesta del instrumento de medida y una propiedad adecuada del analito como ser masa o concentración.

Las curvas de calibración se aplican cuando no se conoce la relación entre la respuesta obtenida con respecto a la propiedad medida y cuando se desea eliminar el sesgo de un método de análisis. Su determinación constituye el proceso de calibración.

Para determinar esta función se mide la respuesta del método a una serie de patrones de concentración exactamente conocida y se determina la relación funcional por regresión. Una vez determinada, es posible estimar la concentración del analito a partir de la respuesta obtenida para la muestra aplicando la función inversa (interpolación).

Una forma especialmente conveniente de la curva de calibración es la linealidad. Cuando ella se cumple la función que se obtiene adopta la forma:

$$R = a + bC$$

Donde R es la respuesta instrumental, por ejemplo absorbancia; C es la propiedad del analito, por ejemplo masa o concentración; b es la pendiente de la recta (sensibilidad de calibración) y a es la ordenada en el origen.

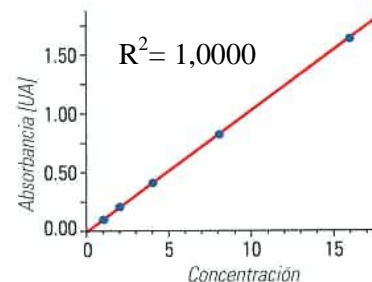
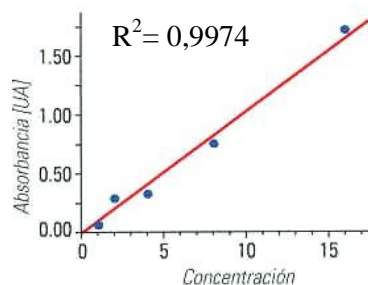
Para construir una curva de calibración debe considerarse:

- ✓ **Cantidad de puntos:** depende de la calidad de ajuste que se pretenda. Cuantos más puntos se tomen, se puede esperar un mejor ajuste, sin embargo, aumenta el tiempo y costo de la determinación. Existe una cantidad mínima de puntos que depende de la función de calibración. Por ejemplo si la misma es una recta se necesitan dos puntos, si es un polinomio de segundo grado se necesitan tres puntos, etc. De todos modos, cuando no se conoce el método o el comportamiento del sistema, es recomendable utilizar un número de puntos superior a la cantidad mínima. En general se trabaja con cinco puntos durante las etapas de desarrollo del método. Cuando el método se ha validado y se verifica periódicamente, la calibración de rutina puede realizarse midiendo la cantidad mínima de puntos.

- ✓ **Rango de concentración:** Está determinado por la técnica de análisis a utilizar, por el instrumento utilizado y también por el analito y el problema. Por ejemplo, en espectrofotometría de absorción se puede establecer un **rango óptimo** de absorbancia dentro de los cuales debe encontrarse la medida para obtener una precisión adecuada. Entonces, para cierto analito de absortividad conocida es posible fijar rangos de concentración que no es conveniente exceder si se desea obtener una precisión aceptable. Esto también está determinado por la calidad del instrumento de medida. La excepción a este criterio se encuentra para aquellas muestras que contienen una concentración tan baja de analito (análisis de trazas) que es necesario diseñar la curva de calibración para que contenga la concentración estimada de analito en el problema tal como es y el criterio de rango óptimo pasa a segundo plano ya que solo es aplicable cuando la concentración del analito en la muestra problema es suficientemente alta para que ésta se ajuste, por dilución, al rango preestablecido de la curva de calibración.

- ✓ **Distribución de los puntos:** Aunque no existen argumentos matemáticos importantes, es recomendable, para facilitar la presentación e interpretación, seleccionar las concentraciones de modo que los puntos de la curva queden uniformemente distribuidos. Cuando es posible, la variación de concentración se elige considerando la sensibilidad y el rango de linealidad del método⁷.

- ✓ **Selección del método de ajuste:** Muchas veces es necesario utilizar criterios estadísticos muy rigurosos. Sin embargo, para muchos casos, es aceptable utilizar criterios simples como el factor de correlación (R^2) con respecto a la regresión y la inspección visual de los puntos del gráfico superpuestos con las curvas de regresión. el factor de correlación (R^2) es un parámetro estadístico que expresa el ajuste de los puntos con respecto a una distribución particular, que es perfecta cuando es igual a la unidad.



⁷ Ver Anexo 2

La curva de calibración que se diseña para este trabajo se argumenta sobre la base de los criterios generales que se consideran para la construcción de curvas de calibración, del contenido estimado de fósforo en la muestra y de acuerdo con los parámetros establecidos para el método de determinación del analito en muestras de agua que es el método que se toma como referencia para realizar este trabajo (Método del ácido ascórbico; APHA 4500- P E). Según la referencia, la concentración mínima detectable del analito en muestras de agua es aproximadamente 0,01 ppm de fósforo y el rango de linealidad del método de medida instrumental es (0,15 -1,30) ppm de fósforo, para un camino óptico de 1,0 cm.

Si bien los parámetros de calidad de un método son característicos de él y únicamente válidos cuando se reproducen fielmente las condiciones establecidas en el método, es posible suponer que los parámetros del método de referencia y los del método propuesto en este trabajo, no deben distar demasiado entre sí puesto que, las matrices de las soluciones de medida que se obtienen por ambos métodos son similares. A su vez, en materia de límite de detección y rango de linealidad, el método espectrofotométrico es mucho más determinante que el tratamiento previo para la adecuación de la muestra.

Como el contenido estimado de fósforo es demasiado alto para los rangos que se toman como referencia (el fabricante declara 80 mg de fósforo por cada 20 g de producto, es decir, 4000 ppm de fósforo), a efecto de evitar diluciones excesivas del problema y realizar una toma de muestra lo más pequeña posible y disminuir el tiempo de calcinación, se plantea preparar la solución de medida con un valor de concentración lo más cercano posible al límite superior del rango de linealidad. Ese valor, que debe centrarse en el rango de la curva de calibración, se fija en 1,0 ppm de fósforo. Este criterio exige utilizar una variación de concentración muy pequeña para poder establecer una curva con cinco puntos, y por lo tanto, se fija en 0,1 ppm. Aunque la variación que se toma es pequeña (9 % del rango de linealidad), considerando que la sensibilidad de calibración reportada para la medida instrumental es alta, y que la elección es de compromiso, ésta se supone adecuada.

De acuerdo con lo establecido, para construir la curva de calibración deben prepararse las soluciones patrón de fósforo que se listan en la tabla que se adjunta al final de este ítem.

Para preparar las soluciones patrón de medida, se realizan tomas de una solución patrón, llamada solución stock, de concentración próxima a 50 ppm. Cada toma se vierte desde una bureta a un matraz aforado, se agrega el reactivo para desarrollar color, se afora, se homogeniza, se deja reposar y se mide absorbancia a la longitud de onda seleccionada.

Las tomas de cada patrón se determinan por cálculo de dilución:

$$V_T = (C_P \times V_M) / C_{STOCK}$$

siendo:

V_T el volumen de la toma de la solución stock, expresado en mL

C_P la concentración del patrón a preparar, expresada en ppm

V_M el volumen del patrón a preparar, expresado en mL

C_{STOCK} la concentración de la solución stock, expresada en ppm

Los valores calculados se muestran en la tabla adjunta

Nº de Patrón	Concentración (ppm)	Toma de Stock (mL)	Volumen de solución (mL)
1	0,8	0,80	50,00
2	0,9	0,90	50,00
3	1,0	1,00	50,00
4	1,1	1,10	50,00
5	1,2	1,20	50,00

Tratamiento de datos

En primer lugar deben calcularse con exactitud las concentraciones de la soluciones patrón que se midieron para construir la curva de calibración mediante cálculo de dilución:

$$C_P = (C_{STOCK} \times V_T) / V_M$$

La incertidumbre asociada a la concentración de cada patrón se calcula por propagación:

$$\Delta C_P = [(\Delta C_{STOCK} / C_{STOCK}) + (\Delta V_T / V_T) + (\Delta V_M / V_M)] C_P$$

siendo:

C_P la concentración exacta del patrón preparado, expresada en ppm

C_{STOCK} la concentración de la solución stock, expresada en ppm

V_T el volumen exacto de la toma vertida al matraz, expresado en mL

V_M el volumen del patrón preparado, expresado en mL

ΔX la incertidumbre asociada al valor X

Con los valores calculados y los datos de Absorbancia determinados experimentalmente se construye una tabla y se gráfica en EXCEL Absorbancia en función de la concentración.

Obtenido el grafico, se determina la relación funcional entre Absorbancia y concertación, utilizando para ello la función insertar "LÍNEA DE TENDENCIA" de EXCEL seleccionando las siguientes opciones:

- ✓ Distribución lineal
- ✓ Ordenada en el origen igual cero
- ✓ Mostrar la ecuación de la línea de tendencia y el coeficiente de correlación (R^2)

Una vez conocida la ecuación de la recta que corresponde a la curva de calibración, se calcula por interpolación el valor de concentración de la muestra problema utilizando el valor de Absorbancia obtenido para cada una de las replicas de la muestra problema.

Si la ecuación de la curva de calibración es $A = a C_{SP}$ entonces $C_{SP} = A / a$ siendo:

C_{SP} es la concentración exacta de la solución problema, expresada en ppm

A es la Absorbancia de la solución problema

a es la pendiente de la curva de calibración cuyo valor dará EXCEL

Calculados los valores exactos de la concentración de la solución problema de cada una de las réplicas, se transforman estos valores en Porcentaje de fósforo en la muestra analizada según la siguiente expresión:

$$\% (m/m) = [(C_{SP} \times V_{ML} \times 10^{-1}) / m_M] \times (V_{M1}/V_p)$$

siendo

- % (m/m) el porcentaje masa/masa de fósforo en la muestra
- V_{M1} el volumen de la solución preparada por disolución de la ceniza (solución madre) ($100,00 \times 10^{-3}$) L
- V_p el volumen que se toma de solución madre para desarrollar color y medir absorbancia. ($10,00 \times 10^{-3}$) L
- C_{SP} : concentración de fósforo en la solución de medida, expresada en ppm y calculada exactamente por interpolación en la curva de calibración y expresada en ppm
- V_{ML} : volumen de la solución de medida ($50,00 \times 10^{-3}$) L
- m_M : masa de muestra tomada para calcinar, expresada en g con exactitud a la décima de mg

De esta forma se obtienen tantos valores de % (m/m) cómo réplicas se hayan realizado. Para obtener el resultado del método se estima el valor con el promedio de los valores concordantes y la incertidumbre asociada se expresa calculando la **desviación estándar (s) y el Intervalo de confianza** ($\pm t (s/(n)^{1/2})$) considerando $t = 2,78$ (4 grados de libertad y confianza 95%) si se promediaron cinco réplicas del problema.

El resultado (μ) se expresa:

$$\mu = X \pm t (s/(n)^{1/2})$$

dónde

X es el promedio de las réplicas concordantes

$\pm t (s/(n)^{1/2})$ es el Intervalo de confianza, una forma de expresar la incertidumbre del método.

En la tabla adjunta se muestran otras formas de expresión de la incertidumbre de la medida y la expresión de la desviación estándar

Desviación estándar absoluta, s	$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N - 1}}$
Desviación estándar relativa, (RSD)	$RSD = \frac{s}{\bar{x}}$
Desviación estándar de la media, s_m	$s_m = \frac{s}{\sqrt{N}}$
Coefficiente de variación, CV	$CV = \frac{s}{\bar{x}} \times 100\%$
Varianza	s^2
<ul style="list-style-type: none"> • x_i = valor numérico de la iésima medida. 	
$\bar{x} = \text{media de N medidas} = \frac{\sum_{i=1}^N x_i}{N}$	

MATERIALES

INSTRUMENTAL

Balanza analítica, marca OHAUS, modelo Explorer, capacidad 125 g, precisión 0,1 mg

Mufla, marca Thermolyne, modelo 1300 Furnace

Espectrofotómetro, marca Spectronic, modelo 20 Génesis

Espectrofotómetro, marca Unico, modelo UV 2100

Mechero Bunsen

Material de vidrio lavado con ácido clorhídrico diluido

SOLUCIONES Y REACTIVOS

Solución de hidróxido de sodio, NaOH 0,1M

Hidrógeno ftalato de potasio patrón primario, $\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4$

Fenolftaleína Indicador, $\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{O}_4$ 2%

Ácido sulfúrico cc, H_2SO_4

Ácido Clorhídrico cc, HCl

Solución A: molibdato de amonio $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, con tartrato de antimonio y potasio $\text{K}(\text{SbO})\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$.

Solución B: solución A + ácido ascórbico $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$.

Solución Stock de KH_2PO_4 ($56,50 \pm 0,08$) ppm expresado en fósforo elemental.

PROCEDIMIENTO

TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

1. En un crisol limpio y seco, masar, con exactitud a la décima de miligramo, cerca de 0,13 g de muestra.
2. En campana para gases y utilizando un mechero Bunsen calcinar la muestra (evitando que arda) hasta que no se observe desprendimiento de humos y vapores.
3. Continuar la calcinación en mufla a 900 °C hasta que no se observen cambios y/o se verifique constancia de masa.
4. Humedecer la ceniza obtenida en el paso anterior con ácido clorhídrico concentrado, agregar unos pocos mL de agua, agitar y si fuera necesario calentar ligeramente para favorecer la disolución de la ceniza.
5. Trasvasar cuantitativamente a un matraz aforado de 100,00 mL, enjuagar reiteradamente la cápsula con pequeños volúmenes de agua que se vierten en el matraz. Enrasar y homogenizar (V_{M1}).

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

Solución A

1. Agregar lentamente 275 mL de ácido sulfúrico concentrado en aproximadamente 400 mL de agua destilada.
2. Disolver 25 g de molibdato de amonio en aproximadamente 150 mL de agua destilada. Calentar hasta entibiar solamente para ayudar a disolver.
3. Disolver 0,60 g de tartrato de antimonio y potasio en aproximadamente 50 mL de agua destilada.
4. Enfriar bien bajo canilla las soluciones de ácido y molibdato de amonio.
5. Mezclar las soluciones de tartrato y molibdato y luego agregar a la solución de ácido, lentamente y agitando.
6. Llevar a un litro luego de enfriar bajo canilla, cuidando de que la solución no se contamine.
7. Trasvasar a frasco ámbar.

NOTA: Esta solución se preparará con anticipación.

Solución B

1. Disolver 0,53 g de ácido ascórbico en un matraz erlenmeyer de 250 mL, en aproximadamente 50 mL de agua destilada y agitar hasta disolución.
2. Agregar lentamente 25 mL de SOLUCIÓN A y agitar.
3. Llevar a 100 mL con agua destilada.

NOTA: Este reactivo para desarrollo de color debe prepararse diariamente.

Solución blanco

La solución blanco se prepara con 8 mL de solución B y aforando a 50,00 mL con agua destilada.

Solución de medida de la muestra problema

1. Tomar con pipeta aforada 10,00 mL (V_P) de la solución madre de la muestra y verter cuantitativamente en un matraz aforado de 50,00 mL (V_{ML}).
2. Agregar 8 mL de solución B para desarrollo de color, enrasar con agua y homogeneizar.
3. Dejar reposar de 10 a 30 minutos para desarrollo de color y medir absorbancia a la longitud de onda de máxima absorción. Si fuera necesario realizar la corrección por transparencia.
4. Replicar los pasos 1 a 3 cinco veces.

ESPECTRO DE ABSORCIÓN

Utilizando una de las SOLUCIONES PATRÓN preparadas (ver punto siguiente) y la SOLUCIÓN BLANCO, medir absorbancia en el rango de 400 a 900 nm utilizando un intervalo de 30 nm. En caso de observar un cambio de tendencia en la medida de absorbancia disminuir el intervalo a 5 o 10 nm.

CURVA DE CALIBRACIÓN – SOLUCIONES PATRONES

1. Verter cuantitativamente el volumen (V_T) previamente calculado⁸ para la preparación de cada una de las SOLUCIONES PATRÓN con bureta de 10,00 mL en matraces aforados de 50,00 mL (V_M).
2. Agregar en cada matraz 8 mL de solución B para desarrollo de color, enrasar con agua y homogeneizar.
3. Dejar reposar de 10 a 30 minutos para desarrollo de color y medir absorbancia a la longitud de onda de máxima absorción. Si fuera necesario realizar la corrección por transparencia.
4. Replicar los pasos 1 a 3 con las soluciones patrones de KH_2PO_4 de concentraciones 0,8 a 1,2 ppm en P con una variación de 0,1 ppm.

TRANSPARENCIA DE CELDA

Llenar dos celdas de absorción con solución blanco, y medir absorbancia de cada una a la longitud de onda de máxima absorción.

⁸ Ver cálculo en págs. 11 y 12

BIBLIOGRAFÍA

- ✓ APHA, Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales, Ediciones Díaz de Santos S. A., 17 ma. Edición, 1992.
- ✓ COTTON A, WILKINSON G., Química Inorgánica avanzada, Editorial Limusa, 1era. Edición, 1990.
- ✓ SKOOG D., LEARY J., Análisis instrumental, Mac Graw-Hill, 4ta Edición, 1998.
- ✓ KOLTHOFF I., SANDELL E., Análisis químico cuantitativo, Editorial Nigar, 4ta. Edición, 1972.
- ✓ www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0120-280420...

ANEXOS

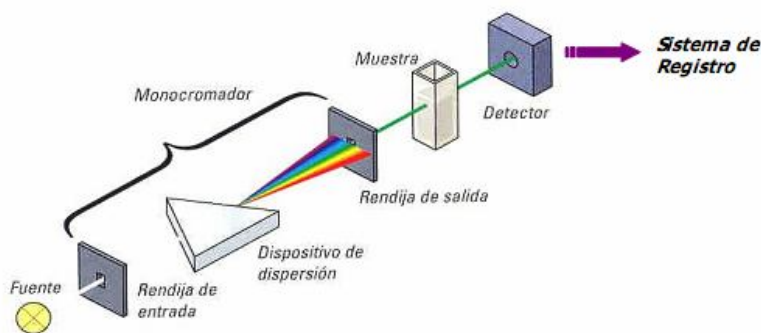
ANEXO 1

MEDIDAS INSTRUMENTALES

Los instrumentos utilizados para medir la radiación electromagnética absorbida por especies químicas en solución se conocen con los nombres de colorímetros, fotómetros y espectrofotómetros. Los instrumentos para medir la absorción de radiación UV o visible constan básicamente de los siguientes componentes:

- ✓ Fuente de radiación (UV y visible).
- ✓ Selector de longitud de onda (monocromador).
- ✓ Compartimento de muestra.
- ✓ Detector.
- ✓ Procesador de señal y presentación de lectura.

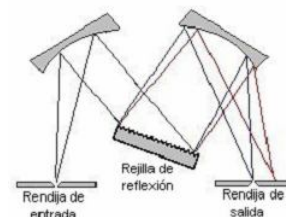
En la siguiente figura se muestra el esquema de un espectrofotómetro convencional de simple haz.



La radiación policromática de la fuente se enfoca sobre la rendija de entrada de un monocromador. Este transmite selectivamente una estrecha banda de longitudes de onda a través de la rendija de salida. La radiación atraviesa el área de muestra hasta el detector que mide la intensidad de la radiación transmitida y la traduce a una señal que se registra, amplifica y compara con una referencia para generar una medida en una escala determinada.

La fuente de energía radiante debe producir un haz de radiación estable y de potencia suficiente para facilitar la detección y medida. Las lámparas de hidrógeno y de deuterio son las más utilizadas para medidas en el ultravioleta y producen un espectro continuo entre 160–375 nm. Lámpara de filamento de tungsteno es la fuente más común para la zona del visible e infrarrojo, siendo útil entre 320 y 2500 nm.

Los monocromadores se componen de una rendija de entrada, una lente colimadora, un dispositivo de dispersión (normalmente un prisma o una rejilla), una lente de enfoque y una rendija de salida. El ancho de banda efectivo de un monocromador depende de la dispersión de la red o del prisma así como de la anchura de las rendijas de entrada y salida. Si el ancho de banda es pequeño se obtiene mejor resolución de las bandas espectrales de absorción. Sin embargo, la disminución del ancho de banda disminuye la potencia de la radiación transmitida y la exactitud.



Los recipientes para la muestra y soluciones de referencia se llaman celdas o cubetas y sus características son la transparencia y el camino óptico.



Las celdas deben construirse con materiales transparentes a la radiación de la zona espectral de trabajo. Para espectroscopía ultravioleta se requieren celdas de cuarzo o sílice fundida, transparentes entre 200 y 2000 nm. En la región visible se utilizan celdas de vidrios transparentes entre 350 y 2000 nm. La longitud del área de sección transversal de la celda se corresponde con el camino óptico y en general es de 1 cm aunque varía entre 0,5 y 5 cm.

Para la detección de la radiación se utiliza un *transductor* que convierte la energía radiante en una señal eléctrica. Este debe responder a la radiación en un amplio intervalo de longitud de onda de forma lineal y tener sensibilidad, estabilidad (o nivel de ruido) y tiempo de respuesta adecuados. Entre los más utilizados se encuentran fototubos y tubos fotomultiplicadores.

<i>Espectrofotómetro 20 GENESYS⁹ - Especificaciones</i>
Longitud de onda 325 a 1100 nm
Ranura espectral: 8 mm
Rango fotométrico: (0-125) %T ; (-0.1-2.5) A ; (0-1999) C
Energía parásita: 0.1%T, medida a 340 radiante y 400 nm
Repetibilidad de longitud de onda: 0.5 nm
Exactitud de longitud de onda: 2.0 nm
Ruido a 500 nm: 1 mA a 0A y 2 mA a 2A, pico-a-pico (15 segundos)
Exactitud fotométrica: 0.003 A para el rango (0.0 - 0.3) A y 1.0% para el rango (0,3 - 2.5) A
Vida de la lámpara Visible: ~1000 horas
Rejilla de difracción 1200 líneas/mm

<i>Espectrofotómetro UNICO - 2100UV - Especificaciones</i>
Longitud de onda 200 a 2100 nm
Rango fotométrico: (0-125) %T ; (-0.1-2.5) A ; (0-1999) C
Repetibilidad de longitud de onda: 1.0 nm
Exactitud de longitud de onda: 2.0 nm
Exactitud fotométrica: ± 0.004 A para 0.5 A

ANEXO 2

CARACTERÍSTICAS DEL MÉTODO DE MEDIDA INSTRUMENTAL

Entre las principales características de un método de medida instrumental se encuentran: exactitud, precisión, sensibilidad, límite de detección y rango de linealidad.

La sensibilidad de un instrumento o de un método mide la capacidad de este para diferenciar pequeñas variaciones de concentración del analito.

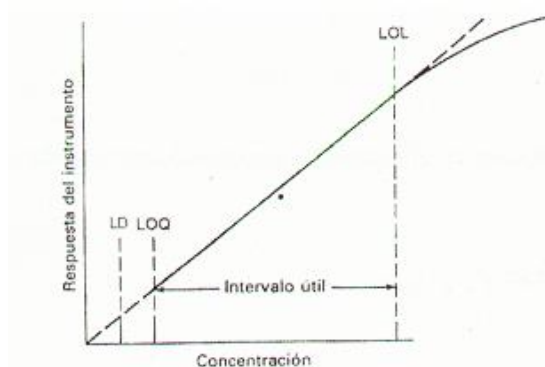
La sensibilidad de calibración indica la variación de la respuesta instrumental en función de la concentración de analito y se corresponde con la pendiente de la curva de calibración.

La sensibilidad analítica (γ) depende de la respuesta instrumental y de la reproducibilidad o precisión del sistema de medida y se calcula como el producto de la pendiente de la curva de calibración por la desviación estándar de las medidas individuales ($\gamma = s \cdot m$)

El límite de detección es la concentración o el peso mínimo de analito que pueden detectarse para un nivel de confianza dado. Este límite depende de la relación entre la magnitud de la señal analítica y el valor de las fluctuaciones de la señal del blanco. La mínima señal analítica distinguible se toma por tanto como la suma de la señal media del blanco más un múltiplo de la desviación estándar del mismo (generalmente tres veces la desviación estándar del blanco).

El límite de cuantificación es la concentración más pequeña con la que puede medirse con exactitud y precisión aceptables. Se puede aproximar a la relación entre la precisión de la medida analítica y la sensibilidad del método.

En la figura adjunta se aprecia el intervalo útil (rango de linealidad) de un método analítico, representado como la porción de la recta comprendida entre LOQ (límite de cuantificación) y LOL (límite de respuesta lineal), LD es el límite de detección.



CRITERIO	PARÁMETRO DE CALIDAD
1.- Precisión	Desviación estándar absoluta, desviación estándar relativa, coeficiente de variación, varianza.
2.- Exactitud	Error absoluto sistemático, error relativo sistemático.
3.- Sensibilidad	Sensibilidad de calibración, sensibilidad analítica.
4.- Límite de detección	Blanco más tres veces la desviación estándar del blanco.
5.- Intervalo de concentración	Concentración entre el límite de cuantificación (LOQ) y el límite de linealidad (LOL).
6.- Selectividad	Coefficiente de selectividad.

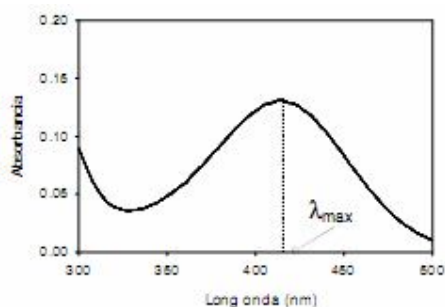
ANEXO 3

ESPECTRO DE ABSORCIÓN MOLECULAR VISIBLE

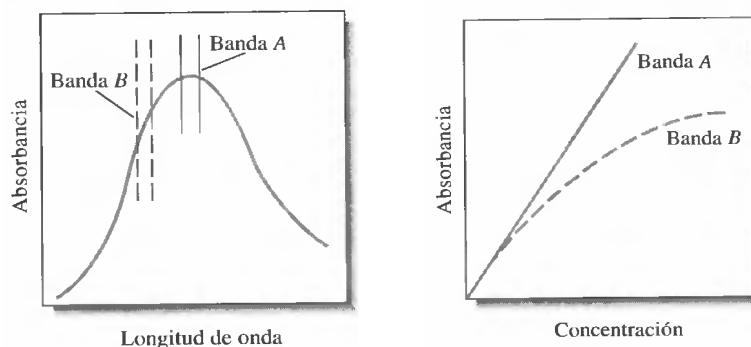
Los métodos espectroscópicos de análisis se basan en la medida de la radiación electromagnética emitida o absorbida por la materia y se clasifican según la zona del espectro electromagnético que esté implicada. En química Analítica las zonas más importantes son: ultravioleta, visible, infrarroja y microondas⁹.

Los métodos de absorción, están basados en la atenuación de la potencia de la radiación electromagnética como consecuencia de la absorción que se produce en su interacción con el analito. Se denomina absorción al proceso por el cual una especie, en un medio transparente, capta selectivamente ciertas frecuencias de la radiación electromagnética.

Tanto las moléculas como los átomos tienen un número limitado de niveles o estados energéticos cuantizados. Para que se produzca absorción de radiación, la energía del fotón excitante (incidente) debe igualar a la diferencia de energía entre el estado fundamental y uno de los estados excitados de la especie absorbente. Estas diferencias de energía (ΔE) son únicas, por lo tanto permiten caracterizar los constituyentes de una muestra. Para este propósito se obtiene experimentalmente una representación gráfica de la variación de la absorbancia en función de la longitud de onda tal como se muestra en la siguiente figura



El espectro de absorción permite determinar la longitud de onda de máxima absorbancia ($\lambda_{\text{máx.}}$) en las condiciones de medida. Esta longitud de onda es la que se recomienda emplear para las medidas del problema y patrones puesto que en esta condición la absorptividad puede considerarse aproximadamente constante y se evitan desviaciones instrumentales de la Ley de Beer¹⁰ por el empleo de radiación policromática.



⁹ Para el tratamiento previo de la muestra

¹⁰ La ley de Beer es una ley límite que solo se verifica para radiación monocromática (a constante para un sistema espectrofotométrico particular)

ANEXO 4

FUNDAMENTALES DE LA ABSORCIÓN DE RADIACIÓN ELECTROMAGNÉTICA

Ley de Lambert: cuando un haz de luz atraviesa un medio absorbente de concentración constante, la cantidad de energía luminosa absorbida por el medio varía en forma directamente proporcional a la distancia recorrida (b) o camino óptico que se corresponde con el ancho de la celda de absorción.

$$\text{Energía absorbida} \propto b$$

Ley de Beer: cuando un haz de luz atraviesa un medio absorbente de espesor constante, la cantidad de energía luminosa absorbida por el medio varía en forma directamente proporcional a la concentración del absorbente en el medio

$$\text{Energía absorbida} \propto C$$

Transmitancia es la fracción de radiación incidente transmitida por la solución, por lo general la transmitancia se expresa en porcentaje. Esta definida por la ecuación:

$$T = P / P_0 \quad \%T = T * 100$$

Absorbancia: Es la medida de la energía radiante que es absorbida por un material o una superficie como función de la longitud de onda de dicha energía. A diferencia de la transmitancia, la absorbancia de una solución que aumenta la atenuación del haz esta definida por la ecuación:

$$A = \text{Log } P_0 / P \quad A = \text{Log } 1/T$$

La absorbancia es directamente proporcional a la trayectoria de la radiación a través de la solución y a la concentración de la especie absorbente. Esta definida por la ecuación:

$$A = a b C$$

Donde:

a: es una constante de proporcionalidad llamada absorptividad. Esta es una propiedad característica de la especie absorbente y, principalmente, es función de la temperatura y la longitud de onda. Cuando se expresa la concentración en mol / litro y la trayectoria a través de la celda en cm., la absorptividad se denomina absorptividad molar y se representa con el símbolo "ε".

La Ley de Beer es aditiva, por tanto, para un sistema que contenga más de una especie absorbente se verifica que:

$$A = A_1 + A_2 + \dots + A_n$$

$$A = \xi_1 b c_1 + \xi_2 b c_2 + \dots + \xi_n b c_n$$

Frecuentemente se observan desviaciones de la proporcionalidad entre A y C (cuando b es constante). Algunas de estas desviaciones son importantes y representan limitaciones reales de la ley de Beer. La Ley de Beer es sólo aplicable a soluciones en las que las interacciones dependientes de la concentración de las moléculas o iones son mínimas. Concentraciones "altas" alteran las absorptividades molares y por lo tanto conducen a una relación no lineal entre A y C. La Ley de Beer es un ejemplo de ley límite y solo se verifica cuando la radiación incidente es *monocromática*. Dependiendo de las características del sistema óptico del instrumento (ancho de rendija) dependerá la posibilidad de aislar una banda estrecha de longitudes de onda que pueda aproximarse a radiación de una única longitud de onda.

ANEXO 5

MEDIDAS DE SEGURIDAD

Ácido Ascórbico

R: No presenta.

S: No presenta.

Ácido Sulfúrico cc. (95-98%)



R35: Provoca quemaduras graves.

S26: En caso de contacto con los ojos, lávense inmediata y abundantemente con agua y acúdase a un médico.

S30: No echar jamás agua a este producto.

S45: En caso de accidente o malestar, acúdase inmediatamente al médico (si es posible, muéstresele la etiqueta).

Ácido Clorhídrico cc. (>37%)



R34: Provoca quemaduras.

R37: Irrita las vías respiratorias.

S26: En caso de contacto con los ojos, lávense inmediata y abundantemente con agua y acúdase a un médico.

S36/37/39: Úsese indumentaria y guantes adecuados y protección para los ojos/la cara.

S45: En caso de accidente o malestar, acúdase inmediatamente al médico (si es posible, muéstresele la etiqueta).

Ácido Clorhídrico diluido



R36/38: Irrita los ojos y la piel.

S26: En caso de contacto con los ojos, lávense inmediata y abundantemente con agua y acúdase a un médico

S36: Úsese indumentaria protectora adecuada.

Fenoltaleína Indicador (2%)



R11: Fácilmente inflamable

R40: Posibles efectos cancerígenos.

S7: Manténgase el recipiente bien cerrado.

S16: Conservar alejado de toda llama o fuente de chispas – No fumar

Hidrógeno Ftalato de Potasio

R: No presenta.

S: No presenta.

Fosfato Diácido de Potasio

R: No presenta.

S: No presenta

Molibdato de Amonio

R: No presenta.

S: No presenta

Hidróxido de Sodio



Corrosivo
Corrosive
Corrosif **C**

R35: Provoca quemaduras graves.

S26: En caso de contacto con los ojos, lávense inmediata y abundantemente con agua y acúdase a un médico

S37/39: Úsese guantes adecuados y protección para los ojos/cara.

S45: En caso de accidente o malestar, acúdase inmediatamente al médico (si es posible, muéstresele la etiqueta).

Hidróxido de Sodio (0,1 M)



Irritante
Irritant
Irritant **Xi**

R36/38: Irrita los ojos y la piel.

S26: En caso de contacto con los ojos, lávense inmediata y abundantemente con agua y acúdase a un médico.

Tartrato de Antimonio y Potasio

R20/22: Nocivo por inhalación y por ingestión.



Nocivo
Harmful
Nocif **Xn**



Peligroso
para el
medio ambiente **N**

R51/53: Tóxico para los organismos acuáticos, puede provocar a largo plazo efectos negativos en el medio ambiente acuático.

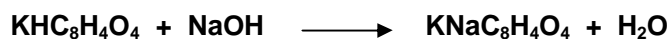
S61: Evítese su liberación al medio ambiente. Recábense instrucciones específicas de la ficha de datos de seguridad.

ANEXO 6

ESTANDARIZACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE NaOH 0,1 M

Cálculo Previo

Para el cálculo de la toma en masa del hidrógeno ftalato de potasio para la estandarización del NaOH 0,1 M, se tiene en cuenta la relación estequiométrica en la reacción entre el patrón primario y la base:



$$n_{\text{KHF}} = n_{\text{NaOH}}$$

siendo

- n_{KHF} : moles de hidrógeno ftalato de potasio
- n_{NaOH} : moles de NaOH

$$m_{\text{KHF}} / \text{MM}_{\text{KHF}} = M_{\text{NaOH}} \times V_{\text{NaOH}}$$

$$m_{\text{KHF}} = \text{MM}_{\text{KHF}} \times M_{\text{NaOH}} \times V_{\text{NaOH}}$$

siendo

- m_{KHF} : masa de hidrógeno ftalato de potasio, expresado en g
- MM_{KHF} : masa molar del hidrógeno ftalato de potasio, 204 g/mol
- M_{NaOH} : molaridad de la solución de NaOH, 0,1 mol/L
- V_{NaOH} : gasto de la solución de NaOH, $10 \cdot 10^{-3}$ L

$$m_{\text{KHF}} = 0,2 \text{ g}$$

Procedimiento

1. Masar individualmente muestras de 0,2 a 0,3g con exactitud a la décima de miligramo de hidrógeno ftalato de potasio en matraces erlenmeyer de 250 mL y disolver en 50 a 75 mL de agua destilada.
2. Añadir 2 gotas de fenofaleína, valorar la base hasta que el color rosa del indicador persista durante 30 seg.

Cálculos

La concentración de la base se calcula teniendo en cuenta la siguiente expresión:

$$M_{\text{NaOH}} = m_{\text{KHF}} / (\text{MM}_{\text{KHF}} \times V_{\text{NaOH}})$$

siendo

- M_{NaOH} : concentración de la solución de NaOH, expresada en mol/L
- m_{KHF} : masa de hidrógeno ftalato de potasio, expresado en g
- MM_{KHF} : masa molar del hidrógeno ftalato de potasio, 204 g/mol
- V_{NaOH} : gasto de la solución de NaOH, expresado en L

La incertidumbre asociada a la concentración de la solución stock, se calcula según:

$$\Delta M_{\text{NaOH}} = M_{\text{NaOH}} \times [(\Delta m_{\text{KHF}} / m_{\text{KHF}}) + (\Delta V_{\text{NaOH}} / V_{\text{NaOH}})]$$

siendo

- ΔM_{NaOH} : incertidumbre en la molaridad de la solución de NaOH, expresada en mol/L
- M_{NaOH} : molaridad de la solución de NaOH, expresada en mol/L
- Δm_{KHF} : incertidumbre en la masa de hidrógeno ftalato de potasio, $\pm 2 \cdot 10^{-4}$ g
- m_{KHF} : masa de hidrógeno ftalato de potasio, expresado en g
- ΔV_{NaOH} : incertidumbre en el gasto de la solución de NaOH, $\pm 0,01$ mL
- V_{NaOH} : gasto de la solución de NaOH, expresado en L

Datos experimentales

Ensayos	m_{KHF} (g) ($\pm 2 \cdot 10^{-4}$) g	V_{NaOH} (mL) ($\pm 0,01$) mL
1	0,1993	9,41
2	0,1992	9,39
3	0,1997	9,42

Resultados

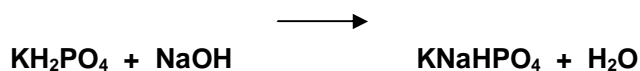
Ensayos	M_{NaOH} (mol/L)	ΔM_{NaOH} (mol/L)
1	0,1038	0,0002
2	0,1040	0,0002
3	0,1039	0,0002

$$M_{\text{NaOH}} = (0,1039 \pm 0,0002) \text{ mol/L}$$

ANEXO 7

DETERMINACIÓN DE LA PUREZA DEL KH_2PO_4

Para el cálculo de la toma en masa del KH_2PO_4 para la determinación de la pureza, se tiene en cuenta la relación estequiométrica en la reacción entre KH_2PO_4 y la base:



$$n_{\text{KH}_2\text{PO}_4} = n_{\text{NaOH}}$$

siendo

- $n_{\text{KH}_2\text{PO}_4}$: mol de fosfato diácido de potasio
- n_{NaOH} : mol de NaOH

$$m_{\text{KH}_2\text{PO}_4} / \text{MM}_{\text{KH}_2\text{PO}_4} = M_{\text{NaOH}} \times V_{\text{NaOH}}$$

$$m_{\text{KH}_2\text{PO}_4} = \text{MM}_{\text{KH}_2\text{PO}_4} \times M_{\text{NaOH}} \times V_{\text{NaOH}}$$

siendo

- $m_{\text{KH}_2\text{PO}_4}$: masa de KH_2PO_4 , expresada en g
- $\text{MM}_{\text{KH}_2\text{PO}_4}$: masa molar del KH_2PO_4 , 136 g/mol
- M_{NaOH} : molaridad de la solución de NaOH, $(0,1039 \pm 0,0002)$ mol/L
- V_{NaOH} : gasto de la solución de NaOH, $15 \cdot 10^{-3}$ L

$$m_{\text{KH}_2\text{PO}_4} = 0,2 \text{ g}$$

Procedimiento

1. Masar individualmente muestras de 0,2 a 0,3 g con exactitud a la décima de miligramo de fosfato diácido de potasio en matraces erlenmeyer de 250 mL y disolver en 50 a 75 mL de agua destilada.
2. Añadir 2 gotas de fenoftaleína, valorar hasta que el color rosa del indicador persista durante 30 seg.

Cálculos

$$\% P_{\text{KH}_2\text{PO}_4} = (m_{\text{KH}_2\text{PO}_4} / m_{\text{MUESTRA}}) \times 100$$

siendo

- $\% P_{\text{KH}_2\text{PO}_4}$: porcentaje de pureza del KH_2PO_4
- $m_{\text{KH}_2\text{PO}_4}$: masa de KH_2PO_4 calculada en la valoración con NaOH, expresado en g
- m_{MUESTRA} : masa de la muestra de KH_2PO_4 , expresada en g

$$m_{\text{KH}_2\text{PO}_4} \times (\% \text{ P} / 100) = \text{MM}_{\text{KH}_2\text{PO}_4} \times M_{\text{NaOH}} \times V_{\text{NaOH}}$$

$$\% \text{ P}_{\text{KH}_2\text{PO}_4} = [(M_{\text{NaOH}} \times V_{\text{NaOH}} \times \text{MM}_{\text{KH}_2\text{PO}_4}) / m_{\text{KH}_2\text{PO}_4}] \times 100$$

siendo

- % P: porcentaje de pureza del KH_2PO_4
- M_{NaOH} : molaridad de la solución de NaOH, $(0,1039 \pm 0,0002)$ mol/L
- V_{NaOH} : volumen de de la solución de NaOH, expresado en L
- $\text{MM}_{\text{KH}_2\text{PO}_4}$: masa molar del KH_2PO_4 , 136 g/mol
- $m_{\text{KH}_2\text{PO}_4}$: masa de la muestra de KH_2PO_4 , expresado en g

Datos experimentales

$$M_{\text{NaOH}} = (0,1039 \pm 0,0002) \text{ mol/L}$$

Ensayos	$m_{\text{KH}_2\text{PO}_4}$ (g) ($\pm 2 \cdot 10^{-4}$) g	V_{NaOH} (mL) ($\pm 0,01$) mL
1	0,2515	17,48
2	0,2512	17,46
3	0,2505	17,47

Resultados

Ensayos	% $\text{P}_{\text{KH}_2\text{PO}_4}$	Δ % $\text{P}_{\text{KH}_2\text{PO}_4}$
1	98,21	0,04
2	98,19	0,04
3	98,20	0,04

$$\% \text{ P}_{\text{KH}_2\text{PO}_4} = (98,20 \pm 0,04) \%$$

ANEXO 8

PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN STOCK DE KH_2PO_4 50 ppm

Procedimiento

1. Masar cerca de 0,2 g, con exactitud a la décima de miligramo, de fosfato diácido de potasio.
2. Trasvasar cuantitativamente a un matraz aforado de 1,0 L.
3. Añadir cierta cantidad de agua destilada para disolver la sal y agitar.
4. Enrasar con agua destilada y homogeneizar.

Cálculos

La concentración de la solución stock en ppm, se calcula considerando:

$$C_{\text{STOCK}} = (m_{\text{KH}_2\text{PO}_4} / V_M) \times (MM_P / MM_{\text{KH}_2\text{PO}_4}) \times (\%P_{\text{KH}_2\text{PO}_4} / 100)$$

siendo

- C_{STOCK} : concentración de la solución stock de KH_2PO_4 , expresada en ppm de P
- $m_{\text{KH}_2\text{PO}_4}$: masa de KH_2PO_4 , expresada en mg
- V_M : volumen del matraz utilizado, 1,0 L
- MM_P : masa molar del P, 31 g/mol
- MM_S : masa molar del KH_2PO_4 , 136 g/mol
- $\% P_{\text{KH}_2\text{PO}_4}$: porcentaje de pureza del KH_2PO_4 , expresado en %

La incertidumbre asociada a la concentración de la solución stock, se calcula según:

$$\Delta C_{\text{STOCK}} = C_{\text{STOCK}} \times [(\Delta m_{\text{KH}_2\text{PO}_4} / m_{\text{KH}_2\text{PO}_4}) + (\Delta V_M / V_M) + (\Delta \%P_{\text{KH}_2\text{PO}_4} / \%P_{\text{KH}_2\text{PO}_4})]$$

siendo

- ΔC_{STOCK} : incertidumbre en la concentración de la solución stock de KH_2PO_4 , expresada en ppm
- $\Delta m_{\text{KH}_2\text{PO}_4}$: incertidumbre en la masa de KH_2PO_4 , $\pm 2 \cdot 10^{-4}$ g
- ΔV_M : incertidumbre en el volumen del matraz utilizado, $\pm 0,8$ mL
- $\Delta \%P_{\text{KH}_2\text{PO}_4}$: incertidumbre en la pureza del KH_2PO_4 , $\pm 0,04$ %

Datos experimentales

$$m_{\text{KH}_2\text{PO}_4} = (252,8 \pm 0,2) \text{ mg}$$

$$\% P_{\text{KH}_2\text{PO}_4} = (98,20 \pm 0,04) \%$$

Resultados

$$C_{\text{STOCK}} = (56,50 \pm 0,08) \text{ ppm}$$