

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



FACULTAD DE QUÍMICA

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología

**DETERMINACIÓN DIRECTA DE METALES EN
ALIMENTOS SÓLIDOS: DISEÑO Y DESARROLLO DE
SISTEMAS CONTINUOS DE EXTRACCIÓN/DISOLUCIÓN
ACOPLADOS A LA ESPECTROMETRÍA DE
ABSORCIÓN ATÓMICA CON LLAMA**

AMADA MORENO-CID BARINAGA

Memoria para optar al grado de Doctora en Química

Santiago de Compostela, Abril de 2005

Pilar Bermejo Barrera, Catedrática de Universidad y Directora del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Santiago de Compostela

INFORMA:

Que la Licenciada Dña. **Amada Moreno-Cid Barinaga** ha realizado en este Departamento, bajo la dirección de la Dra. M^a del Carmen Yebra Biurrun, Profesora Titular de Universidad, el trabajo titulado: "**Determinación directa de metales en alimentos sólidos: diseño y desarrollo de sistemas continuos de extracción/disolución acoplados a la espectrometría de absorción atómica con llama**", que presenta para optar al grado de Doctora en Química.

Y para que así conste, firmo el presente informe en Santiago de Compostela, abril de 2005.

M^a del Carmen Yebra Biurrun, Profesora Titular de Universidad del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Santiago de Compostela

AUTORIZA:

A la Licenciada Dña. **Amada Moreno-Cid Barinaga**, la presentación de la memoria del trabajo titulado: **“Determinación directa de metales en alimentos sólidos: diseño y desarrollo de sistemas continuos de extracción/disolución acoplados a la espectrometría de absorción atómica con llama”**, que ha realizado bajo su dirección en el Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Facultad de Química, para optar al grado de Doctora en Química.

Y para que así conste, firmo el presente informe en Santiago de Compostela, abril de 2005

Amada Moreno-Cid Barinaga

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento:

- Al Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología por poner a mi alcance todos los medios necesarios para la realización de este trabajo.
- A la Dra. M^a Carmen Yebra, directora de este trabajo, por su gran ayuda en el ámbito de trabajo y por su amistad.
- A la Dra. M^a Herminia Bollaín, por su gran ayuda incondicional a lo largo de estos años.
- Al Departamento de Química de la Universidad de Ferrara, y en especial, al Dr. Francesco Dondi, Prof. Gabriella Blo y Prof. Alberto Cavazzini por su hospitalidad, su dedicación y por darme la oportunidad de aprender tantas cosas.
- A Sheila Cancela, por todas esas horas de desahogo químico en los peores momentos.
- A Rosa Cespón, por su interés y compañerismo en la realización de este trabajo.
- A la Paola, Andrea, Giulia, Sara, Alberto... por acogerme como si fuese de la familia.
- A mis amigas de "toda la vida" por que siempre están ahí.
- A todas las personas que directamente o indirectamente han contribuido en la realización de este trabajo.
- A la familia de Chris, por su acogimiento, ayuda y comprensión.
- A Chris, por soportarme con toda la paciencia del mundo y demostrarme que todo lo que uno quiere en la vida se consigue.
- A mis padres, mi hermano, mi cuñada y mi abuela,... por todo, ya que al fin y al cabo todo lo que hago es con su ayuda y apoyo.
- Y en especial a mi abuelo, al que le hubiese llenado de felicidad poder presenciar este momento y que, supongo que de algún modo lo hará.

A mi familia, a Chris y a M. Carmen.

ÍNDICE

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

1. METALES.....	1
1.1 Metales en alimentos.....	1
1.2 El papel de los metales en los humanos.....	3
1.3 Propiedades físicas y químicas de los metales. Funcionalidad y toxicidad para el hombre.....	6
1.3.1 Calcio.....	6
1.3.2 Cinc.....	10
1.3.3 Cobre.....	14
1.3.4 Hierro.....	17
1.3.5 Magnesio.....	21
1.3.6 Manganeso.....	25
2. MÉTODOS DE PREPARACIÓN DE MUESTRAS SÓLIDAS.....	29
2.1 Tratamiento de la muestra sólida utilizando calentamiento convencional: digestión húmeda.....	31
2.2 Calcinación.....	33
2.2.1 Combustión en una corriente de aire.....	34
2.2.2 Combustión en presencia de oxígeno.....	35
2.2.3 Combustión con oxígeno activado por un campo de frecuencia magnético de alta frecuencia (plasma frío).....	35
2.2.4 Fusión.....	36
2.3 Tratamiento de la muestra sólida utilizando la energía de microondas	36
2.4 Tratamiento de la muestra sólida utilizando la energía de ultrasonidos	39
2.5 Tratamiento de la muestra sólida sin utilizar energía.....	42
2.5.1 Extracción con fluidos supercríticos.....	42

3. DETERMINACIÓN DE METALES.....	45
4. INTRODUCCIÓN DIRECTA DE LA MUESTRA SÓLIDA EN LAS TÉCNICAS DE ABSORCIÓN ATÓMICA	49
5. ANÁLISIS POR INYECCIÓN EN FLUJO.....	51
5.1 Componentes del sistema FIA.....	52
5.2 Métodos continuos de preparación de muestras sólidas.....	54
5.2.1 Tratamiento de la muestra en línea utilizando energía de microondas.....	55
5.2.2 Tratamiento de la muestra en línea utilizando energía de ultrasonidos.....	57
5.3 Acoplamiento FIA-AAS.....	61
6. TÉCNICAS DE OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO ANALÍTICO:	
DISEÑOS EXPERIMENTALES	63
6.1 Introducción.....	63
6.2 Métodos de optimización.....	63
6.3 Diseño factorial.....	64
6.3.1 Diseños factoriales de Screening. Diseños de Plackett-Burman	67

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	69

PARTE EXPERIMENTAL

1.DESCRIPCIÓN DE LOS SISTEMAS DE FLUJO CONTINUO PARA LOS PROCESOS DE EXTRACCIÓN DE LOS METALES DE LAS MUESTRAS SÓLIDAS Y DISOLUCIÓN DE LA MUESTRA ASISTIDOS POR ENERGÍA DE ULTRASONIDOS.....	75
1.1 Instrumentación y reactivos.....	78
1.2 Preparación de las muestras.....	79
1.3 Procedimiento.....	80
2. CURVAS DE CALIBRADO. DISPERSIÓN Y PRECISIÓN DEL SISTEMA FIA.....	87
2.1 Calcio.....	91

2.2 Cinc.....	92
2.3 Cobre.....	93
2.4 Hierro.....	94
2.5 Magnesio.....	95
2.6 Manganeseo.....	96
3. CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DEL SISTEMA FIA RELATIVAS AL CALIBRADO.....	97
3.1 Límite de detección.....	97
3.2 Límite de cuantificación.....	98
3.3 Sensibilidad.....	98
3.4 Intervalo lineal.....	98
4.OPTIMIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS QUE AFECTAN A LA EXTRACCIÓN DE LOS METALES DE LAS MUESTRAS SÓLIDAS/DISOLUCIÓN DE LA MUESTRA SÓLIDA EN LOS SISTEMAS FIA.....	101
4.1 Optimización de los parámetros que afectan a la extracción de los metales de las muestras sólidas de naturaleza alimenticia utilizando el sistema continuo de extracción asistida por ultrasonidos (CUES).....	106
4.1.1 Extracción de calcio.....	106
4.1.1.1 Estudio de la cantidad de muestra.....	138
4.1.1.2 Estudio de la influencia del tamaño de partícula de la muestra.....	139
4.1.2 Extracción de cinc.....	141
4.1.2.1 Estudio de la cantidad de muestra.....	164
4.1.2.2 Estudio de la influencia del tamaño de partícula de la muestra.....	165
4.1.3 Extracción de cobre.....	167
4.1.3.1 Estudio de la cantidad de muestra.....	191
4.1.3.2 Estudio de la influencia del tamaño de partícula de la muestra.....	192
4.1.4 Extracción de hierro.....	194
4.1.4.1 Estudio de la cantidad de muestra.....	218
4.1.4.2 Estudio de la influencia del tamaño de partícula de la muestra.....	219
4.1.5 Extracción de magnesio.....	222

4.1.5.1 Estudio de la cantidad de muestra	249
4.1.5.2 Estudio de la influencia del tamaño de partícula de la muestra	249
4.1.6 Extracción de manganeso.....	252
4.1.6.1 Estudio de la cantidad de muestra	275
4.1.6.2 Estudio de la influencia del tamaño de partícula de la muestra	276
4.2 Optimización de los parámetros que afectan a la disolución de la muestra sólida de naturaleza alimenticia utilizando el sistema continuo de disolución asistida por ultrasonidos (CUDS).....	278
4.2.1 Disolución de las muestras de leche en polvo y fórmulas infantiles.....	278
4.2.1.1 Estudio de la cantidad de muestra	301
4.2.1.2 Estudio de la influencia del tamaño de partícula de la muestra	303
4.3 Optimización de los parámetros FIA de los sistemas de extracción/disolución (CUES/CUDS).....	304
4.3.1 Optimización de los parámetros FIA del CUES	304
4.3.2 Optimización de los parámetros FIA del CUDS.....	307
5. CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DE LAS METODOLOGÍAS PROPUESTAS PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS METALES DE LAS MUESTRAS SÓLIDAS DE NATURALEZA ALIMENTICIA.....	311
5.1 Características analíticas de las metodologías propuestas que utilizan el CUES.....	311
5.1.1 Determinación de calcio en las diferentes muestras sólidas de naturaleza alimenticia.....	311
5.1.1.1 Precisión	312
5.1.1.2 Exactitud.....	313
5.1.1.2.1 Recuperación de las metodologías propuestas	313
5.1.1.2.2 Análisis de materiales de referencia	316
5.1.1.3 Frecuencia de muestreo.....	316
5.1.2 Determinación de cinc en las diferentes muestras sólidas de naturaleza alimenticia.....	317
5.1.2.1 Precisión.....	318

5.1.2.2 Exactitud	319
5.1.2.2.1 Recuperación de las metodologías propuestas	319
5.1.2.2.2 Análisis de materiales de referencia	321
5.1.2.3 Frecuencia de muestreo.....	322
5.1.3 Determinación de cobre en las diferentes muestras sólidas de naturaleza alimenticia.....	323
5.1.3.1 Precisión.....	323
5.1.3.2 Exactitud.....	324
5.1.3.2.1 Recuperación de las metodologías propuestas	325
5.1.3.2.2 Análisis de materiales de referencia	326
5.1.3.3 Frecuencia de muestreo.....	327
5.1.4 Determinación de hierro en las diferentes muestras sólidas de naturaleza alimenticia.....	328
5.1.4.1 Precisión.....	329
5.1.4.2 Exactitud.....	330
5.1.4.2.1 Recuperación de las metodologías propuestas	330
5.1.4.2.2 Análisis de materiales de referencia	333
5.1.4.3 Frecuencia de muestreo.....	333
5.1.5 Determinación de magnesio en las diferentes muestras sólidas de naturaleza alimenticia.....	334
5.1.5.1 Precisión.....	335
5.1.5.2 Exactitud.....	336
5.1.5.2.1 Recuperación de las metodologías propuestas	336
5.1.5.2.2 Análisis de materiales de referencia	339
5.1.5.3 Frecuencia de muestreo.....	339
5.1.6 Determinación de manganeso en las diferentes muestras sólidas de naturaleza alimenticia.....	340
5.1.6.1 Precisión.....	341
5.1.6.2 Exactitud.....	342
5.1.6.2.1 Recuperación de las metodologías propuestas	342
5.1.6.2.2 Análisis de materiales de referencia	345
5.1.6.3 Frecuencia de muestreo.....	346
5.2 Características analíticas de los metodologías propuestas que utilizan el CUDS.....	347
5.2.1 Determinación de calcio, cinc, cobre, hierro y magnesio en las muestras de leche en polvo y fórmulas infantiles.....	347

5.2.1.1 Precisión.....	347
5.2.1.2 Exactitud.....	348
5.2.1.2.1 Recuperación de las metodologías propuestas.....	348
5.2.1.2.2 Análisis de materiales de referencia	350
5.2.1.3 Frecuencia de muestreo.....	352
6. APLICACIÓN DE LAS METODOLOGÍAS PROPUESTAS: Análisis de muestras reales de los diferentes tipos de matrices alimenticias estudiadas aplicando los sistemas FIA propuestos.....	353
6.1 Aplicación del sistema continuo CUES/FAAS para la extracción y determinación de los metales en diferentes muestras sólidas reales de naturaleza alimenticia.....	354
6.1.1 Extracción y determinación de calcio.....	354
6.1.2 Extracción y determinación de cinc	366
6.1.3 Extracción y determinación de cobre.....	378
6.1.4 Extracción y determinación de hierro.....	390
6.1.5 Extracción y determinación de magnesio.....	402
6.1.6 Extracción y determinación de manganeso.....	414
6.2 Aplicación del sistema continuo CUDS/FAAS para la disolución de la muestra y determinación de los metales en muestras de leche en polvo y fórmulas infantiles.....	426
6.2.1 Disolución de la muestra y determinación de calcio y magnesio.....	426
6.2.2 Disolución de la muestra y determinación de cinc, cobre y hierro.....	428
7. ESTUDIO ESTADÍSTICO DE LOS PROCESOS DE EXTRACCIÓN PARA LOS METALES ESTUDIADOS EN LAS DIFERENTES MATRICES SÓLIDAS DE NATURALEZA ALIMENTICIA.....	431
<u>CONCLUSIONES</u>	
CONCLUSIONES.....	455

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA.....	461

ANEXO: Trabajos publicados

INTRODUCCIÓN

1. LOS METALES

1.1 Metales en alimentos

La determinación de metales en alimentos ha cobrado un gran interés. Esto se debe fundamentalmente a que la principal fuente de exposición del hombre a los metales en circunstancias normales es a través de la ingesta. El interés de este tipo de análisis tiene dos vertientes principales, la nutricional y la toxicológica. Desde el punto de vista nutricional, es necesario conocer aquellos elementos que son indispensables para la salud humana y, desde el punto de vista toxicológico determinar aquellos que van en detrimento de la misma. Aunque no sólo es necesario conocer qué tipo de metales son beneficiosos o perjudiciales para la salud humana, sino también conocer en qué concentración un determinado metal es beneficioso o perjudicial para la misma [1-2].

La concentración en la que se encuentran presentes los metales en los alimentos, ya sean de origen animal o vegetal, depende de muchos factores, que abarcan desde las condiciones medioambientales, hasta los métodos de producción y procesado [3]. En los alimentos de origen vegetal las concentraciones metálicas presentes están condicionadas por la naturaleza del suelo, los fertilizantes, los insecticidas, los pesticidas, etc. En el caso de los productos animales la concentración de los metales presentes está directamente relacionada con la propia alimentación de los mismos y del medio que los rodea, siendo este último especialmente importante en el caso de las especies acuáticas. Así, por ejemplo, la concentración de níquel en carne puede variar desde 0 hasta 4,5 mg/Kg, y la concentración de cinc en ostras desde 1 hasta 1000 mg/Kg [4]. Además, la concentración metálica de los alimentos está relacionada con la preparación, almacenamiento, etc. La preparación de los alimentos puede disminuir el contenido metálico de la

misma, por ejemplo, en la eliminación de la piel o capas externas, o lavado que puede eliminar los constituyentes solubles. Así, el refinado o tamizado de los cereales, que se lleva a cabo durante la molienda, afecta a la concentración de los metales presentes. Cuando el trigo es convertido en harina, la concentración de hierro se reduce casi al 76%, la de manganeso al 86% y la de cobalto al 89%. También hay que tener en cuenta que dentro de una misma clase de alimento, hay diferencias considerables en cuanto a concentración metálica se refiere. Incluso considerando una sola muestra de alimento, la concentración del metal no se encuentra uniformemente distribuida ya que se pueden encontrar diferencias importantes según las partes de la muestra. Por ejemplo, mientras una semilla de trigo contiene una concentración de cobre de 7,4 mg/Kg, su endospermo puede tener una concentración menor que 2,0 mg/Kg [5].

En el procesado también hay que asegurarse de que los alimentos no contengan metales que puedan deteriorar la calidad del mismo. Además, hay que eliminar la posibilidad de que el alimento contenga metales de fuentes no alimenticias como pueden ser los envases, o trazas metálicas que puedan afectar a su color, sabor o a cualquier característica propia del alimento. Los metales pueden causar diversos cambios de color durante su cocinado y/o almacenamiento. Incluso a niveles de mg/Kg, se pueden formar complejos entre los iones metálicos y compuestos orgánicos causando el desarrollo de diferentes colores, que a veces no son deseables. El cobre forma un complejo con la clorofila que da lugar a un atractivo color verde brillante a los vegetales. Por otra parte, también el cobre, a muy bajas concentraciones, puede dar lugar a un ennegrecimiento de las cerezas, incluso volviéndolas de color totalmente negro, formando un complejo organometálico en las mismas. El hierro a concentraciones traza también puede ser responsable de cambios de color en los alimentos. Este metal reacciona con las antocianinas en algunas frutas dando lugar a un pigmento de color negro. Además, proporciona un color verde-gris a la nata y produce un efecto similar en los alimentos que contienen chocolate. El aluminio y el estaño también producen un ennegrecimiento de los colores de los alimentos [6].

El sabor de un producto alimenticio también puede deteriorarse por la presencia de un metal contaminante, debido por ejemplo a la corrosión de los envases. Los productos de corrosión del acero, especialmente sales de hierro, dan lugar a la pérdida del olor del alimento, así como el desarrollo de gustos astringentes, metálicos y amargos. La leche desarrolla en particular un sabor nauseabundo en estas condiciones [7].

Otro efecto de la contaminación de los alimentos por metales, y que causa pérdidas considerables de tiempo en su procesado, es el enranciamiento de las grasas. Trazas de cobre, hierro y algunos otros metales pueden actuar como catalizadores en la oxidación de dobles enlaces en los ácidos grasos insaturados de los aceites y las grasas. El resultado es un deterioro rápido de los alimentos que contienen estos aceites y grasas.

1.2 El papel de los metales en los humanos

Entre los muchos metales que se encuentran en el cuerpo humano, se cree que sólo tienen interés un pequeño número para el correcto funcionamiento del metabolismo humano. Si un elemento es interesante o no para la vida depende de su participación en las reacciones bioquímicas del metabolismo humano. La deficiencia de cualquiera de estos metales esenciales para el funcionamiento del organismo humano puede dar lugar a lesiones bioquímicas específicas en las células del cuerpo y el desarrollo de síntomas clínicos específicos. Estos síntomas suelen responder cuando la deficiencia es corregida con un adecuado aporte del elemento carente.

Los metales con interés nutricional se dividen tradicionalmente en dos clases en función de la cantidad del mismo necesaria para el funcionamiento normal del metabolismo humano [1-2]. Como se muestra en la Tabla 1 el calcio, potasio, sodio y magnesio se clasifican como macronutrientes y los restantes como micronutrientes.

Tabla 1. Contenido en metales del cuerpo humano

Elemento	Porcentaje del peso corporal	Cantidad (g)
Macronutrientes		
Calcio (Ca)	1,5	1200
Potasio (K)	0,35	270
Sodio (Na)	0,15	140
Magnesio (Mg)	0,05	25
Micronutrientes		
Hierro (Fe)	$5,6 \times 10^{-3}$	4,5
Cinc (Zn)	$2,4 \times 10^{-3}$	1,9
Cobre (Cu)	$1,0 \times 10^{-3}$	8×10^{-2}
Manganeso (Mn)	$1,5 \times 10^{-4}$	$1,2 \times 10^{-2}$
Molibdeno (Mo)	$1,5 \times 10^{-4}$	$1,2 \times 10^{-2}$
Cromo (Cr)	$5,0 \times 10^{-5}$	$0,4 \times 10^{-2}$

En algunos casos las funciones de los macronutrientes y micronutrientes se solapan. Ambos grupos de nutrientes actúan principalmente de tres maneras:

- como constituyentes de huesos y dientes
- como sales solubles que ayudan a controlar la composición de los fluidos corporales y las células
- como parte esencial de ciertas enzimas y otras proteínas funcionales

Los macronutrientes desempeñan fundamentalmente su papel en las dos primeras funciones, mientras que los micronutrientes son especialmente importantes en la función enzimática. Muy pocas proteínas pueden actuar como catalizadores por sí solas. La mayoría necesitan un grupo prostético no proteico. Si el grupo prostético no forma parte de la proteína se conoce como coenzima. El grupo puede ser una molécula orgánica, que contiene uno o más átomos metálicos, o puede ser solamente un metal. En este último caso, si el metal no forma parte de la proteína se conoce como activador. El hierro y el cobre aparecen en el grupo prostético de muchas enzimas implicadas en reacciones celulares de oxidación-reducción. El molibdeno desempeña

muchas veces la misma función en otras enzimas implicadas en la oxidación. La función del cinc y el manganeso es como activadores de algunas enzimas y como parte del grupo prostético en otras. La mayoría de los otros micronutrientes inorgánicos se cree que desempeñan un papel enzimático similar y, en consecuencia, las enzimas en cuestión se conocen frecuentemente como metaloenzimas. Los elementos metálicos también se encuentran en otros componentes funcionales importantes del cuerpo, incluyendo hormonas y vitaminas. Así, por ejemplo, el cinc está implicado en la producción y almacenamiento de insulina en las células beta del páncreas, la hemoglobina y la mioglobina, transportadores de oxígeno en sangre y en el tejido muscular, contienen hierro y la cobalamina o vitamina B₁₂ contiene cobalto.

En cuanto a la toxicidad de los metales para el hombre, no siempre es posible realizar una distinción clara entre los metales esenciales y tóxicos para el mismo, ya que todos los metales son probablemente tóxicos si se ingieren en determinadas cantidades. Además, en muchos casos el margen existente entre la toxicidad y la deficiencia es muy pequeño. Por otra parte, es muy difícil considerar la toxicidad de un metal aisladamente, ya que en condiciones normales todos los metales interaccionan entre sí. Por ejemplo, en el caso del cadmio los efectos fisiológicos, incluyendo su toxicidad, están directamente relacionados con la cantidad de cinc presente. Asimismo, la función del hierro en las células se ve afectada tanto por el cobre como por el cobalto presente, y en algunos casos, por el molibdeno y el cinc. Debido a esto, es difícil determinar si un metal es tóxico o no. A pesar de esto en algunos casos es posible diferenciar entre elementos que se conoce con certeza que son esenciales y aquellos que dan lugar a síntomas de toxicidad severa incluso a concentraciones muy bajas y no tienen ninguna función beneficiosa para el organismo humano. En este último caso se encuentran el mercurio, el cadmio y el plomo. Estos tres metales son los metales tóxicos más frecuentes en los alimentos, y han sido responsables de graves episodios de envenenamiento [8].

1.3 Propiedades físicas y químicas del Calcio, Cinc, Cobre, Hierro, Magnesio y Manganese. Funcionalidad y toxicidad para el hombre

1.3.1 Calcio

Propiedades Físicas y Químicas

El calcio tiene un peso atómico de 40,08 y su número atómico es el 20. Es blando y de color plateado. Tiene un punto de fusión de 851°C y un punto de ebullición de 1437°C Este elemento está ampliamente distribuido en la naturaleza en forma de minerales (dolomita $\text{MgCa}(\text{CO}_3)_2$, limonita y mármol $\text{Ca}(\text{CO}_3)$) y en el mar.

En cuanto a la reactividad química del calcio, es similar a la del sodio pero en menor grado. Es soluble en amoníaco líquido resultando disoluciones de color azul. En este caso si se elimina el disolvente a la temperatura de ebullición es posible aislar amins metálicas ($\text{Ca}(\text{NH}_3)_6$). Forma el óxido fácilmente a partir del carbonato por calcinación, dando lugar a un óxido blanco, cristalino, que posee retículos iónicos del tipo NaCl. Forma hidruros en condiciones relativamente suaves por reacción directa. Reacciona directamente con otros elementos dando lugar a compuestos binarios como los boruros, los siliciuros, arseniuros y sulfuros. Las sales de calcio se encuentran generalmente hidratadas y los halogenuros anhidros son delicuescentes. Los carbonatos son bastante insolubles. El sulfato de calcio forma un hemihidrato de fórmula $2\text{CaSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, que absorbe fácilmente más agua para dar $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (yeso), muy poco soluble. El cloruro de calcio es fácilmente soluble en alcoholes y en ácidos carboxílicos. Además el calcio reacciona con compuestos quelantes oxigenados en disolución acuosa alcalina. Los más importantes son los etilendiaminotetraacético $[\text{Ca}(\text{AEDT})]^{2-}$. La formación de complejos de calcio con AEDT y también con polifosfatos tiene gran importancia, no solamente para la eliminación de los iones calcio del agua, sino también en química analítica donde el AEDT se emplea en la determinación volumétrica del calcio. Con amoníaco y amins sólo se conocen complejos sumamente débiles [9-11].

Calcio en alimentos

Las concentraciones de calcio presentes en los diferentes tipos de alimentos según las “Tablas de composición de alimentos” [12] se reflejan en la Tabla 2. Estos resultados son comparables a los publicados por el “Ministerio de Sanidad y Consumo” en el año 2001 [13].

La mejor fuente de calcio es la leche, ya que además de presentar una elevada concentración en este nutriente, también es una buena fuente de fósforo y magnesio, los cuales ayudan a la absorción del calcio por parte del cuerpo humano. La vitamina D es también esencial para la adecuada absorción del calcio, por esta razón muchas leches son reforzadas con esta vitamina. Los derivados lácteos, como el queso y el yogur, también son excelentes fuentes de este nutriente. Los vegetales de hoja verde oscura como la col, la berza, el nabo fresco, la mostaza fresca y el brócoli, son buenas fuentes de calcio. Aunque algunos de estos vegetales son menos efectivos desde el aspecto nutricional, ya que el calcio va acompañado por importantes concentraciones de fibra y ácido oxálico, las cuales interfieren en la absorción del elemento. Otra importante fuente de calcio son el salmón y las sardinas enlatadas, ya que éstas van acompañadas de las espinas donde se acumula gran cantidad de este elemento [2,14].

Tabla 2. Concentración de calcio (en peso húmedo) presente en los diferentes tipos de alimentos

Alimento	[Ca] (mg/Kg)
Cereales y derivados	10-1150
Leche y derivados	500-12000
Huevos	510
Azúcares	20-50
Aceites y grasas	10-150
Verduras y hortalizas	90-1140
Leguminosas	560-1450
Frutas frescas	60-630
Conservas de frutas	60-250
Frutos secos	310-2540
Carnes y productos cárnicos	60-510
Pescados	160-800
Moluscos y crustáceos	290-2200
Conservas de pescado, moluscos y crustáceos	21-4000

Función y toxicidad del calcio para el ser humano

El calcio es el mineral más abundante en el cuerpo humano. Conforma cerca del 1,5 –2% del peso corporal y el 39% de los minerales corporales totales. El 99% del calcio está en los huesos y los dientes. El restante 1% está en la sangre y los líquidos extracelulares y dentro de las células de los tejidos blandos, donde regula muchas funciones metabólicas importantes [14].

El aporte diario recomendado (RDA) de calcio para los adultos es de 200-250 mg/día con porcentaje de absorción del 30 al 40%. Sin embargo el RDA varía en función del sexo, la edad y el estado del individuo, tal y como se puede observar en la Tabla 3 [15]. Se recomiendan cantidades adicionales para satisfacer las necesidades de calcio en el embarazo y la lactancia. También se recomiendan estos aportes de calcio en las mujeres postmenopáusicas que no tienen reemplazo de estrógenos.

Tabla 3. Aportes diarios recomendados para el calcio

Edad (años)	RDA ^a (mg)
Lactantes	
0,0-0,5	400
0,5-1,0	600
Niños	
1-10	800
Hombres	
11-24	1200
25-51+	800
Mujeres	
11-24	1200
25-51+	800
Embarazo	1200
Lactancia	
Primeros seis meses	1200
Segundos seis meses	1200

a. Aporte diario recomendado

El calcio participa en la regulación de las funciones nerviosa y muscular, en la producción de hormonas, en el mantenimiento del equilibrio hídrico, en la actividad cardíaca, en la coagulación de la sangre y en la secreción de la leche. El equilibrio intra y extracelular del calcio reviste gran importancia. El flujo de calcio en la célula puede ocasionarle daños e incluso la muerte.

El aporte inadecuado de calcio debilita la masa ósea, los dientes y los cabellos y puede provocar también alergias (dado que este elemento posee actividad antialérgica).

Entre todas las alteraciones provocadas por desórdenes del metabolismo del calcio, la más difícil de tratar y la más difundida es la osteoporosis menopáusica. La osteoporosis es un trastorno metabólico en el que la cantidad ósea se reduce sin cambios en la composición. No puede mantenerse la fuerza esquelética y ocurren fracturas con la más mínima tensión. Se ha intentado tratar esta enfermedad con calcio y vitamina D y con asociaciones de calcio y hormonas sexuales, estrógenos, flúor y magnesio. Los suplementos de calcio son ineficaces a este respecto, ya que el calcio no se asimila como tal en los huesos y se necesita la presencia de silicio, boro y de magnesio [2].

Los niveles extremadamente bajos de calcio en la sangre pueden aumentar la irritabilidad de las fibras y los centros nerviosos, lo que resulta en espasmos musculares (calambres). Una baja ingesta de calcio también contribuye a la hipertensión.

En cuanto a la toxicidad, una ingesta elevada de calcio y la presencia de un nivel elevado de vitamina D que puede ocurrir en niños que reciben suplementos, constituyen una fuente potencial de hipercalcemias. Es posible que esto favorezca una calcificación excesiva de los huesos y tejidos blandos.

Ingestas elevadas de calcio también pueden interferir con la absorción del hierro. Lo mismo puede ser cierto para el cinc, debido a que se presenta una interacción antagonista entre el calcio y el cinc cuando estos minerales se ingieren en dosis fisiológicas [14].

1.3.2 Cinc

Propiedades Físicas y Químicas

El cinc es el elemento número 30 de la Tabla Periódica. Tiene un peso atómico de 65,37 y su densidad es de 7,14 g/cm³. Es de color azul blanquecino, tiene un punto de fusión de 419,38°C y un punto de ebullición de 907°C. Es dúctil y maleable cuando se calienta a sólo 100°C. En contacto con el aire el cinc se reviste de una capa del carbonato de cinc, $\text{Zn}_2(\text{OH})_2\text{CO}_3$. Esta capa es persistente y protege el metal subyacente de una corrosión mayor, por ello, este metal se utiliza tanto en los galvanizados de metales menos resistentes.

El cinc es un metal reactivo. Reacciona rápidamente con ácidos no oxidantes, desprendiendo hidrógeno y formando sales. También se disuelve en ácidos fuertes dando lugar a iones cincato, $(\text{ZnO}_2)^{2-}$. Reacciona con el oxígeno, especialmente a elevadas temperaturas, para formar el óxido de cinc. Debido a sus propiedades anfóteras este metal forma una gran variedad de sales. El clorato de cinc, el cloruro de cinc, los sulfatos y nitratos son solubles en agua, mientras que el óxido, el carbonato, los fosfatos y los silicatos, los sulfuros y los complejos orgánicos son prácticamente insolubles en la misma.

Dadas sus propiedades reductoras el cinc se utiliza mucho en química orgánica.

El cinc forma parte de aleaciones comerciales muy importantes. La más conocida es el latón, cuyo origen es muy antiguo, y aún se utiliza actualmente. Este metal también forma parte de algunos bronce [6, 16].

Cinc en alimentos

El cinc está presente en gran número de alimentos. La concentración de cinc presente en los alimentos están directamente relacionada con la clase de alimento, así como el tipo de procesado que ha sufrido dicho alimento. Las concentraciones de cinc presentes en los diferentes tipos de alimentos según las “Tablas de composición de alimentos” [12] se reflejan en la Tabla 4. Estos resultados son comparables a los publicados por el “Ministerio de Sanidad y Consumo” en el año 2001 [13] y con los publicados en el Reino Unido [17] , en Estados Unidos [18] y en Australia [19] por otras entidades. Las mejores fuentes alimenticias de cinc son la carne, el pescado, el hígado, las verduras y las ostras, si bien hay grandes variaciones de la biodisponibilidad de cinc de unos alimentos a otros. Se ha comprobado que en una dieta variada se absorbe aproximadamente el 15-40% del aportado, mientras que el contenido en la verdura siempre se absorbe menos. Por lo tanto, los vegetarianos deben tener presente la posibilidad de desarrollar una carencia de cinc si no complementan su dieta con un aporte regular de este mineral. La forma de cinc que más rápidamente se absorbe son los suplementos de cinc orgánicos, como el gluconato y el aspartato [2].

Tabla 4. Concentración de cinc (en peso húmedo) presente en los diferentes tipos de alimentos

Alimento	[Zn] (mg/Kg)
Cereales y derivados	2,0-20
Leche y derivados	2,0-42,0
Huevos	15,0
Azúcares	--
Aceites y grasas	--
Verduras y hortalizas	0,2-11,0
Leguminosas	8,0-40,0
Frutas frescas	0,6-4,0
Conservas de frutas	0,3-1,0
Frutos secos	1,0-48,0
Carnes y productos cárnicos	4,0-60,0
Pescados	3,0-18,0
Moluscos y crustáceos	13,0-520 ^a
Conservas de pescado, moluscos y crustáceos	4,0-30,0

a. Concentración correspondiente a las ostras

Función y toxicidad del cinc para el ser humano

El cinc desempeña un papel fundamental como elemento traza en todos los organismos vivos, desde las bacterias hasta los humanos. Este metal es esencial para el crecimiento, desarrollo, reproducción en el hombre, para mantener el sentido del gusto y, por tanto, el apetito y para facilitar la cicatrización de las heridas.

El aporte diario recomendado (RDA) de cinc varía en función del sexo y de la edad tal y como se refleja en la Tabla 5 [15].

Tabla 5. Aportes diarios recomendados para el cinc

Edad (años)	RDA ^a (mg)
Lactantes	
0,0-1,0	5
Niños	
1-10	10
Hombres	
11-51+	15
Mujeres	
11-51+	12
Embarazo	15
Lactancia	
Primeros seis meses	19
Segundos seis meses	16

a. Aporte diario recomendado

El cinc es esencial para unas 200 enzimas distintas, para la formación de tejido óseo, para la cicatrización de heridas y úlceras, para la producción de proteínas, para la síntesis del ácido ribonucleico (RNA) ribosomal y para el metabolismo de la insulina y de los carbohidratos. La falta de cinc en los alimentos determina la detención del crecimiento en los niños. El cinc es un constituyente importante de una enzima, la superóxido-dismutasa (CuZnSOD) que tiene propiedades antioxidantes.

Las alteraciones del metabolismo del cinc se deben generalmente a deficiencias y no a intoxicaciones por excesos del metal. Los síntomas más corrientes de la carencia de cinc sin problemas cutáneos, dado que el 20% del cinc del organismo se concentra en la piel que reacciona muy rápidamente en casos de carencia. La falta de cinc también se manifiesta con pérdida del sentido del gusto y con astenia general. Otros síntomas posibles de la carencia de cinc son alteraciones hormonales y esterilidad. La carencia de este elemento puede asociarse a disfunciones cerebrales, como por ejemplo la dislexia. El cinc refuerza las defensas inmunitarias frente a los ataques externos. El organismo humano está constantemente expuesto a virus, bacterias, cancerígenos y alérgenos. La carencia de cinc disminuye la eficacia de nuestras defensas frente a microorganismos y sustancias invasoras. El metabolismo de la vitamina A también depende del cinc. La enzima que transforma el retinol en retinal necesita cinc para llevar a cabo este proceso.

Por tanto, la carencia de cinc puede disminuir la capacidad del organismo de utilizar las fuentes de vitamina A, privando al sistema inmunitario de dos de sus más importantes componentes [2]. En cuanto a las intoxicaciones por exceso de este metal en el organismo, éstas provocan náuseas, vómitos y dolor abdominal, ya que las sales de este metal son irritantes intestinales.

1.3.3 Cobre

Propiedades Físicas y Químicas

El cobre tiene un peso atómico de 63,54 y su número atómico es 29. Tiene una densidad de 8,96 g/cm³, un punto de fusión de 1083°C y un punto de ebullición de 2090°C aproximadamente. Exceptuando a la plata, el cobre es el mejor conductor del calor y la electricidad. Es un metal maleable y dúctil. Este metal es resistente a la corrosión, en el sentido que en contacto con el aire se oxida superficialmente. Los estados de oxidación del cobre son normalmente el Cu (I) y el Cu (II). El Cu (III) puede aparecer en compuestos cristalinos y en algunos complejos, pero a efectos prácticos no es significativo.

Cuando el cobre se somete a calor en atmósfera oxigenada inicialmente forma el CuO. A medida que incrementa la temperatura se forma Cu₂O. El cobre forma una amplia variedad de sales inorgánicas cuprosas y cúpricas. Los compuestos cúpricos son los más importantes ya que los compuestos cuprosos se oxidan rápidamente para dar lugar a la forma cúprica.

Una característica muy importante del cobre es su habilidad para formar complejos con las aminas y otros ligandos que da lugar a importantes propiedades biológicas. Estos complejos, que son coloreados, también proporcionan las bases de diferentes métodos colorimétricos para la determinación de este elemento, entre los que se encuentran el conocido test de Fehling [6,16].

Cobre en alimentos

El cobre está presente en todos los alimentos, tanto de origen vegetal como animal. La concentración habitual de cobre en alimentos es alrededor de 2 mg/Kg o menor [20]. Las concentraciones encontradas en los diferentes tipos de alimentos se recogen en la Tabla 6 [6]. Las mejores fuentes alimenticias de cobre son los cereales, así como la carne (especialmente en las vísceras del animal), pescados y algunas verduras. Algunos cereales de desayuno, sobre todo aquellos basados en trigo y otros granos de cereal, contienen más de 10 mg/Kg de cobre. Los cereales refinados y los productos lácteos son alimentos pobres en cobre.

Tabla 6. Concentración de cobre (en peso húmedo) presente en los diferentes tipos de alimentos

Alimento	[Cu] (mg/Kg)
Cereales y derivados	0,7-3,3
Carnes/pescados	0,8-2,0
Verduras	<0,2-1,9
Leche y derivados	<0,2

Función y toxicidad del cobre para el ser humano

Este elemento se encuentra distribuido en el hígado, músculos, huesos, corazón y cerebro. En la sangre el cobre se distribuye, a parte iguales, entre los hematíes y el plasma. No obstante, el 60% del cobre de los glóbulos rojos está estrechamente ligado al enzima cobre-zinc superóxido dismutasa (CuZnSOD). La CuZnSOD es una enzima que protege a las células del daño que les infieren los radicales libres y los peróxidos. Casi todo el cobre del plasma se halla ligado a una proteína, la ceruloplasmina, que desempeña funciones antioxidantes y por esta razón tanto ella como el cobre en sangre aumentan en el caso de inflamación o de situaciones que conllevan una producción excesiva de radicales libres [2].

El aporte diario recomendado (RDA) de cobre según la edad se recoge en la Tabla 7 [15].

Tabla 7. Aportes diarios recomendados para el cobre

Edad (años)	RDA ^a (mg)
Lactantes	
0,0-0,5	0,4-0,6
0,5-1,0	0,6-0,7
Niños y adolescentes	
1-3	0,7-1,0
4-6	1,0-1,5
7-10	1,0-2,0
11+	1,5-2,5
Adultos	
--	1,5-3,0

a. Aporte diario recomendado

La deficiencia de cobre es rara, si bien puede manifestarse asociada a enfermedades renales graves, como la de Wilson, el síndrome de Menke y otras alteraciones de su absorción. El riesgo de problemas cardíacos y circulatorios aumenta en las carencias de cobre, particularmente si se acompaña de carencia de selenio. La carencia de cobre también contribuye a la anemia, a las enfermedades óseas, a las alteraciones del sistema nervioso y a la caída del cabello. En los niños la carencia de cobre ocasiona la fragilidad ósea y detención del crecimiento [2,14].

La ingesta de grandes cantidades de sales de cobre pueden producir reacciones tóxicas, tanto en los humanos como en los animales de granja. Las enfermedades de los humanos debido a acumulaciones excesivas de cobre son normalmente paralelas a excesos de cobre presentes en los animales de los que proviene el alimento. Los efectos son normalmente reversibles, especialmente en el caso de dosis masivas. Sin embargo, estos casos son muy escasos, ya que es muy difícil retener en el organismo suficiente cantidad de sales de cobre.

1.3.4 Hierro

Propiedades Físicas y Químicas

El hierro tiene un peso atómico de 55,85 y su número atómico es 26. Tiene una densidad de 7,86 g/cm³. El hierro puro es un metal blanco y lustroso que funde a 1528°C. Su punto de ebullición es casi 3000°C. No es un metal particularmente duro, pero es dúctil y maleable, y presenta buenas propiedades en cuanto a la conductividad del calor y la electricidad.

Este metal es químicamente muy reactivo. En aire húmedo se oxida rápidamente dando lugar al óxido hidratado. La capa que se forma de este óxido no protege permanentemente el metal subyacente, ya que este óxido se escama y se elimina fácilmente, quedando el metal no oxidado expuesto a esta atmósfera. Sin embargo, es un metal que es estable en una atmósfera de aire seco y en agua libre de dióxido de carbono.

Este metal forma dos series de compuestos: los ferrosos (Fe(II)) y los férricos (Fe(III)). Pueden existir en otros estados de oxidación, pero sin importancia desde el punto de vista biológico. Se conoce tres óxidos de hierro, FeO, Fe₂O₃ y Fe₃O₄, que representan los óxidos de Fe(II) y Fe(III), así como la mezcla de ambos que aparece en la naturaleza en forma de mineral (magnetita). El hierro se disuelve en ácidos en forma de sales. Con ácidos no oxidantes y en ausencia de aire se obtienen sales de Fe(II). Muchas sales de hierro, así como los hidróxidos, son insolubles en agua [6,16].

Hierro en alimentos

El hierro está presente en todos los alimentos y bebidas. Las concentraciones de este metal en diferentes alimentos puede variar mucho, en función del tipo de alimento y del procesado al que haya sido sometido. Los alimentos enlatados pueden contener elevados niveles de hierro con respecto a los alimentos frescos, debido a los envases. El pH de los alimentos así como el modo de envasado, determina la concentración final de hierro en el propio alimento [21]. La “vejez” de la lata y el tiempo que lleva enlatado el alimento

son otros factores importantes que determinan los niveles de hierro en los alimentos envasados [22-23]. Las concentraciones presentes en los diferentes tipos de alimentos se recogen en la Tabla 8 [6]. Estos resultados son comparables a los publicados por el “Ministerio de Sanidad y Consumo” en el año 2001 [13] y con los publicados en el Reino Unido [17], en Estados Unidos [18] y en Australia [19] por otras entidades.

Tabla 8. Concentración de hierro (en peso húmedo) presente en los diferentes tipos de alimentos

Alimento	[Fe] (mg/Kg)
Cereales y derivados	2,0-88,0
Leche y derivados	0,6-10,0
Huevos	22,0
Azúcares	0,0-7,0
Aceites y grasas	0,0-2,0
Verduras y hortalizas	3,0-31,0
Leguminosas	53,0-85,0
Frutas frescas	1,0-15,0
Conservas de frutas	2,0-5,0
Frutos secos	9,0-42,0
Carnes y productos cárnicos	7,0-80,0
Pescados	3,0-13,0
Moluscos y crustáceos	7,0-240
Conservas de pescado, moluscos y crustáceos	9,0-240,0

El hierro alimenticio tiene tres fuentes principales: el hierro hemo de la carne, el hierro no hemo de las verduras y hierro no hemo incorporado a los alimentos. Estos dos tipos de hierro, hemo y no hemo, se diferencian en el mecanismo de absorción. El hierro hemo se absorbe en el organismo en un grado mucho mayor que el hierro no hemo. Las mejores fuentes alimenticias de hierro son la carne, la sangre, los guisantes, el perejil y el pescado marino. El 20% del hierro de la carne es hierro hemo, del que se absorbe fácilmente (como media, hasta el 24%). Otros componentes de la dieta no ejercen efecto alguno en la absorción del hierro hemo. Sin embargo, el hierro hemo de la

dieta solo cubre el 10 % de las necesidades totales de hierro. El resto al ser hierro no hemo se absorbe escasamente. Este tipo de hierro se encuentra en el pan ácimo, en los huevos y en las verduras [2].

Muchos alimentos se enriquecen con hierro no hemo. Este hierro se adiciona como polvo de hierro, en forma reducida (ferroso). Se absorbe bastante bien y no reacciona químicamente con otros ingredientes de los alimentos. Esta práctica se introdujo inicialmente con fines sanitarios para prevenir la deficiencia de este metal.

Función y toxicidad del hierro para el ser humano

Un hombre adulto contiene alrededor de 4 g de hierro, de los cuales 3 g forman parte de dos metaloproteínas, la hemoglobina y la mioglobina. Ambas moléculas se unen de modo irreversible al oxígeno. La hemoglobina transporta el oxígeno desde los pulmones, hasta los tejidos del cuerpo y la mioglobina lo hace hasta las células musculares además de ser una reserva de oxígeno. El funcionamiento de numerosas enzimas requieren la presencia de hierro. Además, el metabolismo de las vitaminas B depende del hierro. Este elemento es un oxidante que oxida las vitaminas A, C y E y acelera el enranciamiento (peroxidación de los lípidos) de los ácidos grasos de los alimentos y del cuerpo humano.

El aporte diario recomendado (RDA) de hierro según la edad y el sexo se recoge en la Tabla 9 [15]. En el caso de las mujeres el RDA varía en función del estadio hormonal que ésta atraviesa. Así, para las mujeres durante los años reproductivos se recomienda un ingesta de 15 mg/día de hierro, para reemplazar las pérdidas durante la menstruación y para proporcionar los suficientes depósitos de este metal para sostener un posible embarazo. Los requerimientos de la adolescente se establecen también en 15 mg para proporcionar las necesidades del rápido crecimiento. En el caso de embarazo es lógico que el aporte necesario tome las cotas más elevadas.

Tabla 9. Aportes diarios recomendados para el hierro

Edad (años)	RDA ^a (mg)
Lactantes	
0,0-0,5	6
0,5-1,0	10
Niños	
1-10	10
Hombres	
11-18	12
19-51+	10
Mujeres	
11-50	15
51+	10
Embarazo	30
Lactancia	
Primeros seis meses	15
Segundos seis meses	15

a. Aporte diario recomendado

La anemia debida a la carencia de hierro es una de las enfermedades más comunes. Sus síntomas son cansancio, pérdida de la fuerza, nerviosismo y palidez. A menudo hay prurito cutáneo y el paciente se muestra pronto sin aliento. El contenido hemoglobínico de la sangre ejerce una influencia directa en la prestación física que disminuye, la frecuencia del pulso aumenta y en los tejidos se acumula el ácido láctico. El suministro de suplementos de hierro a una persona carente de este metal mejora su prestación física tan rápidamente que no parece que ello se deba sólo al aumento de los niveles de hemoglobina.

La carencia de hierro también aumenta el riesgo de contraer enfermedades infecciosas, dado que el mecanismo de defensa de los glóbulos blancos (linfocitos) se deteriora. Además, la capacidad de los linfocitos de reconocer a los virus, bacterias y células neoplásicas también depende del hierro.

Es posible, si bien raro, que en los tejidos se acumule un exceso de hierro. Una de sus causas podría ser el excesivo número de glóbulos rojos, situación que se conoce como policitemia. También se acumula en los tejidos una cantidad excesiva de hierro en dos enfermedades raras, la hemosiderosis y la

hemocromatosis. Las concentraciones muy altas de hierro en el organismo aumentan su sensibilidad a las enfermedades infecciosas [2,14].

1.3.5 Magnesio

Propiedades Físicas y Químicas

El magnesio es el elemento número 12 de la Tabla Periódica con un peso atómico de 24,31. Tiene un punto de fusión de 651°C y de ebullición de 1107°C. Su densidad es 1,74 g/cm³. Este metal se encuentra en la naturaleza en forma de carbonato en la magnesita, como óxido en la brucita y como cloruro en la carnalita [9].

El magnesio tiene una fuerte tendencia a formar compuestos covalentes. Este metal es de color blanco grisáceo y está recubierto por una película superficial de óxido que en cierta medida lo protege químicamente. No es atacado por el agua, siempre que no esté amalgamado. Es fácilmente soluble en ácidos diluidos y también es atacado por la mayor parte de los halogenuros alquílicos y arílicos en disolución etérea, dando reactivos de Grignard. Las propiedades químicas de este elemento se encuentran entre las del berilio y las de los restantes miembros del grupo, Ca, Sr, Ba y Ra, muy similares entre sí. Así, por ejemplo, el hidróxido de magnesio puede precipitar en disoluciones acuosas, como el berilio, mientras que los hidróxidos de los restantes elementos son moderadamente solubles. El óxido de magnesio es insoluble en agua. Es una base mucho más débil que los hidróxidos de Ca, Sr, Ba y Ra. Sin embargo, no posee propiedades ácidas y, a diferencia del hidróxido de berilio, es insoluble en exceso de hidróxido. Todos los hidróxidos del Ca al Ra son solubles en agua, tanto más cuanto mayor es el número atómico del metal. Todos estos hidróxidos son bases fuertes. Contrastando con el berilio, el magnesio forma halogenuros anhidros y otras sales esencialmente iónicas. En agua se forma el ion hidratado (muy probablemente $[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$) en el cual el agua que se encuentra en la primera esfera de coordinación está mucho menos fuertemente ligada que en el caso de $[\text{Be}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$. El aquo ion no es perceptiblemente ácido. La energía de hidratación es, sin embargo,

suficientemente grande como para que las sales de magnesio cristalicen de sus disoluciones acuosas como hidratos bastante estables. La mayor parte de las sales de magnesio son solubles en agua, sin embargo el fluoruro es poco soluble [9-11].

Magnesio en alimentos

El magnesio es abundante en los alimentos y en la dieta ordinaria, se cree que la vía alimenticia proporciona cantidades adecuadas de este nutriente como para no sufrir carencias del mismo. Las concentraciones de magnesio presentes en los diferentes tipos de alimentos se recogen en la Tabla 10 [12]. Estos resultados son comparables a los publicados por el “Ministerio de Sanidad y Consumo” en el año 2001 en España [13].

Constituyen buenas fuentes de magnesio las semillas, las nueces, las leguminosas, los granos de cereales no molidos, la carne y el pescado, así como las verduras verdes oscuras, en las cuales el magnesio es un constituyente esencial de la clorofila. El pescado, la carne, la leche y la mayoría de las frutas comestibles son fuentes escasas de magnesio. Las dietas ricas en alimentos refinados, suelen ser pobres en magnesio en comparación con las dietas ricas en verduras y granos no refinados, ya que el mineral se pierde durante la refinación y el procesado de los alimentos como es el caso de la harina, el arroz y el azúcar [14].

Tabla 10. Concentración de magnesio (en peso húmedo) presente en los diferentes tipos de alimentos

Alimento	[Mg] (mg/Kg)
Cereales y derivados	70-910
Leche y derivados	40-1170
Huevos	120
Azúcares	0-20
Aceites y grasas	0-20
Verduras y hortalizas	80-71
Leguminosas	780-160
Frutas frescas	40-410
Conservas de frutas	30-80
Frutos secos	34-2670
Carnes y productos cárnicos	50-360
Pescados	190-570
Moluscos y crustáceos	230-2500
Conservas de pescado, moluscos y crustáceos	200-620

Función y toxicidad del magnesio para el ser humano

En el organismo humano hay 20-80 g de magnesio cuyo 99% se localiza en el interior de las células, en donde se regula diversos sistemas enzimáticos. La mayor parte del magnesio se localiza en los huesos (69%) y en los músculos (20%), mientras que en los líquidos extracelulares, como por ejemplo el suero sanguíneo, sólo hay un 1%. [2].

El RDA para el magnesio varía desde los 40 mg de los lactantes hasta 6 meses, hasta los 400 mg que son necesarios para los varones entre 15 y 18 años. En la Tabla 11 se recogen los RDA en función del sexo y la edad [15].

Tabla 11. Aportes diarios recomendados para el magnesio

Edad (años)	RDA ^a (mg)
Lactantes	
0,0-0,5	40
0,5-1,0	60
Niños	
1-3	80
4-6	120
7-10	170
Hombres	
11-14	270
15-18	400
19-51+	350
Mujeres	
11-14	280
15-18	300
19-51+	280
Embarazo	300
Lactancia	
Primeros seis meses	355
Segundos seis meses	340

a. Aporte diario recomendado

El magnesio es un mineral esencial para el funcionamiento celular y desempeña un papel clave en todas las reacciones de los fosfatos. Las células necesitan magnesio para su división y para la producción de enzimas que, a su vez, regulan el metabolismo de las proteínas, carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos y nucleótidos. Cuando falta magnesio se altera la permeabilidad celular, lo que provoca la salida del potasio y del magnesio y la entrada en las células de sodio y calcio. La entrada del sodio libera calcio de las mitocondrias y origina una sustancia, llamada AMP, que causa un aumento mayor de la permeabilidad celular. Se genera así una situación cíclica que lleva a la muerte celular.

El magnesio participa en la transmisión y actividad neuromuscular, trabajando de acuerdo o en contra de los efectos del calcio. El exceso de magnesio inhibe la calcificación ósea. En la contracción muscular normal, el calcio actúa como estimulante y el magnesio como relajante. El magnesio puede ser un antagonista fisiológico de los canales de calcio. La reactividad de las células vasculares y de otras células musculares lisas depende de la relación del calcio con el magnesio. Grandes dosis de magnesio pueden

causar depresión del sistema nervioso central, anestesia e incluso parálisis, especialmente en pacientes con insuficiencia renal [14].

La carencia de magnesio en el hombre puede obedecer a múltiples causas. Puede ser consecuencia de un aporte alimenticio insuficiente, de una disminución de la capacidad de absorción o de una excesiva pérdida de este metal por la orina. La carencia de magnesio puede desarrollarse gradualmente sin que aparezcan síntomas individualizados. Sin embargo, con el tiempo puede aparecer astenia, desórdenes hormonales, debilidad muscular, temblores y posiblemente espasmos musculares. Una carencia grave de magnesio a veces provoca arritmias [2].

1.3.6 Manganeseo

Propiedades Físicas y Químicas

El manganeseo es el elemento número 25 de la Tabla Periódica. Tiene un peso atómico de 54,94 y una densidad de 7,2-7,4 g/cm³. Su punto de fusión es de 1427°C y el de ebullición de 2000°C. Sus propiedades físicas y químicas son muy similares a las del hierro, el cual le precede inmediatamente en la primera serie de transición. Sin embargo, el manganeseo es más duro, más quebradizo y menos refractante que el hierro. Como el hierro, es un metal reactivo que se disuelve rápidamente en ácidos no oxidantes diluidos. Arde en contacto con el cloro para dar lugar a MnCl₂. Reacciona con oxígeno a elevadas temperaturas, dando lugar al óxido Mn₃O₄. El manganeseo también reacciona directamente con el boro, el carbono, el azufre, el silicio y el fósforo.

El manganeseo tiene diferentes estados de oxidación, siendo el más importante desde el punto de vista práctico el divalente, Mn (II). Éste forma una serie de compuestos, sales manganosas, con todos los aniones comunes. Muchos de estos son solubles en agua y cristalizan como hidratos. El Mn (II) también forma una serie de quelatos con el ácido etilendiamintetraacético (AEDT) y otros reactivos quelantes. La química del Mn (III) no es muy amplia. En solución acuosa es inestable y se reduce rápidamente a Mn (II). Del mismo modo, los compuestos de Mn(IV) son de pequeña importancia práctica,

excepto el óxido MnO_2 , ya que aparece en la naturaleza en forma de mineral (pirolusita). El Mn (IV) se encuentra sólo en forma del ion manganato (MnO_4^{2-}). Así también el Mn (VII) se conoce en forma del ion permanganato (MnO_4^-). El permanganato potásico es un compuesto muy común y muy utilizado, ya que es un fuerte reactivo oxidante [6,16]

Manganeso en alimentos

El contenido de manganeso en los alimentos es muy variable. El manganeso está presente en todos los tejidos de las plantas y los animales, así como en los humanos. Las concentraciones de manganeso presentes en los diferentes tipos de alimentos, según un estudio realizado en el Reino Unido [17], se recogen en la Tabla 12. Las fuentes alimenticias más abundantes en manganeso son las nueces, los cereales integrales, las leguminosas y el té, mientras que la carne, el pescado y los productos lácteos contienen cantidades insignificantes de este elemento.

Tabla 12. Concentración de manganeso (en peso húmedo) presente en los diferentes tipos de alimentos

Alimento	[Mn] (mg/Kg)
Cereales	2,4-14,0
Carne /Pescado	0,45-1,10
Leche	<0,10
Verduras	0,5-2,2

Función y toxicidad del manganeso para el ser humano

El manganeso es necesario para la formación de los huesos, para el metabolismo de las grasas y de los carbohidratos y para la fertilidad. El RDA de este nutriente es de 3,8 mg. No se conocen enfermedades carenciales asociadas a este nutriente, si bien en carencias experimentales se pueden presentar los siguientes síntomas: emaciación, exantemas y otros signos cutáneos,

así como la caída del pelo. Es un componente muy importante de las enzimas celulares como el piruvato carboxilasa, glutamino sintetasa y posiblemente de otras enzimas involucradas en el metabolismo de los ácidos nucleicos. Otras enzimas como la succinato deshidrogenasa necesitan al manganeso como activador. Este metal también es un componente de una de las superóxido dismutasas las cuales son importantes en la protección de las células contra el poder oxidativo de los radicales libres.

La toxicidad de manganeso se ha presentado en mineros como consecuencia de la bioabsorción de este oligoelemento a través de las vías respiratorias. El exceso que se acumula en el hígado y el sistema nervioso central, produce síntomas parecidos al parkinson [14].

2. MÉTODOS DE PREPARACIÓN DE MUESTRAS SÓLIDAS

El proceso analítico consiste en diferentes etapas entre las que se encuentra la preparación de la muestra. Sin embargo, mientras algunas de estas etapas como son la medida y transducción de la señal analítica, o la recogida y procesado de datos se han desarrollado en gran medida, el tratamiento de la muestra es la etapa del proceso analítico que más dificultad y errores conlleva al proceso global. La mayoría de estos procesos se realizan de modo manual y son tratamientos complejos, tediosos y difíciles de controlar sistemáticamente siendo así fuente de errores analíticos y de problemas de contaminación.

La preparación de las muestras para la determinación de los metales presentes en ellas se puede llevar a cabo de diferentes maneras en función del tipo de muestra y del tipo de análisis que se quiere llevar a cabo [24,25]. Los principales procedimientos a seguir en la preparación de la muestra para el análisis de metales en las mismas son los siguientes [26]:

- Degradar y disolver la matriz liberando así los metales de la muestra para su posterior determinación (disolución)
- Destrucción de la matriz de la muestra (digestión)
- Separar un sólo analito o grupo de ellos de otras especies que puedan interferir en el análisis (separación)
- Concentrar los metales presentes en la muestra en muy bajas concentraciones para así obtener una concentración adecuada para el análisis (preconcentración)

En la preparación de la muestra no se necesita llevar a cabo todos estos procedimientos, sino que en la mayoría de los casos sólo son necesarios uno o dos de ellos. En la figura 1 se indica un esquema de la preparación de la muestra sólida para la determinación de los metales en la misma.

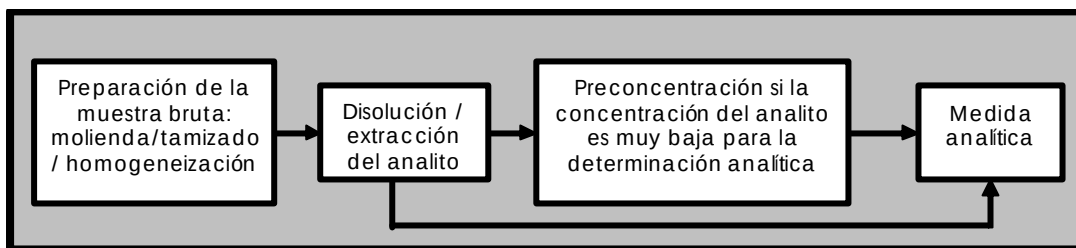


Figura 1. Esquema de la preparación de la muestra sólida para la determinación de metales

El método analítico a utilizar, la concentración en la que se encuentra el analito y el tipo de matriz en la que se encuentra dicho analito, son los principales factores que determinan la preparación de la muestra.

El tratamiento más común de la muestra es la disolución total de la misma, ya que con este procedimiento se eliminan sus heterogeneidades. En el caso concreto de la digestión, ésta se realiza en función del tipo de muestra, del analito a determinar y del método analítico a utilizar.

Debido a que, en muchos casos, estos análisis implican la determinación de los metales a nivel de traza, ya que los reactivos utilizados para la destrucción de la matriz son frecuentemente muy agresivos, hay que tener especial cuidado con la posible contaminación de la muestra por parte de los recipientes o por los propios reactivos. Los iones metálicos se pueden adsorber en las superficies de los recipientes, especialmente en el caso de los recipientes de vidrio. Algunos metales, como es el caso del hierro, el mercurio, el oro y el paladio, pueden perderse de la muestra cuando se calientan en crisoles de platino. Estas pérdidas por adsorción no sólo implicarán pérdidas en el análisis que se lleva a cabo en el momento, sino que supondrán posibles contaminaciones en análisis futuros. La volatilización es otra de las principales causas de pérdida de analito, cobrando gran importancia cuando se trata de un procedimiento de calcinación de la muestra y existen elementos volátiles. La volatilidad depende de la matriz y de la forma en que se encuentre el metal [27].

Los diferentes métodos para llevar a cabo la preparación de la muestra sólida se recogen en la Figura 2 en función de la energía utilizada.

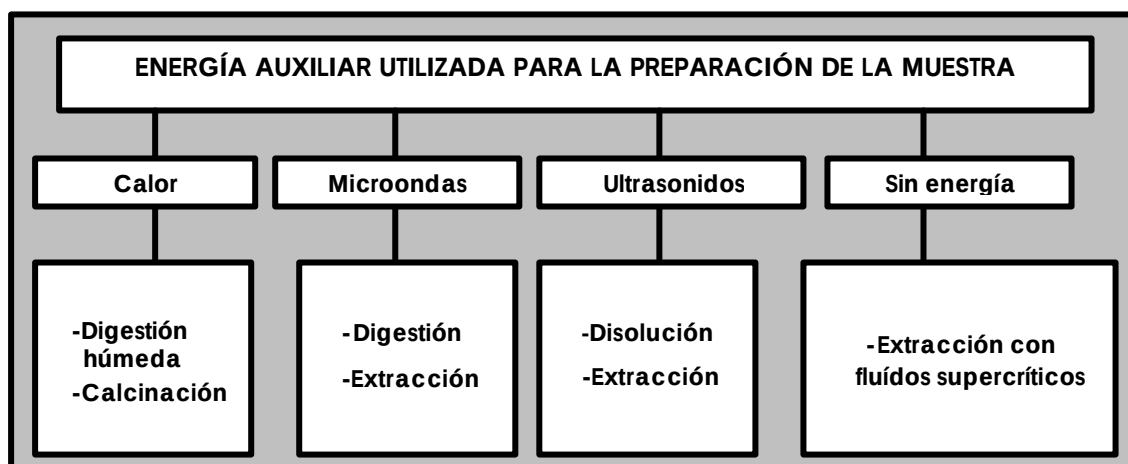


Figura 2. Métodos de preparación de la muestra sólida en función de la energía utilizada

2.1 Tratamiento de la muestra sólida utilizando calentamiento convencional: digestión húmeda

En los procedimientos de digestión húmeda la parte orgánica de la muestra es oxidada en la fase líquida por la aplicación de energía (calor). La digestión húmeda se suele llevar a cabo con ácidos oxidantes [28], pero también se puede realizar utilizando bases o ácidos no oxidantes [29-32].

El ácido más adecuado para la digestión es función de la matriz de la muestra, del analito y del método de determinación propuesto. El ácido nítrico es el reactivo casi universal utilizado en las digestiones, ya que no da lugar a interferencias en la mayoría de las determinaciones y está disponible comercialmente en un alto grado de pureza. Sin embargo, el ácido nítrico tiene un punto de ebullición bastante bajo (122°C) y su poder oxidante es frecuentemente insuficiente en condiciones de presión atmosférica. En los casos en los que éste ácido no es suficiente, se suele combinar con peróxido de hidrógeno y/o ácido clorhídrico para mejorar la calidad de la digestión [28].

El ácido clorhídrico y el sulfúrico pueden interferir en la determinación de ciertos metales ya que pueden dar lugar a complejos estables con el mismo.

El ácido perclórico es un gran reactivo oxidante, pero éste sólo debe de usarse en los casos que sea absolutamente necesario, ya que su uso requiere grandes medidas de seguridad.

En las muestras silicatadas es necesario utilizar ácido fluorhídrico.

La digestión húmeda se puede llevar a cabo en sistemas abiertos, y por tanto a presión atmosférica, o bien en sistemas cerrados a presiones más elevadas (bombas).

La digestión húmeda a presión atmosférica es el método más simple en cuanto a digestiones se refiere. Sin embargo, esta forma de llevar a cabo la digestión puede llevar asociado diferentes errores sistemáticos debidos a [33]:

- Contaminación debida a los reactivos y el material del recipiente
- Pérdidas de los analitos debida a la adsorción en la superficie del recipiente o por reacción con el material del recipiente
- Pérdidas del analito/s por volatilización

Estos errores sistemáticos de la digestión húmeda a presión ambiental, llevaron a desarrollar esta metodología en condiciones de elevada presión, y por tanto en sistemas cerrados. La digestión húmeda en sistemas cerrados ofrece las siguientes ventajas [34]:

- No hay pérdidas de elementos por volatilización
- Menores tiempos de reacción (3-10 veces menor) junto con una mejor calidad de la digestión debido a que se alcanzan temperaturas más elevadas
- El ácido nítrico, disponible comercialmente con una gran pureza, se puede utilizar para la mayoría de las digestiones
- Los valores del blanco disminuyen, ya que son necesarias menores cantidades de reactivos
- No hay contaminación por fuentes externas

La temperatura media alcanzada durante la digestión depende del recipiente utilizado. En los recipientes de politetrafluoroetileno (PTFE) y de perfluoroalcoxi (PFA) se encuentra alrededor de 200°C. A temperaturas más

elevadas la vida del recipiente se reduce. Los recipientes de cuarzo se utilizan para digestiones que se llevan a cabo todavía a temperaturas más elevadas.

La digestión húmeda en sistemas cerrados con ácido nítrico o una mezcla que consista en ácido nítrico, ácido clorhídrico y peróxido de hidrógeno se pueden llevar a cabo utilizando:

- Una bomba clásica de (PTFE)
- Un sistema de baja presión (hasta 1,5 Mpa) con calentamiento utilizando energía de microondas (el recipiente consiste en Teflón perfluoroalcoxi (PFA))
- Un sistema de alta presión (hasta 15 MPa); el recipiente consiste en PTFE, PFA o cuarzo. El calentamiento se puede hacer tanto de modo convencional como utilizando la energía de microondas

2.2 Calcinación

La calcinación consiste en todas aquellas digestiones en las que los reactivos están en estado sólido o gaseoso. Éste es un método relativamente simple que permite eliminar la materia orgánica para una gran cantidad de muestras. Cuando se realiza en recipientes abiertos, la muestra se coloca en el interior de un crisol adecuado y arde en una mufla. Los crisoles habitualmente utilizados para realizar este tratamiento son de sílice, porcelana, platino o de vidrio Pyrex.

Las principales desventajas que ofrece del método son las posibles pérdidas de algunos elementos por volatilización, la contaminación de la muestra por el polvo de la atmósfera, y la adsorción irreversible de los analitos en la pared del recipiente [35]. Es importante realizar blancos para cada serie de muestras, ya que las partículas generadas en el interior de la mufla pueden generar blancos elevados y variables. En este caso la aplicabilidad del método dependerá de la concentración en la que se encuentre el analito en la muestra.

Las pérdidas por volatilización del analito se pueden minimizar disminuyendo la temperatura del proceso. Así, por ejemplo para la determinación de plomo, cobre, cinc, hierro y cadmio en alimentos, se

obtuvieron recuperaciones satisfactorias calentando las muestras lentamente hasta 450°C y manteniendo esta temperatura durante 1 hora [36].

La calcinación es adecuada como pretratamiento de la muestra para la determinación de elementos nutricionales como el Fe, K, Ca, Mg y Mn, ya que están usualmente presentes en una concentración no muy baja y son estables a las elevadas temperaturas requeridas en el proceso. Sin embargo, las grasas y los aceites de los alimentos pueden suponer un problema, ya que pueden arder y causar pérdidas en las partículas del humo, por ello requieren un pretratamiento antes de la combustión [27].

Los procedimientos de calcinación se pueden realizar de diferentes modos [26]:

- Combustión en una corriente de aire
- Combustión en presencia de oxígeno
- Combustión con oxígeno activado por un campo de frecuencia magnético de alta frecuencia (plasma frío)
- Fusión

2.2.1 Combustión en una corriente de aire

En este tipo de combustión se produce la oxidación (combustión) de una sustancia en una atmósfera de aire, a elevadas temperaturas (unos cientos de grados centígrados) que se lleva a cabo frecuentemente en un horno mufla o un aparato similar, como puede ser un horno microondas. Este tipo de calcinación es el más utilizado y se puede llevar cabo de dos formas [28]:

- Utilizando un suministro extra de aire en el horno. De este modo, la muestra alcanza temperaturas superiores al aire contenido en el mismo. La temperatura que puede alcanzar la muestra viene determinada por el espesor de la misma y el tipo de suministro de aire que se utilice. Este tipo de calcinación es un procedimiento crítico para elementos volátiles.

- En un horno mufla cerrado. La temperatura que alcanza la muestra es la que alcanza el horno. Este procedimiento plantea un inconveniente que es la existencia de gradientes de temperatura en el horno.

2.2.2 Combustión en presencia de oxígeno

La combustión en presencia de oxígeno es un procedimiento de descomposición que elimina muchos de los problemas potenciales en cuanto a la contaminación de la muestra asociados a los reactivos utilizados en la digestión [37]. El único reactivo utilizado en este tipo de combustión es el oxígeno gaseoso, el cual está disponible en comercialmente en un elevado grado de pureza. Este tipo de combustión se puede llevar a cabo a presión atmosférica (en un recipiente abierto) o a elevadas presiones (en un recipiente cerrado). La combustión a presión atmosférica es un procedimiento relativamente fácil de llevar a cabo, pero tiene la desventaja de la posible pérdida de elementos volátiles. Estas pérdidas se ven significativamente reducidas cuando se incorpora al dispositivo un condensador de reflujo cargado con nitrógeno líquido [37,38]. Este riesgo de pérdidas por volatilización se elimina en el caso de la combustión a elevadas presiones. En este caso la combustión se produce en un recipiente cerrado en el que el oxígeno es introducido hasta una determinada presión. Entonces la muestra es sometida a una combustión con la ayuda de un dispositivo de detonación (alambre de ignición).

2.2.3 Combustión con oxígeno activado por un campo de frecuencia magnético de alta frecuencia (plasma frío)

La descomposición con oxígeno activado por un campo de frecuencia magnético de alta frecuencia se realiza con oxígeno en estado excitado bajo una presión de unos pocos milibares. El plasma se forma a presión reducida (0,01-1 mbar) en un campo de elevada frecuencia generado bien por un magnetrón (2,45 GHz) o bien semiconductor generador de elevadas frecuencias. El plasma de oxígeno es “un plasma frío”, ya que la muestra

nunca excede los 150°C aproximadamente, por tanto, el riesgo de pérdidas de elementos volátiles queda reducido sólo al mercurio.

2.2.4 Fusión

La fusión es un gran avance en la preparación de la muestra en los análisis geológicos y a escala industrial. En este procedimiento la muestra en forma de unos finos polvos se mezcla con un exceso de reactivo fundente en un crisol de grafito o platino (a veces es de níquel o circonio). El crisol se introduce en un horno mufla a 300-1000°C hasta obtener una “mezcla”, que posteriormente es enfriada y disuelta. Los principales problemas asociados a la fusión incluyen los escasos medios existentes para la purificación de los reactivos (sólidos) necesarios y la presencia de una elevada concentración de sales en la disolución del analito resultante, causa por la cual este método es desaconsejable en el análisis de elementos traza [26,33].

2.3 Tratamiento de la muestra sólida utilizando la energía de microondas

A escala de laboratorio frecuentemente existen diferentes aparatos basados en la energía de microondas. Estos dispositivos mejoran muchísimo el tiempo en el que se completan los procesos de tratamiento de las muestras sólidas, como son la digestión, y la extracción. Los procesos que implican este tipo de energía dan lugar a reacciones mucho más rápidas y limpias si se comparan con las realizadas con el calentamiento convencional. Este tipo de radiación se caracteriza por una alta penetrabilidad en los materiales así como por su rapidez, fácil manipulación y rápida transferencia a la totalidad de la muestra sin sobrecalentamiento de la superficie [39].

Las microondas son ondas electromagnéticas cuyo intervalo de frecuencias oscila entre 3×10^2 - 3×10^5 MHz. En este intervalo la radiación interacciona con la materia provocando el desplazamiento de los iones y tránsitos en los niveles energéticos de rotación de las moléculas [40].

Los procesos más importantes llevados a cabo utilizando la energía de microondas son la extracción (extracción asistida por microondas, MAE) y la digestión. En el primer caso se utilizan disolventes orgánicos para extraer los

componentes orgánicos de la muestra y en el caso de la digestión se utilizan ácidos para disolver la muestra destruyendo su parte orgánica para el análisis elemental.

El sistema para la digestión de la muestra utilizando energía de microondas consiste en un horno de microondas, un carrusel giratorio que sostiene varias bombas de digestión, y un sistema de control de la operación pudiendo llegar a controlar la presión y temperatura de las bombas (Figura 3). Los recipientes que contienen la muestra son normalmente recipientes de alta presión, normalmente están hechos de polímeros resistentes a elevadas temperaturas, frecuentemente de policarbonatos o PTFE resistentes químicamente. Los sistemas diseñados para digestiones fuertemente ácidas utilizadas para el análisis de metales incluyen frecuentemente una línea de separación que indica la parte del recipiente que es químicamente más resistente y puede ser cambiada si se deteriora por corrosión debido a la elevada acidez de los reactivos de la digestión o por las elevadas temperaturas en la bomba de digestión.

Cada bomba tiene una válvula de presión que da salida a los humos ácidos a través de un tubo que debe de conectarse a una campana. Las válvulas de presión son fijas para que la muestra se caliente bajo una determinada presión, permitiendo que las temperaturas sean más altas y la digestión más rápida que en el caso de un recipiente abierto [27].

La digestión ácida con microondas se puede llevar a cabo en bombas de baja y alta presión. Con las bombas de alta presión, las condiciones necesarias para la digestión total de la muestra se alcanzan rápidamente favoreciendo la ausencia de pérdidas de analito por fenómenos de volatilización, inconveniente que es frecuente en las bombas de baja presión.

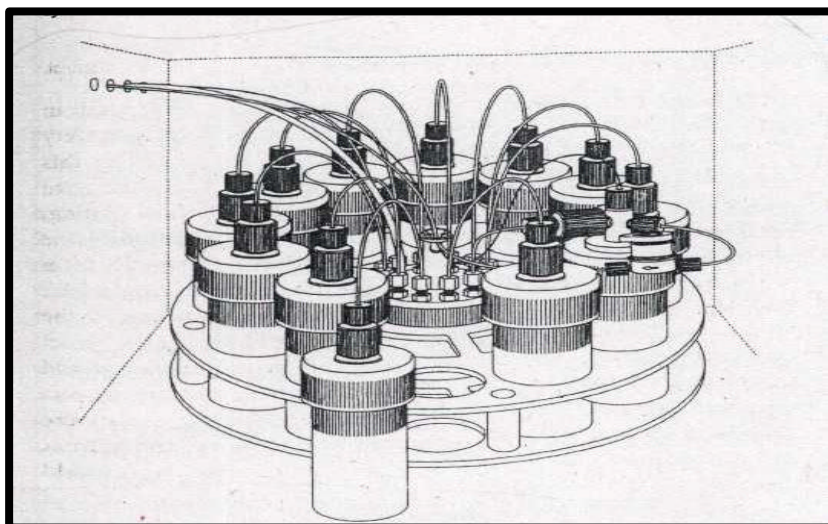


Figura 3. Cavidad de microondas con las 12 bombas de digestión en línea y las sondas de presión y temperatura

Este tipo de energía ha sido una técnica que se ha utilizado mucho como método de preparación de la muestra en los últimos años debido a las ventajas que presenta sobre la digestión ácida convencional [41]:

- El tiempo de la digestión se reduce de modo significativo (de 2 a 5 veces menos)
- Se reduce la contaminación de la muestra
- Se reduce la cantidad de reactivos y de muestra a utilizar
- La pérdida de especies volátiles también se reduce
- Mayor seguridad para el analista

Las microondas con propósitos analíticos son muy utilizadas en diferentes áreas que incluyen el análisis clínico, alimentario y medioambiental. Actualmente es muy común la presencia de diferentes aparatos de microondas, tanto en laboratorios de rutina como de investigación, que pueden ser desde hornos domésticos (multimodal, la energía de microondas se dispersa dentro de la cavidad) hasta sofisticados sistemas de tratamiento continuo o de digestión focalizada (monomodal, la energía de microondas se aplica directamente a la muestra) [42,43].

2.4 Tratamiento de la muestra sólida utilizando la energía de ultrasonidos

Aunque los químicos analíticos han mostrado poco interés en el uso de ultrasonidos, su potencial generalmente sobrepasa a otras energías auxiliares; así, la energía de ultrasonidos es de gran ayuda en el pretratamiento de muestras sólidas [44], ya que facilita y acelera etapas como la extracción de compuestos orgánicos e inorgánicos [45-51], la dispersión en suspensiones [52], homogeneización [53] y otras operaciones como la nebulización [54], el lavado [55] y la derivatización [56].

Las ondas del sonido son vibraciones mecánicas en un sólido, un líquido o un gas. Los ultrasonidos tienen una frecuencia mayor que el intervalo de audición humano (1-16 kHz). La frecuencia más baja de ultrasonidos es normalmente alrededor de los 20 kHz. Este tipo de ondas son intrínsecamente diferentes de las ondas electromagnéticas, ya que estas últimas pueden atravesar el vacío, mientras que las ondas del sonido viajan a través de la materia, provocando ciclos de expansión y compresión a través del medio. En un líquido, el ciclo de expansión produce presiones negativas. Si la energía de ultrasonidos es suficientemente fuerte, el ciclo de expansión puede generar burbujas en el medio [57]. Esto ocurre cuando la presión negativa ejercida excede la fuerza local de tensión del líquido, la cual varía en función de la naturaleza y la pureza del mismo. Este fenómeno disminuye con los líquidos desgasificados o como consecuencia de un aumento en la presión hidrostática. El proceso de formación de burbujas se puede dividir en dos clases: el transitorio y el estable. Las burbujas estables oscilan alrededor de algún tamaño de equilibrio, mientras que las burbujas transitorias existen normalmente en un ciclo acústico, aumentando su tamaño durante este ciclo y rompiéndose en burbujas más pequeñas. Los diferentes procesos que tienen lugar en la formación de burbujas se pueden ver afectados por parámetros como el medio líquido, la intensidad de la presión y la presión hidrostática, entre otros factores. Así, la formación de burbujas dentro del medio líquido provoca una disminución de la frecuencia de ultrasonidos que permite el crecimiento de la burbuja para que se pueda producir la rotura del líquido.

Las fuentes de energía de ultrasonidos utilizadas actualmente se basan en el efecto piezoeléctrico descubierto por Curie (1880). Los sistemas de

ultrasonidos llevan incorporados transductores que están basados en los cambios de las dimensiones de algunos materiales al aplicarle un potencial eléctrico a través de caras opuestas. Cuando el potencial se modula a elevada frecuencia, el material convierte la energía eléctrica en energía mecánica. Un potencial alterno suficientemente elevado da lugar a la generación de energía de ultrasonidos [58].

La energía de ultrasonidos se puede aplicar a sistemas químicos utilizando baños de ultrasonidos o sondas (Figura 4). Ambos sistemas están basados en un transductor electromagnético como fuente de la energía de ultrasonidos, normalmente operando a una frecuencia fija de 20kHz. En el caso de los baños de ultrasonidos el transductor se coloca normalmente debajo del tanque de acero. Un factor importante que condiciona la eficacia de la extracción es la posición del recipiente donde tiene lugar la extracción dentro del baño de ultrasonidos. Así, en el caso de un baño que tenga un solo transductor en su base, la máxima eficacia de la extracción tendrá lugar cuando el recipiente donde tiene lugar la extracción se coloque justo encima del transductor, es decir, los efectos de la radiación son mayores cuanto más cerca se coloque el recipiente de extracción del transductor de energía.

La principal característica que hace ventajosa la aplicación de las sondas en muchos procesos químicos frente a los baños de ultrasonidos es que la energía de ultrasonidos no se transfiere a través del medio líquido al recipiente de extracción, sino que es introducida directamente en el sistema y no sufren fenómenos de “agotamiento” de la energía. A pesar de estas ventajas, en muchos casos el pretratamiento de la muestra para la extracción de metales se continúa llevando a cabo utilizando baños de ultrasonidos, ya que éstos ofrecen resultados muy satisfactorios, además de ser menos costosos y más simples.

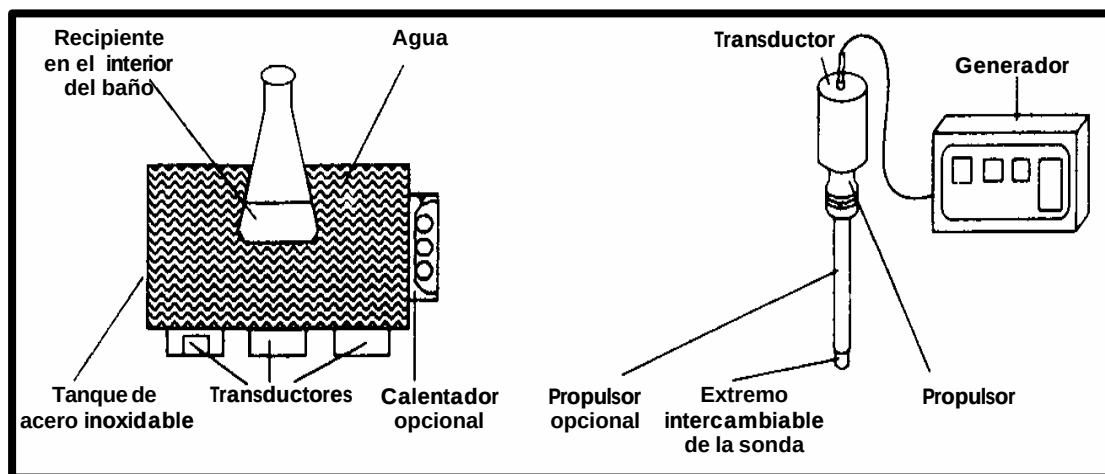


Figura 4. Esquema de un baño y de una sonda de ultrasonidos

La sonda de ultrasonidos consiste en los componentes siguientes (Figura 4):

- Un generador que es la fuente de la frecuencia eléctrica alterna (normalmente 20 kHz). Este generador permite ajustes para la optimización del proceso.
- Un transductor (convertidor) que convierte la energía eléctrica en vibraciones mecánicas.
- Un propulsor (emisor) que consiste en una pieza de titanio o de una aleación de aluminio que se encuentra entre el transductor y el resto de la herramienta ultrasónica. Su función es transmitir las vibraciones al resto del sistema.
- El bloque de acero o de una aleación de titanio, que proporciona una masa por debajo de los discos cerámicos del transductor que equilibra el movimiento del mismo.
- Un propulsor opcional, que altera la amplitud de vibración, normalmente aumentándola. Consiste en una pieza hecha normalmente de una aleación de titanio que une el propulsor con el extremo de la sonda, permitiendo que la vibración del extremo superior se transmita al sistema químico.
- El extremo de la sonda (sonotrodo). Esta es la única parte del sistema que se puede cambiar entre procesos distintos. Pueden ser de diferentes

formas, tamaños y materiales (acero, acero inoxidable, aleación de titanio, cerámica) en función de la aplicación de la sonda.

Desde el punto de vista analítico las ondas de ultrasonidos son de gran interés pues dan lugar a un movimiento rápido del fluido originándose radicales libres, dispersando las capas químicas de las sustancias y acelerando el contacto entre los ingredientes de una reacción. Generalmente, los efectos de la energía de ultrasonidos son mucho más intensos en sistemas químicos heterogéneos que en los homogéneos, debido a que se favorece la formación de emulsiones y la transferencia de masa en un sistema de dos fases aumenta [58]. Así, uno de los principales usos de la energía de ultrasonidos es la aceleración del proceso de extracción utilizando ácidos o bases diluidas [59,60]. En este proceso esta energía constituye un medio muy efectivo para extraer un determinado número de analitos de diferentes tipos de muestras, tales como muestras biológicas [61,62], medioambientales [62-70] y alimenticias [71-74]. En muchos casos la utilización de este tipo de energía proporciona recuperaciones cuantitativas de los analitos de interés y reemplaza tediosos procedimientos que implican el uso de ácidos concentrados y la aplicación de elevadas temperaturas y/o presiones.

2.5 Tratamiento de la muestra sólida sin utilizar energía

2.5.1 Extracción con fluidos supercríticos

La extracción con fluidos supercríticos es una técnica de separación continua no cromatográfica que está basada en el establecimiento del equilibrio de la muestra sólida y el propio fluido supercrítico. Es una técnica que, si se compara con los métodos tradicionales de extracción, ofrece interesantes posibilidades ya que es una técnica limpia que minimiza las interferencias en la extracción además del uso de reactivos tóxicos [75].

Un fluido supercrítico no es ni un líquido ni un gas, pero en ciertos aspectos se comporta como un líquido y en otros como un gas, por tanto dentro de sus propiedades encontramos aspectos que son como los de un gas y otros que son como los de un líquido [76] (Figura 5).

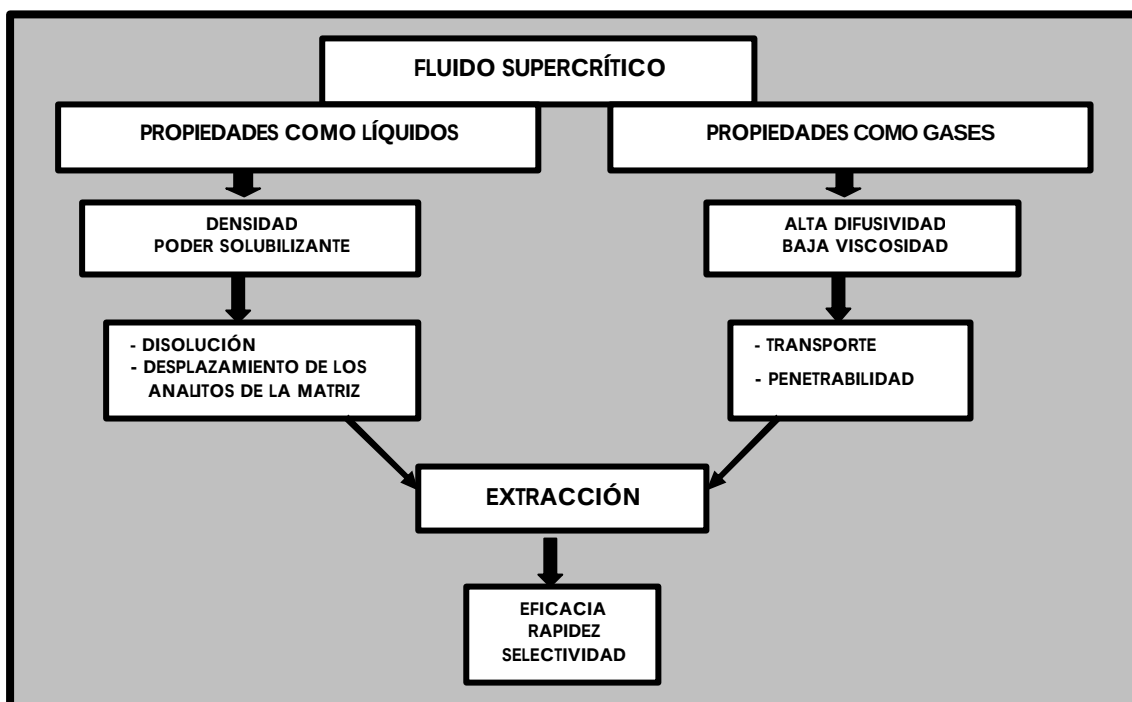


Figura 5. Relación entre las propiedades básicas de los fluidos supercríticos y la extracción con dichos fluidos

La densidad de un fluido supercrítico depende ampliamente de la presión y la temperatura a la que se encuentre el fluido, pero en cualquier caso su valor está próximo a los valores típicos de los líquidos. Esta es la causa de sus buenas propiedades disolventes, ya que las interacciones entre las moléculas del fluido y las del soluto son fuertes.

Los valores de viscosidad de estos fluidos están entre los que presentan los estados líquido y gaseoso, lo que les proporciona unas características hidrodinámicas más favorables si se comparan con los líquidos.

Por otra parte, la bajísima tensión superficial permite una alta penetrabilidad de los mismos a través de los sólidos porosos y matrices empaquetadas.

En los fluidos supercríticos, los solutos tienen valores de coeficientes de difusión intermedios entre los que presentan en los líquidos y los gases. Debido a que los coeficientes de difusión en estos fluidos son mayores que en el líquido, la transferencia de masa es favorable. Además, la alta difusividad y la baja viscosidad tienen gran importancia en los procesos de extracción, pues mejoran tanto la velocidad como la eficacia del proceso.

Aunque los fluidos supercríticos no tienen mayor poder disolvente que los líquidos, tienen mayor potencial de extracción debido a otras características analíticas. En estos fluidos las limitaciones en la transferencia de masa son las que determinan de manera concluyente la velocidad con la que se puede realizar la extracción. Puesto que la difusividad de los solutos en los fluidos supercríticos son de un orden de magnitud más bajas (10^{-4} frente a 10^{-3} Ns/m²) que los disolventes líquidos, sus características de transferencia de masa son mucho mejores que en el caso de los líquidos. Esto se traduce en una mayor rapidez en la extracción con este tipo de fluidos. Así, de forma general, la extracción con fluidos supercríticos se completa en 10-60 minutos, mientras que los tiempos de extracción por ejemplo con un dispositivo Soxhlet oscila desde varias horas a días.

Los fluidos supercríticos más utilizados son el CO₂ y el N₂O.

La presencia de un modificador en un fluido supercrítico ejerce una gran influencia en las relaciones de los ingredientes en un sistema analítico de extracción. Fundamentalmente afecta a las interacciones fluidos supercrítico/analito y fluido supercrítico/matriz alterando la solubilidad, hinchamiento, la interacción de los analitos en los sitios activos de la matriz, etc. El uso adecuado de modificadores mezclados en pequeña proporción con el fluido supercrítico abre insospechadas posibilidades de mejora en la extracción y amplía su campo de aplicación.

3. DETERMINACIÓN DE METALES

Hay una gran variedad de técnicas que permiten llevar a cabo la determinación de metales, pero la más utilizada es, con diferencia, la Espectrometría de Absorción Atómica.

La Espectrometría de Absorción Atómica (AAS) es una técnica de determinación muy sensible, rápida, segura y versátil. La AAS permite la detección del elemento de interés en concentraciones de partes por millón (atomización con llama) o de partes por billón (atomización electrotérmica), independientemente de la forma en que se encuentre el metal en la muestra. Normalmente, el análisis se puede llevar a cabo en presencia de otros elementos sin tener que separar el analito de interés, lo que supone una gran ventaja en cuanto a simplicidad del método, tiempo de análisis y errores en el proceso analítico global [77]. La precisión alcanzada con estas metodologías, para absorbancias mayores de 0,1 ó 0,2, es de 0,3-1,0% con atomización con llama, y de 1-5% con atomización electrotérmica; la exactitud se encuentra entre un 0,5-5%, ya que viene limitada por el error aleatorio y el ruido [33].

En la AAS existen dos tipos de interferencias [78]:

Espectrales. Este tipo de interferencias pueden ser debidas a:

- La absorción de otro elemento diferente al elemento de interés a la longitud de onda utilizada en la determinación. Este tipo de interferencia es muy poco habitual, ya que las líneas de emisión de las lámparas de cátodo hueco son tan estrechas que sólo absorbe radiación el elemento de interés.
- Absorción de fondo. Este tipo de interferencia tiene lugar cuando se produce una atomización incompleta de la muestra y se tienen partículas que disipan parte de la energía procedente de la lámpara

de cátodo hueco que debería de llegar al detector. Este tipo de interferencia se puede eliminar aumentando la temperatura de la llama, asegurando así, una completa atomización de la muestra. Sin embargo, la tendencia más actual consiste en la incorporación en la instrumentación de diferentes correctores de fondo.

Químicas. Este tipo de interferencias se pueden clasificar en tres grupos:

- Interferencias de transporte. Este tipo de interferencias tiene lugar cuando se ven afectados los caudales de aspiración, nebulización o de transporte en la llama. Éstas no suelen tener lugar en instrumentos con cámara de grafito, al contrario que en el caso de los instrumentos que incorporan una llama, donde este tipo de interferencias pueden causar errores de gran importancia. Factores como la viscosidad, la tensión superficial, la presión de vapor y la densidad de la disolución de la muestra pueden influir en la velocidad de transporte de la muestra en la llama. La concentración de ácidos, los disolventes orgánicos o los sólidos disueltos pueden afectar a la absorbancia del analito. Para eliminar este tipo de interferencia se lleva a cabo el método de la adición.
- Interferencias por formación de compuestos térmicamente muy estables. Estas interferencias son debidas a la presencia de reactivos que se combinan con el elemento de interés formando un compuesto térmicamente muy estable. Esto da lugar a un resultado erróneo, ya que parte del elemento de interés se encuentra formando parte de este compuesto. Así, la población atómica existente en la llama es menor, pues parte del analito de interés no se ha atomizado, dando lugar a una absorbancia errónea más baja que la correcta.
- Este tipo de interferencia tiene lugar en la determinación de calcio y de magnesio en presencia de aluminio, silicio o fosfatos [33,77,79,80]. Hay diferentes soluciones para eliminar estas interferencias. Una de ellas es aumentar la temperatura de la llama, lo que dará lugar a una mayor disociación de los compuestos interferentes formados. Esto se consigue utilizando una llama óxido nitroso-acetileno en lugar de una llama aire-

acetileno [81,82]. Sin embargo, este no es el método más utilizado, pues este tipo de llama implica un mayor peligro para el analista y aumenta considerablemente la posibilidad de tener otro tipo de interferencias (de ionización). La solución más utilizada para eliminar este tipo de interferencias es añadir otro elemento que compita con el analito de interés en la unión con la especie interferente. En el caso del calcio y el magnesio, se añade estroncio o lantano para minimizar la interferencia causada por el fosfato. Otra manera de eliminar esta interferencia es añadir reactivos complejantes, como el AEDT o la 8-hidroxiquinolina en el caso del calcio y el magnesio, los cuales forman un complejo estable con el elemento de interés, no dejando así que reaccionen con la especie interferente.

- Interferencias por ionización. La ionización de los átomos del analito de interés en la llama puede causar una interferencia muy significativa, ya que hay que tener en cuenta que las líneas de absorción y emisión de los átomos y de los iones del mismo elemento son diferentes. La ionización aumenta a medida que aumenta la temperatura de la llama. Normalmente este tipo de interferencias no tienen lugar en llamas de aire-acetileno, ya que la temperatura de este tipo de llamas no es muy elevada; sin embargo, estas interferencias suelen ser problemáticas en llamas óxido nitroso-acetileno con elementos cuyos potenciales de ionización son menores o iguales a 7,5 eV. La ionización del elemento de interés se elimina añadiendo a la muestra elementos fácilmente ionizables, como es el caso del potasio, llamados supresores de la ionización. Así cuando estos elementos se ionizan, aumenta la concentración de electrones en la llama desplazando el equilibrio de ionización de los demás elementos hacia la forma atómica.

En general, estas interferencias son más importantes en el caso de la atomización electrotérmica que en el caso de la atomización con llama. Por ello, a pesar de que los límites de detección obtenidos con la atomización electrotérmica son 10-1000 veces menores que los obtenidos con la atomización con llama, se prefiere la utilización de esta última para la determinación de los metales [33].

4. INTRODUCCIÓN DIRECTA DE LA MUESTRA SÓLIDA EN LAS TÉCNICAS DE ABSORCIÓN ATÓMICA

Uno de los principales objetivos de la Química Analítica es mejorar las operaciones previas al análisis minimizando la participación humana y la manipulación de la muestra en las mismas. En esta línea están cobrando gran interés aquellos procesos analíticos en los que se evita la digestión de la muestra, y en su lugar se consideran principalmente dos formas de muestreo [83]:

- Muestreo directo del sólido
- Muestreo en forma de suspensión

En el muestreo directo del sólido, la muestra es directamente introducida en el atomizador y atomizada en su estado sólido. Las principales ventajas que presenta esta forma de muestreo son la poca cantidad y manipulación de la muestra (evita riesgos de contaminación de la misma y pérdidas de analitos), el poco tiempo necesario para obtener resultados y la no utilización de reactivos peligrosos como son los ácidos fuertes, lo que supone un beneficio tanto económico como medioambiental. Como resultado, el proceso analítico es más simple y los límites de detección son bajos [84,85]. Sin embargo, esta técnica lleva asociada algunas limitaciones como es la incapacidad de lograr calibraciones con los patrones, la presencia de interferencias de matriz [86], la no homogeneidad de la muestra o del tamaño de partícula [87], la pobre precisión de los resultados [88] y la necesidad de diseñar atomizadores especiales [89,90].

El muestreo en forma de suspensión consiste en introducir la muestra como una alícuota de una suspensión estable en el atomizador. Este método no presenta ningún riesgo en cuanto a pérdidas de la muestra durante la preparación de la misma ya que es un método muy sencillo, no se necesitan

reactivos agresivos y permite hacer calibraciones con simples disoluciones acuosas a las que se les puede añadir modificadores en estado líquido [91-94].

El principal problema que presenta este tipo de muestreo es mantener la homogeneidad de la suspensión mientras la muestra es introducida en el atomizador del detector analítico [95]. Para que una suspensión sea homogénea hay que estudiar el diluyente, el tamaño de partícula de la muestra y, en su caso, el agente estabilizante adecuado [96,97]. Para solucionar el problema de la homogeneidad de la suspensión se han utilizado desde diferentes dispositivos, que van desde agitadores magnéticos y agitadores ultrasónicos [98-101] hasta la adición de agentes estabilizadores [102].

5. ANÁLISIS POR INYECCIÓN EN FLUJO

El Análisis por Inyección en Flujo ha sido una importante innovación metodológica en la automatización de procesos analíticos [103]. La denominación de esta modalidad de métodos de análisis continuo como “Análisis por Inyección en Flujo” (FIA) fue propuesta en 1975 por Ruzicka y Hansen [104,105] y fue aceptada por la comunidad científica, a pesar de que algunos autores emplean de manera indistinta la denominación de “Análisis en Flujo No Segmentado”.

La metodología FIA se caracteriza porque el flujo no está segmentado por burbujas de aire, a diferencia de los métodos clásicos de análisis de flujo continuo. La muestra líquida es inyectada o insertada directamente en una corriente de flujo portador. A continuación, se lleva a cabo el transporte del bolo de muestra inyectado a través del sistema. Además del transporte pueden tener lugar diferentes procesos físico-químicos (reacción química, diálisis, extracción líquido-líquido, etc.). La dispersión o dilución parcial del analito en este transporte puede ser perfectamente manipulada mediante un control de las características geométricas e hidrodinámicas del sistema. Se produce una mezcla incompleta, pero reproducible, que da lugar a un gradiente de concentración variable con el tiempo a lo largo de un sistema [104,105]. Así, el FIA es capaz de alcanzar una elevada precisión como resultado de una dispersión de la muestra muy controlada en el sistema de flujo continuo.

El sistema FIA se puede acoplar a un sistema de detección continuo que proporciona una señal transitoria que es convenientemente registrada. En el momento de la detección de la señal no se ha alcanzado ni el equilibrio físico (homogeneización de una porción de flujo) ni químico (reacción incompleta), por ello, las técnicas FIA pueden considerarse dentro de los Métodos Cinéticos de Análisis en su modalidad de medida a tiempo fijo. Por ello, el tiempo de operación debe ser muy reproducible pues las medidas se realizan en

condiciones de no estabilidad, y por tanto, pequeñas variaciones del mismo pueden producir graves alteraciones de los resultados.

Esta metodología tiene un fundamento simple, un dispositivo barato, un manejo sencillo y cómodo y una gran capacidad para lograr unos resultados que son sorprendentes dadas sus características: rapidez, exactitud y precisión. Su extremada versatilidad distingue este tipo de metodología de la mayor parte de las nuevas metodologías analíticas, ya que por una parte puede adaptarse a numerosos métodos de detección y tratamientos de muestras sin cambios técnicamente complejos, y por otra, hay que resaltar lo fácil que es para un investigador analítico intervenir directamente en su funcionamiento, lográndose una optimización del sistema técnico [106]. Además, el FIA presenta como ventajas un gran incremento en el número de muestras analizadas debido a la disminución en el tiempo de análisis, el uso de volúmenes pequeños (del orden de μL) y la eliminación de muchas interferencias.

5.1 Componentes del sistema FIA

Un sistema FIA se compone principalmente de un sistema de bombeo, un sistema de inyección, un sistema de transporte/reacción y un detector (Figura 6) [107, 108].

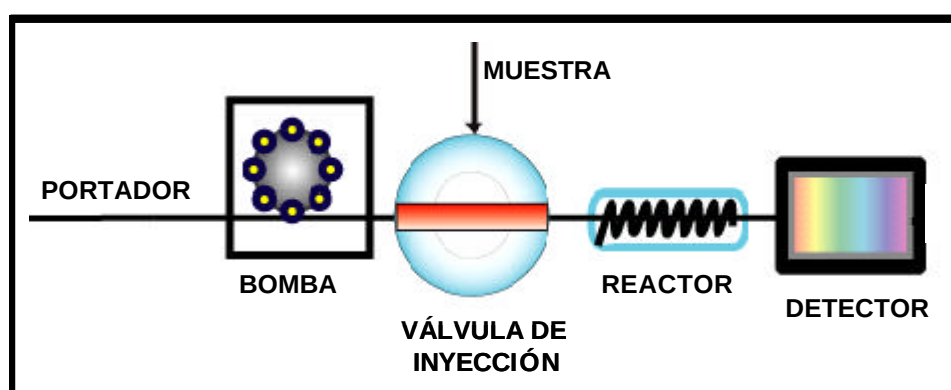


Figura 6. Esquema básico de un sistema FIA

- **Sistema de bombeo.** Establece un caudal lo más constante posible de una disolución, o de varias. Normalmente, el sistema de bombeo es una bomba peristáltica, un sistema de presión por gas o simplemente la fuerza de la gravedad. Este sistema se puede modificar para trabajar a caudales variables, que permiten trabajar con métodos de gradiente o cambios en el sentido del flujo.
- **Sistema de inyección.** Tiene como objetivo situar una zona bien definida de muestra dentro de la corriente de fluido portador que está continuamente en movimiento. El sistema de inyección debe de insertar volúmenes exactos y reproducibles en la corriente de flujo portador de forma que no se generen perturbaciones en el mismo. Además, su manejo ha de ser fácil, cómodo y rápido, de forma que se consiga una elevada frecuencia de muestreo.

El sistema de inyección más comúnmente usado es la válvula hexagonal (tiene seis orificios, tres de entrada y tres de salida). Este sistema puede alcanzar dos posiciones (Figura 7), una de llenado (carga) y otra de vaciado (inyección). Este tipo de válvula proporciona una gran reproducibilidad en los volúmenes suministrados, un amplio intervalo de variación de los volúmenes del bucle, rapidez, facilidad de manejo y capacidad de automatización de la inyección.

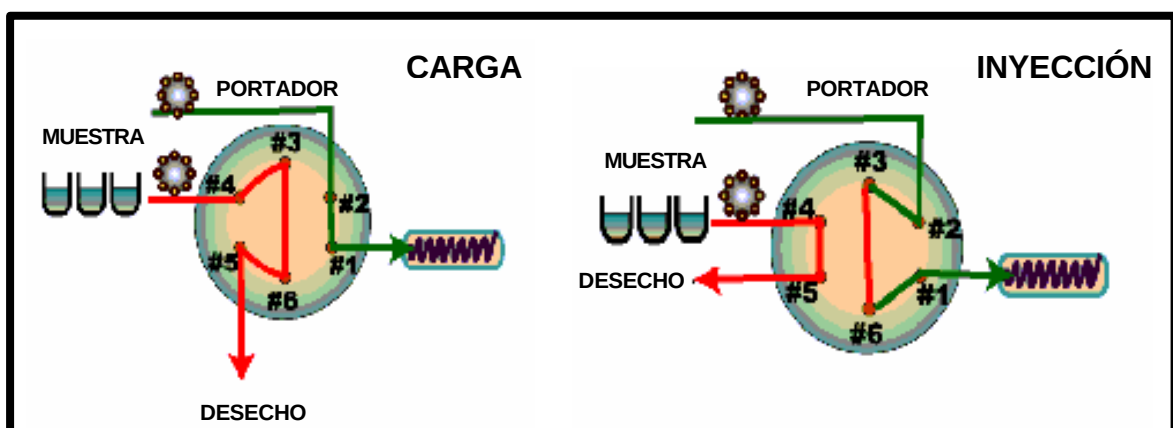


Figura 7. Esquema básico de una válvula hexagonal en sus posiciones de carga e inyección

- **Un sistema de transporte/reacción.** Es una zona de tubería. Los tubos utilizados son de materiales de alta inercia química e inalterables a cambios de temperatura en un amplio rango de la misma. Sus diámetros oscilan entre 0,3-0,8 mm. La unión de los tubos entre sí y con las diversas partes del sistema se realiza por medio de conectores.

En algunos casos la tubería puede estar empaquetada con materiales químicamente activos que transforman la muestra, en otros casos puede incluir mezcladores o módulos de separación en los que se produce un transporte de masa a través de interfases de tipo gas-líquido, líquido-líquido o sólido-líquido.

- **Un sistema de detección.** El detector adquiere la señal y la transduce cuando el bolo de analito pasa a través de él. Pueden ser detectores no destructivos (fluorímetros, fotómetros, potenciómetros, etc.) o destructivos (espectroscopía atómica).

Este sistema básico puede incluir otras configuraciones con modificaciones o añadir otros elementos para conseguir objetivos concretos.

5.2 Métodos continuos de preparación de muestras sólidas

Uno de los objetivos principales de la Química Analítica es el desarrollo de procedimientos de tratamiento en línea de la muestra [109-112], ya que la mayoría de estos procesos se realizan de modo manual y constituyen una importante fuente de error en el proceso analítico global. En este sentido, los sistemas de flujo continuo y, en concreto, el análisis por inyección en flujo (FI A), han demostrado ser muy útiles para la automatización, aceleración y miniaturización del pretratamiento de la muestra.

Los principales problemas que surgen al plantear la automatización del pretratamiento de la muestra en el proceso global son los derivados de la naturaleza de la matriz de la muestra y de la introducción de la misma en el detector. Esta problemática se ha solucionado incorporando diferentes dispositivos acoplados al detector mediante un sistema de inyección en flujo.

Los procesos de pretratamiento de muestras sólidas o muestras con matrices complejas utilizados en flujo continuo se pueden clasificar en tres categorías atendiendo al modo en el que el analito es transferido al sistema de flujo continuo [113]:

- por completa o parcial disolución de la muestra con ayuda de una energía auxiliar
- utilizando una unidad de filtración/diálisis con una membrana estéril para eliminar las partículas interferentes y las macromoléculas presentes en las muestras reales
- aislando el analito de la matriz compleja usando otras técnicas continuas de separación no cromatográficas (difusión gaseosa, extracción líquido-líquido, extracción sólido-líquido, etc.)

5.2.1 Tratamiento de la muestra en línea utilizando energía de microondas

Uno de los métodos más usados para la preparación de la muestra sólida en línea es la digestión ácida asistida por microondas, que puede estar directamente o indirectamente acoplada a diferentes técnicas de detección como la amperometría, la fotometría, emisión atómica (ICP) y la espectrometría de absorción atómica (AAS) [113].

La incorporación de un horno microondas a un dispositivo de inyección en flujo (FI) ofrece muchas ventajas sobre los métodos no continuos, entre las cuales se encuentran la completa automatización del proceso analítico, los menores tiempos de digestión y la exitosa digestión de matrices problemáticas. Además, como la digestión se lleva a cabo en un recipiente cerrado se evitan las pérdidas de analitos volátiles y la contaminación atmosférica, además de que aumenta la seguridad del personal, ya que se reduce la exposición a los vapores de ácidos peligrosos y se minimiza el manejo de reactivos.

En función de que el horno se encuentre antes o después de la unidad de inyección se diferencian dos tipos de sistemas [113]. En el caso en el que el horno se encuentre antes de la unidad de inyección, la muestra es introducida dicho horno en flujo continuo (digestión a presión atmosférica) [114,115] o en

flujo interrumpido ("stopped-flow", a presiones elevadas) [116,117] y tras la digestión, una alícuota es inyectada y conducida hacia el detector. En el otro tipo de sistema, la muestra inyectada en forma de suspensión fluye hasta la unidad de microondas junto con los reactivos de digestión [116,118-121]. En ambos casos, las medidas se pueden hacer parcial o totalmente de modo continuo o no continuo.

Las primeras aplicaciones en línea del microondas estuvieron dirigidas a muestras líquidas como sangre, orina y agua [112,123], pero las tendencias actuales se orientan a resolver los problemas relacionados con el tratamiento de muestras sólidas. Las muestras sólidas requieren sistemas de flujo más sofisticados debido a la necesidad de digestiones en presencia de ácidos muy concentrados con el objeto de destruir rápidamente la materia orgánica en el horno. Para ello se han acoplado los procedimientos de preparación de la muestra que implican su digestión a los diferentes sistemas de detección, y en especial a FAAS, usando procedimientos de flujo continuo e inyección en flujo, pero la completa automatización del proceso analítico no llegó hasta que se comenzó a introducir la muestra en el instrumento de medida en forma de suspensión. Las suspensiones tienen que ser uniformes y, por tanto, se ha de tener una muestra homogénea tanto en composición como en tamaño de partícula.

Debido a la gran cantidad de ventajas que presenta el uso en línea de la energía de microondas, este dispositivo ha sido usado en diferentes campos y sobre todo en muestras de naturaleza compleja. Así, se ha utilizado en diversos estudios como son la determinación cobre y manganeso en diferentes matrices como vegetales, productos dietéticos, lodos marinos, etc. [116, 124], elementos minoritarios en cacao [117], cromo, cobalto y níquel en vegetales [125], hierro en ostras, mejillón y pescados [126] y aluminio, selenio y cadmio en mariscos [127-129] proporcionando buenos resultados. También se ha aplicado en la determinación de metales traza en suelos y sedimentos [130,131] lográndose satisfactoriamente su determinación, con recuperaciones entre el 95-105% de todos los metales objeto de estudio, e incluso, en el estudio del contenido de carbono residual en muestras biológicas [132] y de hierro en silicatos [133].

El uso de esta técnica logra, además de unas buenas recuperaciones del analito a extraer, reducir el consumo de los reactivos oxidantes y del tiempo de análisis, proporcionando una elevada frecuencia de muestreo. Los principales inconvenientes que presentan estos sistemas son que la matriz de la muestra llega al detector, pudiendo ocasionar interferencias, además de la necesidad de incorporar una zona de enfriamiento dentro del sistema FIA, debido a la elevada temperatura que se alcanza en el horno de microondas.

5.2.2 Tratamiento de la muestra en línea utilizando energía de ultrasonidos

La energía de ultrasonidos es un tipo de energía muy utilizada como energía auxiliar para la extracción de una gran variedad de analitos en diferentes tipos de muestras sólidas, ya que acelera considerablemente el proceso de extracción en comparación con otras alternativas. Sin embargo, cuando se trata de procesos de pretratamiento de muestras sólidas en continuo, esta energía se ha utilizado muy poco a pesar de las ventajas que ofrece [134].

El uso de la energía de ultrasonidos ofrece un gran campo de aplicación en muestras sólidas que incluye cualquier muestra en forma de polvo independientemente de su forma o tamaño: plantas, suelos, sedimentos, principios activos farmacéuticos, micronutrientes, contaminantes, etc. La extracción del analito suele ser cuantitativa, por lo que se simplifica la estandarización, ya que se puede realizar con matrices similares a la muestra.

En comparación con la extracción asistida por microondas la extracción utilizando energía de ultrasonidos presenta como ventajas que en ocasiones es más rápida, no necesita elevadas presiones y/o temperaturas y que el procedimiento implica un número menor de operaciones, con lo que se disminuye considerablemente el riesgo de pérdidas y/o contaminación [135-137].

La extracción utilizando este tipo de energía se puede llevar a cabo fácilmente en modo continuo. Esta extracción se puede llevar a cabo de modo continuo utilizando un sistema en el que se incluye una celda o cartucho donde se deposita la muestra. Esta celda contiene unos filtros especiales que permiten el paso de disolución extracción sin provocar

pérdidas de muestra a lo largo del sistema. La radiación de ultrasonidos y el calentamiento (sumergiendo la celda de la muestra en un baño de agua termostatzado) se utilizan como medio físico para acelerar la disolución parcial de la muestra.

En función de la cinética de la reacción se plantean tres tipos de sistema FIA. Cuando la cinética de extracción es rápida, se puede utilizar un sistema abierto, ya que no se necesita tanto tiempo de contacto para extraer el analito objeto de estudio. La disolución extractante pasa a través de la celda con un caudal bajo, el analito es insertado en el flujo de portador de esta disolución extractante y es transportado hacia el detector (Figura 8).

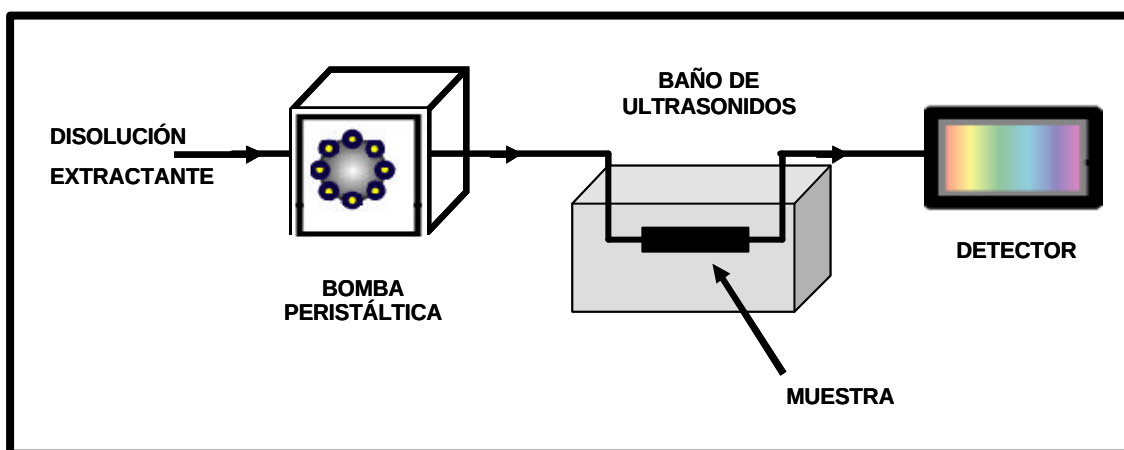


Figura 8. Sistema FIA de extracción en línea utilizando energía de ultrasonidos para reacciones de cinética rápida

En contraposición, si la cinética es lenta, la disolución extractante debe de pasar repetidas veces a través de la celda, y, por tanto, tener un elevado caudal. El paso repetido de la disolución extractante se puede llevar a cabo de dos maneras:

- Utilizando un circuito cerrado (closed-loop) y una bomba peristáltica que impulse la misma proporción de disolución extractante repetidamente a través de la celda que contiene la muestra (Figura 9).

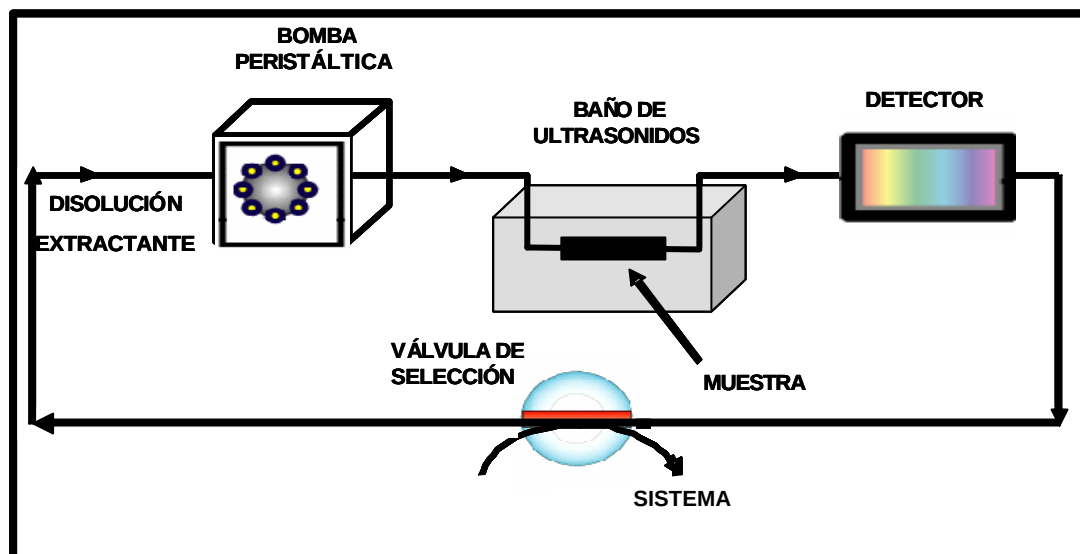


Figura 9. Sistemas FIA cerrado de extracción en línea utilizando energía de ultrasonidos para reacciones de cinética lenta

- Usando una bomba peristáltica programable que cambie cada cierto intervalo de tiempo el sentido del caudal, de manera que un pequeño volumen de reactivo extractante circule a través de la misma en los dos sentidos. De este modo, se alcanza mayor eficacia en la extracción pues se previenen las compactaciones de la muestra en las zonas próximas a la salida de la celda (Figura 10).

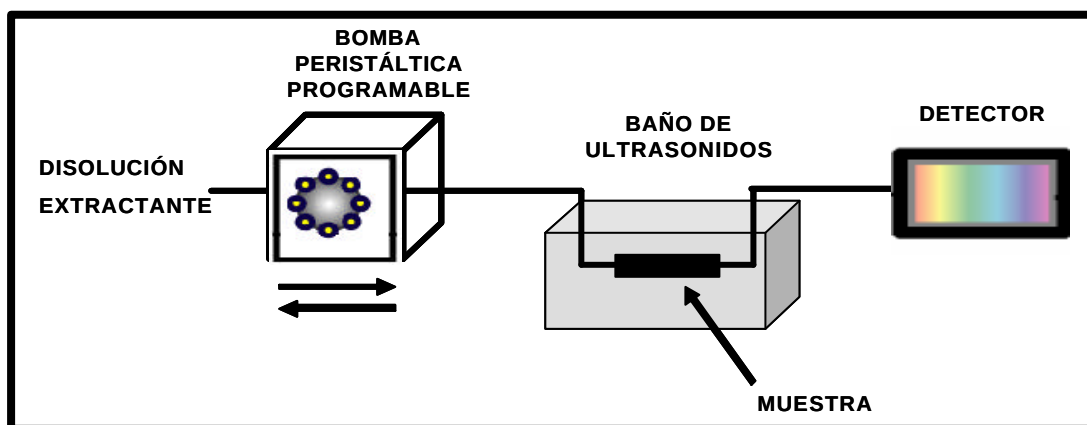


Figura 10. Sistemas FIA de flujo bidireccional de extracción en línea utilizando energía de ultrasonidos para reacciones de cinética lenta

La aplicación de la extracción en línea con ultrasonidos se ha demostrado en estudios realizados con diferentes muestras sólidas. De esta manera, utilizando esta metodología se ha determinado mediante la espectroscopía UV-VIS la cantidad total de boro en suelos [138], el contenido total de hierro [139], cadmio y plomo [140] en plantas, n-metilcarbamatos en suelos y alimentos, hidrocarburos aromáticos nitropolicíclicos [50], cromo [141], herbicidas fenoxiácidos en suelos [142] y macro y micronutrientes en comida para animales [143]. En estos estudios se comprobó que el tiempo de extracción disminuía mucho, obteniéndose aun así excelentes resultados que concordaban con los obtenidos por los métodos manuales estándar.

A pesar de todas las ventajas que presenta la utilización de este tipo de energía, ésta también lleva asociados algunos problemas:

- La posible aparición de una señal del blanco provocada por la parcial disolución de otros componentes de la muestra pues se utilizan muestras en forma de polvo.
- Las diferencias entre muestras del mismo tipo (p.ej. tamaño de partícula o composición de la superficie) pueden dar lugar a resultados no reproducibles.
- Los materiales de referencia con diferentes concentraciones de analito son escasos y/o inexistentes lo que dificulta el trabajo en laboratorios de control rutinario.

Sin embargo, estas desventajas se pueden eliminar homogeneizando la muestra previamente y usando como referencia un método manual estándar. Así, se puede concluir, que la energía de ultrasonidos acoplada en línea en un sistema FIA ofrece grandes posibilidades en el estudio de muestras sólidas proporcionando unos excelentes resultados.

5.3 Acoplamiento FIA-AAS

La utilidad de integrar las técnicas FIA con la espectroscopía atómica ya se tuvo en cuenta desde los primeros desarrollos de la técnica de inyección en flujo. Así, el esquema de un sistema de este tipo es muy simple: el portador, continuamente bombeado, se aspira hasta el nebulizador. La inserción de la muestra en el mismo da lugar a su transporte hacia el nebulizador. Esta técnica presenta una serie de ventajas [103, 144,145]:

- El FIA es el método de menor dispersión para la introducción de la muestra en un espectrofotómetro de absorción atómica. Es rápido y preciso.
- Las muestras con alto contenido salino pueden inyectarse en la corriente del portador sin que después surjan las dificultades características de la aspiración directa. Se reduce mucho el problema de la viscosidad en el nebulizador (es muy común en aspiración directa).
- Durante la aspiración el sistema se lava continuamente.
- El consumo de volumen de muestra es muy pequeño, ya que una de las características comunes de las técnicas atómicas-FIA es el uso de dispersión baja, lo que proporciona una mayor sensibilidad.
- El sistema FIA permite el muestreo repetitivo a considerable velocidad.
- El FIA permite también la introducción de elementos de matriz o estándares internos a la muestra en una corriente de flujo. Estas inyecciones adicionales se pueden hacer en otros puntos a lo largo de la corriente.

El caudal del portador determina el tiempo de respuesta, sensibilidad, precisión y contaminación entre muestras en el nebulizador. Los estudios realizados hasta la fecha han puesto de manifiesto que el caudal a través del sistema FIA no debe ser mayor que la velocidad de aspiración del espectrofotómetro, ya que sino de pueden obtener resultados erróneos.

Los primeros estudios que se hicieron utilizando el acoplamiento FIA-AAS datan de 1979 y, a partir de aquí, dadas sus grandes ventajas, ha habido gran cantidad de trabajos que han utilizado esta técnica incorporando una metodología FIA. En 1988 Burguera y col [146] hicieron uso del acoplamiento FIA-AAS para la determinación de cinc y cadmio en hígado y riñón humanos. También usaron este acoplamiento de la Guardia y col. [116] para determinar manganeso y cobre en diferentes matrices sólidas, Lázaro y col. [139] para la determinación de hierro en vegetales, Tyson y col. [117,147,148] para determinar hierro y cobre en cacao, calcio y cobre en diferentes matrices sólidas, etc.

Estudios más recientes han usado este acoplamiento FIA-AAS para la determinación de hierro, cobre y cinc en complejos vitamínicos [149], plomo en aleaciones [150], cadmio en muestras sólidas [151], y más en concreto, en muestras ambientales [152] y mejillón [153].

6. TÉCNICAS DE OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO

ANALÍTICO: DISEÑOS EXPERIMENTALES

6.1 Introducción

El proceso de diseño y optimización experimental consta de tres etapas fundamentales [154]:

1. Selección de las variables que van a influir de forma significativa sobre el sistema.
2. Selección de la función de respuesta o función objetivo para la evaluación de la superficie de respuesta.
3. Optimización experimental que puede ser de dos tipos:
 - a) **Tipo Analítico** (Tipo simultáneo): que están representados principalmente por el diseño factorial y permiten evaluar la localización del óptimo por la derivación de la ecuación “superficie de respuesta”.
 - b) **Tipo Caja Negra** (Tipo secuencial): que están representados principalmente por el Método Simplex Geométrico y permiten un desconocimiento total del sistema a estudiar, ya que cada experimento se establece a partir de la evaluación de los resultados de los experimentos anteriores.

Este trabajo de investigación se centra en la utilización de diseños factoriales.

6.2 Métodos de optimización

La optimización con diseños experimentales presenta diversas ventajas frente a la optimización variable a variable [155]. Este último método consiste en fijar

todas las variables que afectan al sistema, excepto una, en unos valores de partida elegidos en base a nuestros conocimientos del sistema, o en el peor de los casos si no se tiene conocimiento alguno del sistema, en base a la intuición. Una vez establecidos los valores de partida, se realiza un número de experimentos cambiando el valor de la variable que no se ha fijado y se selecciona el valor que produzca un mejor resultado para dicha variable. A continuación, se realiza la misma operación con todas las variables, de una en una, hasta que el proceso de búsqueda produzca un resultado óptimo.

El primer inconveniente que se puede observar en la optimización variable a variable con respecto a la optimización usando diseños experimentales, es el consumo de tiempo y dinero que conlleva averiguar el óptimo del proceso. Otra desventaja adicional es que el primer modo de optimización presupone que todas las variables del sistema son independientes puesto que existe un cierto desconocimiento del sistema, lo que puede provocar errores en la búsqueda del óptimo.

Estos inconvenientes han sido la causa del planteamiento de otras técnicas de optimización, como es el caso de los diseños experimentales que proporcionan unos resultados excelentes y evitan todas estas desventajas.

6.3 Diseño factorial

Es un tipo de diseño experimental muy conocido que se suele emplear en la investigación de superficies de respuesta multifactor.

Para realizar un diseño factorial completo, el investigador selecciona un número fijo de niveles para cada una de las variables del sistema (factores) y luego realiza los experimentos teniendo en cuenta todas las combinaciones posibles de dichas variables.

Para conocer un sistema es necesario establecer las características de la superficie de respuesta representadas frente a uno o más factores. Estos diseños además de permitir variar simultáneamente de forma sistemática varios factores en cada experiencia, permiten revelar la existencia de interacciones entre ellos cuando están presentes en un sistema.

Históricamente los diseños factoriales fueron introducidos por R. A. Fisher. Este investigador demostró que todos los factores de interés podrían ser variados simultáneamente, además de poder ser estimados los efectos de los factores individuales y sus interacciones por tratamientos matemáticos.

Los parámetros que verdaderamente describen un diseño son el número de factores involucrados (k) y el número de niveles de cada factor (m), siendo m_k el número de combinaciones de factores generado para un diseño factorial completo. Los de uso más habitual son los diseños factoriales completos a dos niveles, en los cuales a cada variable se le dan dos valores a ambos lados de un valor central o básico. Este tipo de diseños a dos niveles es importante por varias razones [156]:

- 1.- Requieren relativamente pocos experimentos elementales para cada variable, y a pesar de que no permiten explorar exhaustivamente una amplia región del espacio, pueden indicar tendencias, y así determinar una dirección prometedora a la hora de realizar nuevos experimentos con otro tipo de diseños factoriales que proporcionen una información más amplia acerca del óptimo.
- 2.- Estos diseños se pueden aumentar de modo apropiado y sencillo para formar diseños compuestos.
- 3.- Éstos también forman la base de los diseños fraccionales a dos niveles.
- 4.- Estos diseños y sus correspondientes fraccionales pueden ser utilizados en bloques para construir diseños con un grado de complejidad que se ajuste a la sofisticación del sistema.
- 5.- La interpretación de los resultados es muy sencilla y se puede realizar en gran parte con sentido común y aritmética elemental.

En aquellos casos en los que la superficie de respuesta se aproxima bastante bien a un polinomio lineal no es necesario realizar todos los experimentos del diseño factorial completo 2^n (un hiperplano). En este caso se realiza un diseño fraccional con 2^{n-1} experimentos que sólo es aceptable para superficies planas y donde no existen interacciones entre las distintas variables.

En regiones próximas al óptimo resulta necesario utilizar polinomios de mayor grado para ajustar éste a la superficie de respuesta. Para poder estimar los coeficientes del polinomio de segundo grado, el experimento debe diseñarse de forma que contenga tres niveles para cada una de las variables objeto de estudio, ya que los factoriales a dos niveles sólo pueden proporcionar información para superficies que se ajusten a polinomios de tercer orden. Los diseños experimentales a tres niveles provocan un gran número de experimentos si el número de variables es elevado (3^n); sin embargo, este número de experimentos se puede reducir utilizando un diseño composicional o también llamado diseño de experimentos secuencial.

Esta metodología es considerada como una herramienta para conseguir modelos empíricos que utilizan técnicas secuenciales de experimentación para reconocer un campo de interés y focalizar en él las variables más importantes y sus efectos. Ésta fue desarrollada por Box, Wilson y Youle a principios de 1950.

Los atributos deseables de los diseños de superficie de respuesta son la ortogonalidad y rotabilidad.

La ortogonalidad consiste en permitir alcanzar regiones de confianza simétricas en todas las dimensiones (círculos y esferas), opuestamente a los asimétricos que conducen a regiones asimétricas (elipse y ovoides). Las regiones simétricas son más pequeñas que las asimétricas, por lo que los intervalos de confianza individuales son más pequeños para los diseños ortogonales que para los no ortogonales.

Un diseño es rotable si la función de varianza es constante a distancias fijas desde el origen del espacio del diseño. Si un diseño tiene esta propiedad cualquier rotación del mismo en el espacio considerado genera idénticas varianzas.

Los diseños de superficie de respuesta son más adecuados cuando se requieren datos cuantitativos sobre la forma de actuar de las distintas variables que afectan al sistema, a diferencia de los de Screening que son adecuados para construir modelos generales cualitativos acerca de la influencia de estas variables.

6.3.1 Diseños factoriales de Screening. Diseños de Plackett-Burman

Cuando un sistema es poco conocido resulta muy difícil decidir cuales son las variables que se deben de considerar a la hora de optimizarlo. Algunas de esas variables pueden resultar evidentes aunque no se puedan descartar otras que sean menos aparentes puesto que no se conoce su influencia en la respuesta del sistema objeto de estudio. La solución más obvia sería considerarlas todas, de esta forma, el número de experimentos haría inviable la aplicación de un diseño factorial completo.

Para abordar estas situaciones se utilizan los diseños factoriales de Screening. Este tipo de diseños tiene como objetivo el distinguir entre un elevado número de factores aquellos que sean influyentes en el sistema [157]. Dentro de los diseños factoriales de Screening los más usados son los de Plackett-Burman, también denominados diseños cíclicos. Estos diseños están basados en una extensión del sistema estadístico de los cuadrados latinos que permiten reducir enormemente el número de experimentos a realizar. Proporcionan datos de gran utilidad, como es el caso de las variables que afectan significativamente al sistema, con la fiabilidad que se le quiera imponer al estudio.

La matriz de diseño se va a construir a partir de una primera fila dada en el trabajo original de Plackett-Burman [158,159] en el que están disponibles los diseños para 8, 12, 16... variables en bloques de 4 hasta 100, es decir, combinaciones de factores que son múltiplos de 4. Esta fila se va desplazando cíclicamente (diseños cíclicos) en una posición, $N-2$ veces, hasta completar la matriz cuya última fila está formada por los niveles inferiores de todas las variables. A estos estudios se les conoce como matrices de diseño Hadamard [160], diseños factoriales fraccionales $2^{(k-p)}$ [161] y matrices ortogonales [162].

Para mantener la ortogonalidad el número de veces que aparecen los niveles altos (+1) en la matriz debe de ser igual al número de veces en que lo hacen los niveles bajos (-1). Si se dispone de la primera fila, la construcción de estas matrices es muy sencilla, aunque no es aplicable a cualquier número de variables por cuestiones de ortogonalidad. Si el número de variables es menor que 7 y se quiere aplicar un diseño de Plackett-Burman es necesario considerar que las variables sobrantes (el número mínimo de variables en este diseño es 7) son “falsas” o “postizas”. Estas variables darán unos coeficientes en la ecuación del modelo muy pequeños o nulos. Como se reducen los experimentos, en comparación con el diseño factorial completo, también se pierden grados de libertad lo que va a provocar un efecto de confusión para cada variable respecto de los términos de interacción; esto mismo ocurre para las variables “falsas”, y por tanto, sus coeficientes incluirán efectos de interacción de los demás. Estos efectos van a proporcionar dos tipos de información:

- Saber hasta qué punto las interacciones son despreciables.
- Si no existen interacciones, es una forma de evaluar los errores puramente experimentales.

Por tanto, a partir de las variables “falsas” se va a obtener información acerca de los efectos de confusión de las variables verdaderas; si se ha incluido más de una variable “falsa”, se tendrá el conocimiento acerca de la existencia o no de interacciones [163].

En este trabajo de investigación, el paquete estadístico Statgraphics Plus versión 4.0. es quien proporciona la matriz [164].

Una vez conocidas las posibles variables que afectan al sistema se puede definir el diseño factorial. Este diseño ahorrará tiempo y dinero, ya que gracias a él se reduce el número de experimentos a realizar para la resolución del sistema.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El interés de la determinación de metales en alimentos tiene dos vertientes principales, la nutricional y la toxicológica. Para poder diferenciar entre el carácter esencial o tóxico de un metal para el organismo humano es necesario conocer la concentración en la que se encuentra dicho metal en los alimentos, ya que todos los metales son probablemente tóxicos si se ingieren en determinadas cantidades. Además, en algunos casos, se obtiene a su vez información de carácter medioambiental. Esto se debe a que algunos organismos que constituyen parte de la dieta humana, como pueden ser moluscos, pescados y vegetales, acumulan y concentran los metales presentes en el medio en el que se encuentran. Actúan así como bioindicadores ambientales, y analizando este tipo de muestras se obtiene información acerca del grado de contaminación del medio que los circunda. Estas son las razones principales que justifican la necesidad de un control riguroso del contenido de los metales en los alimentos.

Generalmente, el análisis de metales traza en muestras sólidas requiere la obtención de una disolución adecuada de las mismas para que pueda ser introducida en el instrumento analítico. Por tanto, estas muestras sólidas han de ser sometidas a pretratamientos que constituyen la etapa más tediosa del proceso analítico, y en consecuencia, que consumen mayor tiempo con respecto a las etapas de determinación y tratamiento de los datos. Esto es debido a que el grado de automatización alcanzado en esta primera etapa del proceso analítico no es comparable con el que se ha logrado en su segunda y tercera etapa, ya que son procesos de naturaleza variada y difíciles de automatizar. Además, en esta primera etapa del proceso analítico, los riesgos de contaminación por otras sustancias y de pérdidas de analitos de las muestras son más elevados debido a la gran manipulación que sufren las mismas. En este sentido, el análisis por inyección en flujo (FIA) ha demostrado ser una herramienta muy útil para la automatización y miniaturización de los procesos incluidos en la primera etapa del proceso analítico.

Cuando se lleva a cabo el análisis de una muestra sólida, esta puede ser soluble en agua, en disolventes orgánicos o en disoluciones ácidas o alcalinas. Si la muestra es soluble en agua, como ocurre con determinados alimentos (leche en polvo, fórmulas infantiles, café soluble, cacao soluble, etc.) y sales, etc., la disolución se lleva a cabo mediante agitación manual o mecánica, con calentamiento o a temperatura ambiente. Como, en general, las muestras sólidas son insolubles en agua, y la mayoría de los procedimientos analíticos para la determinación de los metales, ya sean en concentraciones elevadas o a nivel de traza, requieren procedimientos más drásticos para realizar su disolución (calcinación, digestión, etc.), surgen grandes inconvenientes como son los largos tiempos que requieren estos procesos y la utilización de ácidos concentrados.

Las características de la matriz de la muestra y los analitos objeto de estudio determinan el pretratamiento de la muestra a utilizar. Sin embargo, las condiciones ideales que debería cumplir el pretratamiento de una muestra sólida serían:

- ser un procedimiento rápido, y consumir un tiempo comparable a la segunda y tercera etapa del proceso analítico (determinación del analito de interés y tratamiento de los datos).
- no dar lugar a contaminación de la muestras ni a pérdidas de analito.
- no exponer al analista a riesgos químicos.
- disolver totalmente la muestra o extraer cuantitativamente el analito de interés
- no requerir instrumentación cara.
- tener la posibilidad de miniaturizar el proceso, disminuyendo así el uso de la cantidad de muestra y reactivos, además de permitir llevar a cabo los análisis con mayor rapidez y menor coste.
- facilitar los procesos analíticos continuos y permitir la automatización de todo el proceso analítico

Como ya se ha mencionado, los sistemas de flujo en general, y en particular de los sistemas FIA, son una herramienta muy útil para poder alcanzar estas características ideales. Considerando, además, que la

metodología FIA se caracteriza por tener un fundamento simple, un dispositivo económico y de fácil manejo que proporciona resultados exactos y precisos, ya que la manipulación de la muestra es mínima. Además, se trata de una técnica rápida en el que consumo de reactivos y de muestra es mucho menor que en las metodologías discontinuas. Así, se ha demostrado que el proceso de digestión asistida con energía de microondas realizado en modo continuo es mucho más rápido, preciso y seguro, presentando mayores ventajas que su proceso homólogo manual. Sin embargo, aún en modo continuo, estos sistemas presentan una serie de inconvenientes como son las interferencias de matriz (ya que la matriz es introducida en el detector) y la necesidad de una zona de refrigeración en el sistema de inyección en flujo debido a las elevadas temperaturas alcanzadas en el horno de microondas. Otra manera de obtener el analito objeto de estudio en disolución a partir de una muestra sólida es la realización de una extracción asistida con energía de ultrasonidos. Esta técnica ofrece importantes ventajas como son su amplio campo de aplicación que incluye cualquier tipo de muestras, independientemente de la forma y el tamaño de partícula, el uso de ácidos diluidos, la extracción cuantitativa del analito en estas condiciones y evitar que la matriz de la muestra se introduzca en el detector. Sin embargo, este procedimiento es tedioso y consume bastante tiempo (10-120 min) cuando se realiza de modo manual. Por el contrario, cuando el proceso de extracción se realiza de forma continua se eliminan estos inconvenientes, aunque a pesar de las potenciales ventajas que presenta la utilización de este tipo de energía en continuo para la extracción de analitos, esta metodología hasta el momento se ha aplicado muy poco. En las primeras aplicaciones, el dispositivo FIA fue acoplado a un espectrofotómetro UV-VIS para la determinación de boro en muestras de suelo y hierro en vegetales. Sin embargo, en estos estudios, el dispositivo presenta una serie de desventajas importantes, como son la utilización de una celda complicada para la muestra, los patrones pasan a través del circuito de lixiviación (lo que puede dar lugar a un efecto “memoria”) y el extracto ácido llega continuamente al detector, lo cual puede dañar las partes metálicas del nebulizador del espectrofotómetro de absorción atómica.

En este trabajo de investigación se pretenden optimizar, desarrollar y proponer metodologías analíticas automáticas basadas en sistemas de análisis de inyección en flujo (FIA), que permitan realizar el tratamiento de diferentes matrices alimenticias sólidas utilizando la energía de ultrasonidos y determinar metales (calcio, cinc, cobre, hierro, magnesio y manganeso) en este tipo de muestras por espectroscopía de absorción atómica con llama (FAAS). La principal innovación que aportan estos sistemas es la automatización del tratamiento previo de la muestra sólida, evitándose así la gran cantidad de inconvenientes derivados de los procesos de digestión y extracción ácida llevados a cabo de manera manual que se han citado anteriormente. Por tanto, lo que se propone es realizar la operación de tratamiento de la muestra de modo continuo. Para ello, se han diseñado y utilizado sistemas continuos donde se realiza bien la extracción de los metales objeto de estudio de las muestras o bien la disolución de la misma si ésta es soluble, utilizando en ambos casos la energía de ultrasonidos. La celda donde se sitúa la muestra es simple, ya que se trata de una columna de vidrio comercial. Una vez que la muestra se pesa en la columna, ésta se conecta al sistema continuo y se sumerge en el baño de ultrasonidos. Cuando se desarrolla el proceso de extracción de los metales o disolución de la muestra, a través de la columna circula la disolución “extractante” o “disolvente” que es impulsada por una bomba peristáltica a través del circuito de extracción/disolución. Una vez se ha extraído el metal o se ha disuelto la muestra sólida, el extracto o la muestra disuelta es transportada por un sistema FIA hacia el detector (FAAS) donde es continuamente monitorizado.

Los **Objetivos** planteados para la realización de este trabajo de investigación han sido los siguientes:

- Diseñar y optimizar dispositivos en continuo que permitan extraer cuantitativamente el calcio, cinc, cobre, hierro, magnesio y manganeso de las muestras sólidas utilizando energía de ultrasonidos. Los tipos de matrices en las que se estudia la extracción de estos metales son:

- Moluscos y pescados
 - Carnes
 - Cereales y derivados
 - Frutos secos
 - Legumbres
 - Verduras, hortalizas y frutas
-
- Diseñar y optimizar dispositivos en continuo que permitan disolver las muestras de leche en polvo y fórmulas infantiles utilizando energía de ultrasonidos y determinar en esta muestra disuelta el calcio, cinc, cobre, hierro y magnesio.
 - Diseñar y optimizar sistemas FIA que incorporen los dispositivos de extracción/disolución y que permitan la detección por FAAS de manera continua de cada metal extraído de las matrices anteriormente citadas o en la muestra disuelta en el caso de muestras solubles.
 - Establecer y proponer nuevas metodologías analíticas automáticas que permitan la determinación rutinaria de calcio, cinc, cobre, hierro, magnesio y manganeso en muestras sólidas de naturaleza alimenticia.
 - Aplicar los métodos propuestos a la determinación de calcio, cinc, cobre, hierro, magnesio y manganeso en muestras sólidas reales de naturaleza alimenticia.
 - Estudiar estadísticamente los resultados obtenidos en lo que se refiere a la mayor o menor dificultad del proceso de extracción de cada metal de cada matriz sólida de naturaleza alimenticia objeto de estudio. Evaluando así los parámetros óptimos para cada extracción, y las similitudes y diferencias existentes entre las extracciones llevadas a cabo en las diferentes matrices, lo que podrá dar lugar a la obtención de grupos de matrices y analitos que tengan propiedades similares en lo que se refiere a su comportamiento hacia la extracción.

PARTE EXPERIMENTAL

1. DESCRIPCIÓN DE LOS SISTEMAS DE FLUJO CONTINUO PARA LOS PROCESOS DE EXTRACCIÓN DE LOS METALES DE MUESTRAS SÓLIDAS Y DISOLUCIÓN DE LA MUESTRA ASISTIDOS POR ENERGÍA DE ULTRASONIDOS

Este trabajo de investigación se ha enfocado en el estudio de la extracción de calcio, cinc, cobre, hierro, magnesio y manganeso en muestras sólidas de naturaleza alimenticia y en la disolución de las mismas, en los casos que éstas eran solubles, para la determinación de los metales anteriormente citados. Para ello se han diseñado diferentes tipos de dispositivos FIA en los que se pueden distinguir dos etapas fundamentales:

- La extracción continua de los metales objeto de estudio de la muestra sólida o disolución de la misma. La muestra es introducida en una columna de pequeñas dimensiones
- La conducción del extracto obtenido al sistema de detección (FAAS) mediante un líquido portador

Se han diseñado dos tipos de dispositivos que se diferencian en la incorporación de un canal de dilución. El sistema FIA más sencillo, es decir, aquel que no tiene el canal de dilución, se ha utilizado para la extracción y determinación de cinc, cobre, hierro y manganeso y se muestra en la Figura 11. El sistema FIA que incorpora el canal de dilución se ha utilizado para la determinación de calcio y magnesio en las diferentes matrices sólidas (Figura 12). El canal de dilución realiza la dilución del extracto con una disolución de lantano. La necesidad de la incorporación de este canal se debe a dos razones, por una parte, a las elevadas concentraciones de estos dos metales presentes en los alimentos y, por otra por las interferencias químicas que sufren tanto el calcio como el magnesio en la celda de atomización [32,94,96,97].

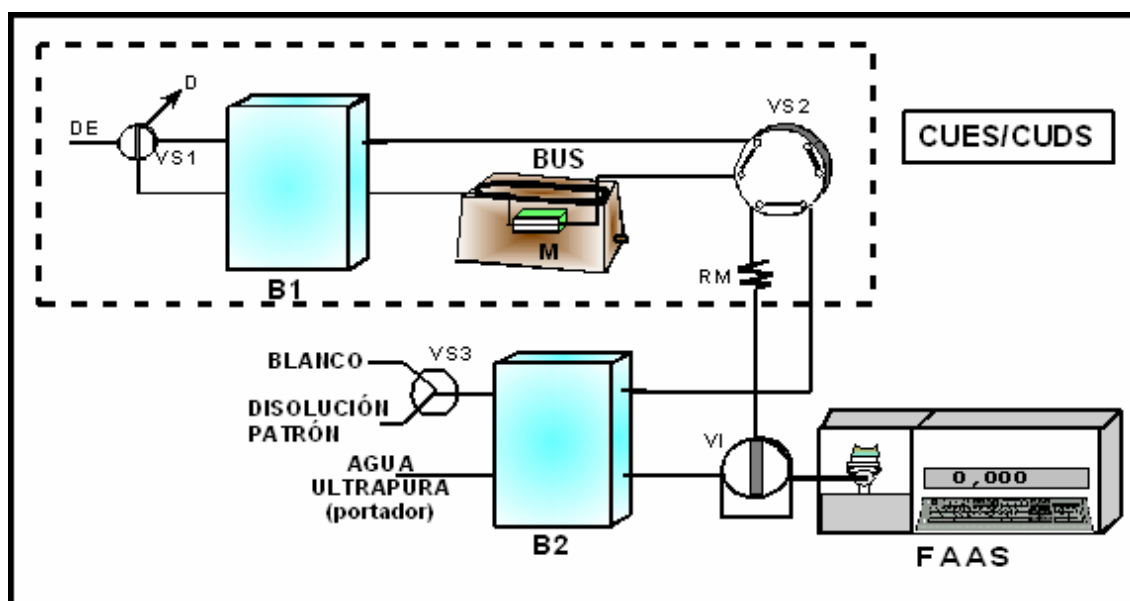


Figura 11. Sistema FIA utilizado para la determinación de cinc, cobre, hierro y manganeso en muestras sólidas de naturaleza alimenticia. CUES/CUDS, Sistema Continuo de Extracción/Disolución asistida por Ultrasonidos; DE, disolución "extractante"; B1 y B2, bombas peristálticas; BUS, baño de ultrasonidos; M, minicolumna; RM, reactor de mezcla; D, desecho; VS1, VS2 y VS3, válvulas de selección; VI, válvula de inyección y FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con llama.

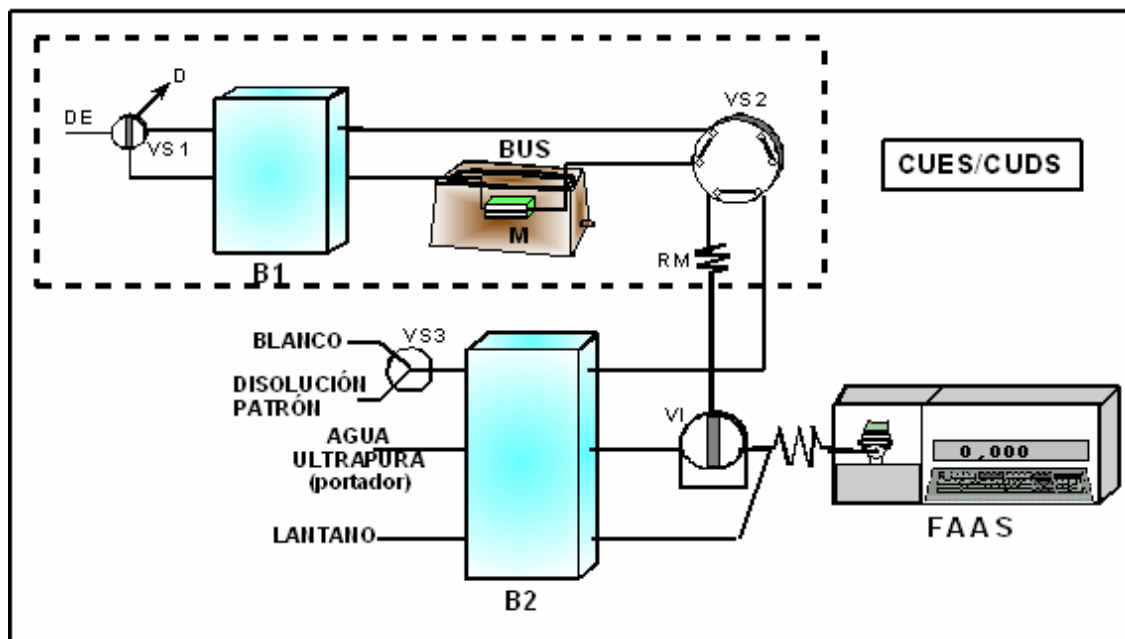


Figura 12. Sistema FIA utilizado para la determinación de calcio y magnesio en muestras sólidas de naturaleza alimenticia. CUES/CUDS, Sistema Continuo de Extracción/Disolución asistida por Ultrasonidos; DE, disolución "extractante"; B1 y B2, bombas peristálticas; BUS, baño de ultrasonidos; M, minicolumna; RM, reactor de mezcla; D, desecho; VS1, VS2 y VS3, válvulas de selección; VI, válvula de inyección y FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con llama.



Figura 13. Fotografías del sistema FIA usado para la determinación de cobre cinc, cobre, hierro y manganeso en muestras sólidas de naturaleza alimenticia, donde se puede observar el acoplamiento con la AAS con llama.

1.1 Instrumentación y Reactivos

Extracción continua de los metales de la muestra sólida/Disolución continua de la muestra sólida

Aparatos

- Válvulas de baja presión Rheodyne modelos 5041.
- Bomba peristáltica GILSON MINIPULS-3, con ocho canales y selector de velocidad.
- Tubos para bomba peristáltica de vitón de 43,5cm x 1.422 mm d.i.
- Tubo de politetrafluoroetileno (PTFE) de 0,8 mm d.i. para el circuito FIA.
- Minicolumna de vidrio OMNIFIT de 50 mm x 3mm d.i., con dos terminales fijos y un volumen de lecho de 350 μ L.
- Ultrasonidos SELECTA de 550 vatios de potencia, con temperatura y tiempo programable y una frecuencia de 40 kHz.

Reactivos

- Agua ultrapura de 18,2 $M\Omega \cdot cm$ de resistividad específica, obtenida por el sistema Milli-Q (Millipore Corp.)
- HNO_3 (Scharlau Chemie, Barcelona): 70%, $d=1,40$ g/mL, $P_m=63,01$ g/mol.
- HCl (Scharlau Chemie, Barcelona): 37%, $d=1,19$ g/mL, $P_m=36,46$ g/mol.

Conducción al sistema de detección del extracto ácido o de la muestra disuelta

Aparatos e instrumentación analítica

- Bomba peristáltica GILSON MINIPULS-3, con ocho canales y selector de velocidad.
- Tubos para bomba peristáltica de vitón de 43,5cm x 1.422 mm d.i.
- Tubo de politetrafluoroetileno (PTFE) de 0,8 mm d.i. para el circuito FIA.
- Válvulas de baja presión Rheodyne modelos 5041 y 5020 (válvulas de selección e inyección, respectivamente).
- Espectrofotómetro de Absorción Atómica Perkin Elmer, modelo 5000, con llama aire-acetileno, sistema de nebulización de bola de impacto, mechero de 10 cm y una lámpara de deuterio como corrector de fondo. Este espectrómetro está conectado a un registrador de señal con un rango de 50 mV.
- Lámparas de cátodo hueco para cada metal.

Las condiciones de medida en el espectrofotómetro de absorción atómica Perkin Elmer Modelo 5000 para cada metal se recogen en la Tabla 13.

Tabla 13. Condiciones de medida en el espectrofotómetro de absorción atómica Perkin Elmer Modelo 5000 para cada metal

Elemento	λ (nm)	Rendija (nm)	Tipo de llama aire-acetileno	Tipo de lámpara	Intensidad (mA)
Ca	422,7	0,7	oxidante	Cátodo hueco	6
Zn	213,9	0,7	oxidante	Cátodo hueco	10
Cu	324,8	0,7	oxidante	Cátodo hueco	10
Fe	248,3	0,2	oxidante	Cátodo hueco	30
Mg	285,2	0,7	oxidante	Cátodo hueco	6
Mn	279,5	0,2	oxidante	Cátodo hueco	30

Reactivos

- Agua ultrapura de $18,2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ de resistividad específica, obtenida por el sistema Milli-Q (Millipore Corp.)
- Disolución patrón de calcio 1 mg/mL (Ca en 2% HCl). Acros Organics, New Jersey, U.S.A.
- Disolución patrón de cinc 1 mg/mL (Zn en 2% HCl). Acros Organics, New Jersey, U.S.A.
- Disolución patrón de cobre 1 mg/mL (Cu en 2% HNO_3). Acros Organics, New Jersey, U.S.A.
- Disolución patrón de hierro 1 mg/mL (Fe en 2% HNO_3). Acros Organics, New Jersey, U.S.A.
- Disolución patrón de magnesio 1 mg/mL (Mg en 2% HCl). Acros Organics, New Jersey, U.S.A.
- Disolución patrón de manganeso 1 mg/mL (Mn en 2% HNO_3) Acros Organics, New Jersey, U.S.A.
- $\text{LaCl}_3 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$. Merck, Darmstadt, Alemania. A partir de este reactivo sólido se prepararon diferentes diluciones expresadas en $\%(p/v)$

1.2 Preparación de las muestras

Para poder llevar a cabo los análisis de las muestras, estas han sido trituradas y homogeneizadas, en el caso de las muestras de leche en polvo y fórmulas infantiles este proceso no ha sido necesario. Una vez homogeneizadas, se han secado en una mufla a $60 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta tener las muestras a peso constante. Eliminada toda la humedad de las muestras, éstas han sido tamizadas haciendo fracciones de partículas menores de $30 \text{ }\mu\text{m}$ y partículas entre $30\text{-}100 \text{ }\mu\text{m}$.

1.3 Procedimiento

El esquema de trabajo del método para la determinación de calcio, cinc, cobre, hierro, magnesio y manganeso en muestras sólidas se basa en dos etapas:

En una primera etapa se realiza la extracción continua de los metales objeto de estudio de la muestra sólida o la disolución de la muestra en aquellos casos que ésta sea soluble. Para llevar a cabo esta etapa, el sistema FIA consta de un circuito cerrado que contiene una columna de pequeñas dimensiones en la cual se introduce la muestra sólida (del orden de mg). La preparación de la columna es un factor de gran importancia para el proceso de extracción/disolución, ya que la compactación de la muestra dentro de ésta puede generar presiones en el sistema FIA dando lugar a pérdidas de analito. Así, antes de introducir la muestra sólida en la columna se crea un "lecho" con lana de vidrio que facilite el paso de disolución "extractante" a través de la misma. Además, tal y como se indica en la Figura 14, se colocan en cada extremo de la columna un papel de filtro (Whatman 541) para evitar la salida de la muestra de la minicolumna e impedir cualquier obturación en el sistema de extracción/disolución.

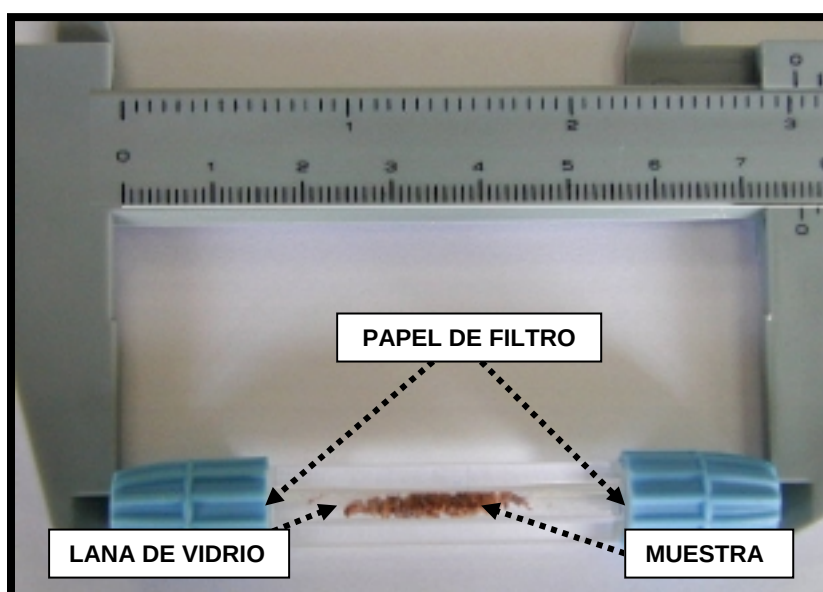


Figura 14. Fotografía de la columna donde se introduce la muestra sólida en el sistema continuo de extracción/disolución

Una vez preparada la columna se inserta en el sistema FIA y la bomba peristáltica impulsa la disolución “extractante” hacia el circuito que una vez lleno, se cierra girando la válvula de selección SV1 (Figura 15A).

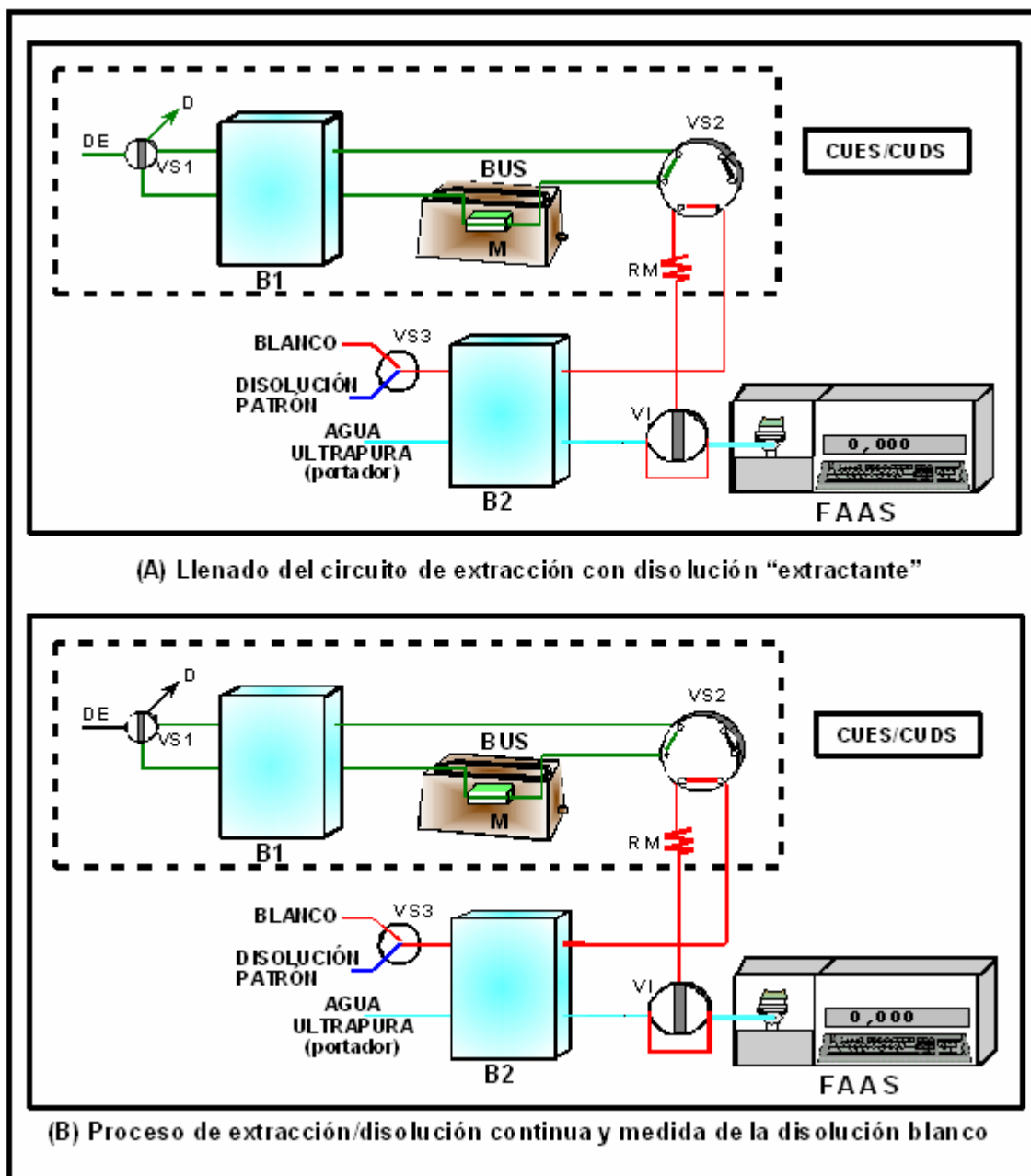


Figura 15 (A,B). Sistema FIA simple utilizado indicando las diferentes etapas del proceso: 15.A, Llenado del circuito de extracción con la disolución “extractante”; 15.B, Proceso de extracción/disolución continua y medida de la disolución blanco. CUES/CUDS, Sistema Continuo de Extracción/Disolución asistida por Ultrasonidos; DE, disolución extractante; B1 y B2, bombas peristálticas; BUS, baño de ultrasonidos; M, minicolumna; RM, reactor de mezcla; D, desecho; VS1, VS2 y VS3, válvulas de selección; VI, válvula de inyección y FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con llama.

La disolución “extractante” se mantiene durante un cierto tiempo y a una determinada temperatura en contacto con la muestra y bajo la acción de la energía de ultrasonidos. Mientras se mantiene la disolución “extractante” en contacto con la muestra para extraer el metal objeto de estudio, el bombeo se alterna en ambos sentidos para evitar las obstrucciones en el sistema por fenómenos de compactación de la muestra (Figura 15B). Transcurrido el tiempo de extracción/disolución, se gira la válvula de selección (VS2) de modo que el extracto ácido pasa a la parte del sistema FIA que lo conducirá al detector, mientras que la disolución blanco pasa al desecho.

En la segunda etapa, el extracto ácido o la muestra disuelta es transportada hacia el detector mientras que la disolución blanco va al desecho. Una vez que el extracto o la muestra disuelta se inserta a través de la válvula de selección (VS2), atraviesa un reactor cuya función es homogeneizarlo. Después un pequeño volumen de este extracto se inyecta a través de una válvula de inyección en una disolución portadora que lo transportará hacia al detector (AAS con llama) (Figura 15C). En el caso del calcio y del magnesio, este extracto se diluye en línea con una disolución de lantano y es homogeneizado de nuevo antes de llegar al detector.

Para realizar la recta de calibrado se gira la válvula de selección (VS2) para introducir secuencialmente en el sistema FIA las disoluciones patrón a través de la válvula de inyección. El volumen inyectado de cada patrón se inserta en la disolución portadora y llega de manera continua al nebulizador del espectrofotómetro de absorción atómica con llama (Figura 15D).

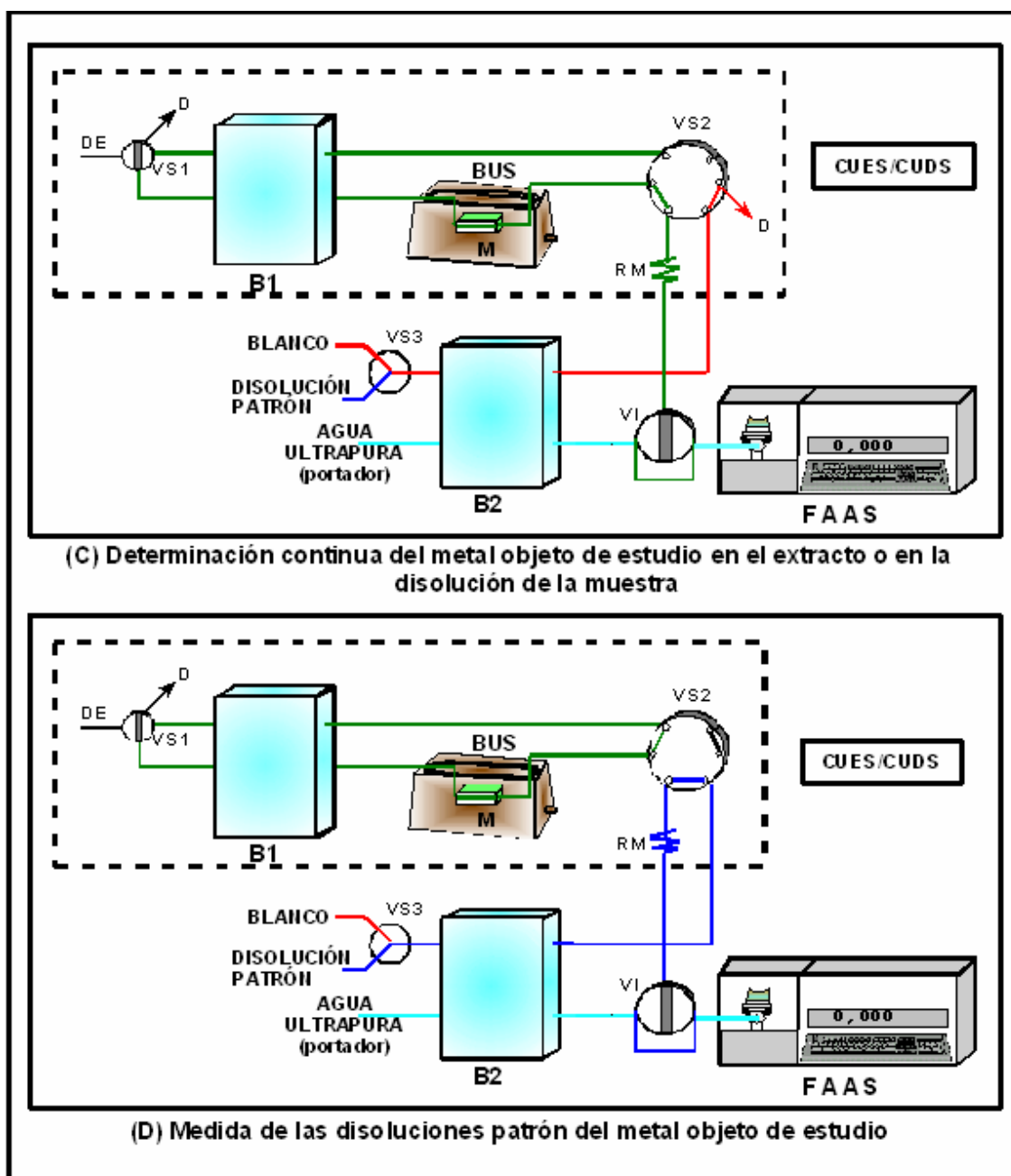


Figura 15 (continuación, C,D). Sistema FIA simple utilizado indicando las diferentes etapas del proceso: 15.C, Determinación continua del metal objeto de estudio en el extracto; 15.D, Medida de las disoluciones patrón del metal objeto de estudio. CUES/CUDS, Sistema Continuo de Extracción/Disolución asistida por Ultrasonidos; DE, disolución extractante; DE, disolución extractante; B1 y B2, bombas peristálticas; BUS, baño de ultrasonidos; M, minicolumna; RM, reactor de mezcla; D, desecho; VS1, VS2 y VS3, válvulas de selección; VI, válvula de inyección y FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con llama.

A la parte del sistema donde se realiza la extracción continua de los metales se la ha denominado "Sistema Continuo de Extracción asistida por Ultrasonidos" (CUES). En los casos en los que se produce la disolución de la muestra sólida al sistema se le ha denominado "Sistema Continuo de Disolución asistida por Ultrasonidos" (CUDS). Esta denominación no es totalmente correcta para el caso de las muestras de leche en polvo y fórmulas infantiles porque realmente el proceso que se lleva a cabo no es una disolución, sino que lo que tiene lugar es la formación de una suspensión acuosa de la muestra sólida en agua, pero por cuestiones de nomenclatura se ha mantenido el nombre en estos casos. La formación de la suspensión acuosa de las muestras de leche en polvo se muestra en la Figuras 16A y 16B.

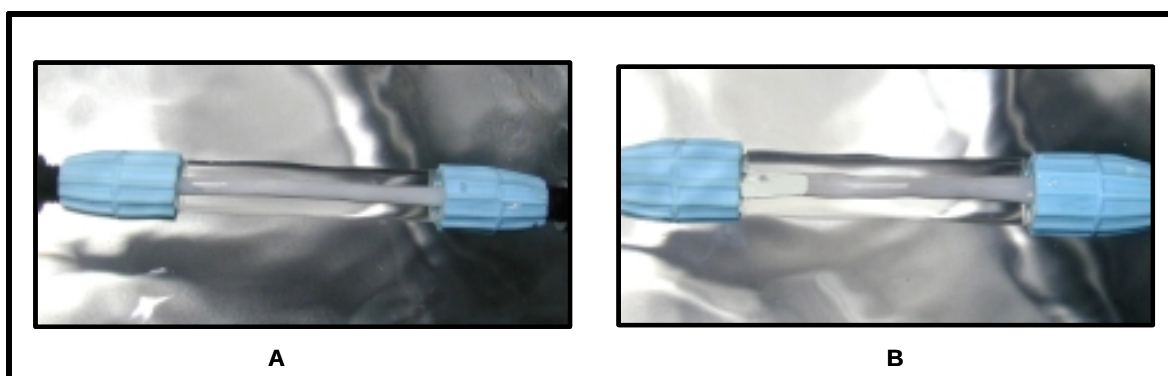


Figura 16 (A,B). Fotografías de la columna donde se ha introducido la muestra de leche en polvo. A: La disolución de agua ultrapura se pone en contacto con toda la muestra de leche en polvo. B: Se ha formado la suspensión de la muestra de leche en polvo en el sistema continuo de extracción y esta suspensión abandona la columna para pasar a la segunda parte del sistema FIA donde se conduce esta suspensión hacia el detector.

En la Figura 16A se observa el momento en el que el agua ultrapura se pone en contacto con toda la muestra. En la Figura 16B se observa la suspensión acuosa de la muestra de leche en polvo y como ésta sale de la columna para pasar a la segunda parte del sistema FIA donde es conducida hacia el detector. En esta segunda fotografía se observa a su vez que, cuando la muestra pasa a la segunda parte del sistema, no queda ningún resto de la misma en la minicolumna.

Con el objetivo de poder estudiar los resultados obtenidos al aplicar el procedimiento descrito para el sistema FIA propuesto, se ha realizado paralelamente el análisis de las muestras siguiendo un método de referencia basado en una digestión convencional utilizando ácidos concentrados. En esta digestión se ha utilizado una cantidad de muestra comprendida en el intervalo 0,1-1g, en función de la concentración del metal presente en la misma y del intervalo lineal del mismo en el detector (FAAS). Esta muestra es digerida con HNO_3 concentrado y bajo acción calorífica. Una vez que la muestra está completamente digerida, se deja enfriar el extracto y después se diluye con agua ultrapura hasta 25 mL en un matraz aforado. Para los metales calcio y magnesio, el extracto se debe diluir entre 10-100 veces debido a las elevadas concentraciones de los mismos. Una vez aplicada la dilución pertinente en cada caso, se toma 1 mL de esta disolución y se diluye de nuevo hasta 25 mL, pero en este caso la dilución se realiza con una disolución de La (2%) para eliminar las posibles interferencias químicas. La determinación de cada metal se realiza por FAAS.

2. CURVAS DE CALIBRADO. DISPERSIÓN Y PRECISIÓN DEL SISTEMA FIA

Todos los calibrados se han realizado con los patrones metálicos indicados anteriormente (pág. 80) en el mismo medio del extracto. Realizando estos calibrados se ha observado que el medio ácido en el que se encuentra el patrón metálico no afecta significativamente a la señal de la absorbancia y el calibrado es el mismo para cada metal independientemente del medio ácido necesario para realizar la extracción.

Se realizaron dos tipos de calibrado para cada metal:

- Un **calibrado directo** que se hizo por aspiración directa de las disoluciones patrón de cada metal en el mismo medio del extracto. En este tipo de calibrado, en los casos de la determinación de calcio y magnesio, además de tener en cuenta el medio ácido que se utilizaba en la extracción, se ha tenido en cuenta la dilución con la disolución de lantano.
- Un **calibrado realizado usando los sistemas FIA** propuestos con las mismas disoluciones patrón que el caso anterior.

Para cada uno de los calibrados se ha realizado el ajuste por Mínimos Cuadrados.

Una vez obtenidos los calibrados, con el objetivo de establecer la **dispersión** producida en el dispositivo FIA propuesto, se calculó el coeficiente de dispersión, D, según indican Hansen y col. [165]:

$$D = \frac{\text{pendiente de la recta de calibrado}}{\text{pendiente de la recta FIA}}$$

El coeficiente de dispersión resultante es de 1,1 en todos los casos. Como $D < 3$ se puede clasificar a la configuración propuesta como un sistema FIA de dispersión limitada.

En la Figura 17 se reflejan las señales de absorbancia obtenidas para 1 y 2 $\mu\text{g/mL}$ de calcio en el calibrado directo (aspiración directa) y el calibrado obtenido con el sistema FIA. En esta figura aparecen las señales de absorbancia para 1 y 2 $\mu\text{g/mL}$ de calcio como ejemplo, pero este comportamiento tiene lugar para todos los metales estudiados y para todas las concentraciones que se encuentran dentro del rango lineal de cada uno de ellos.

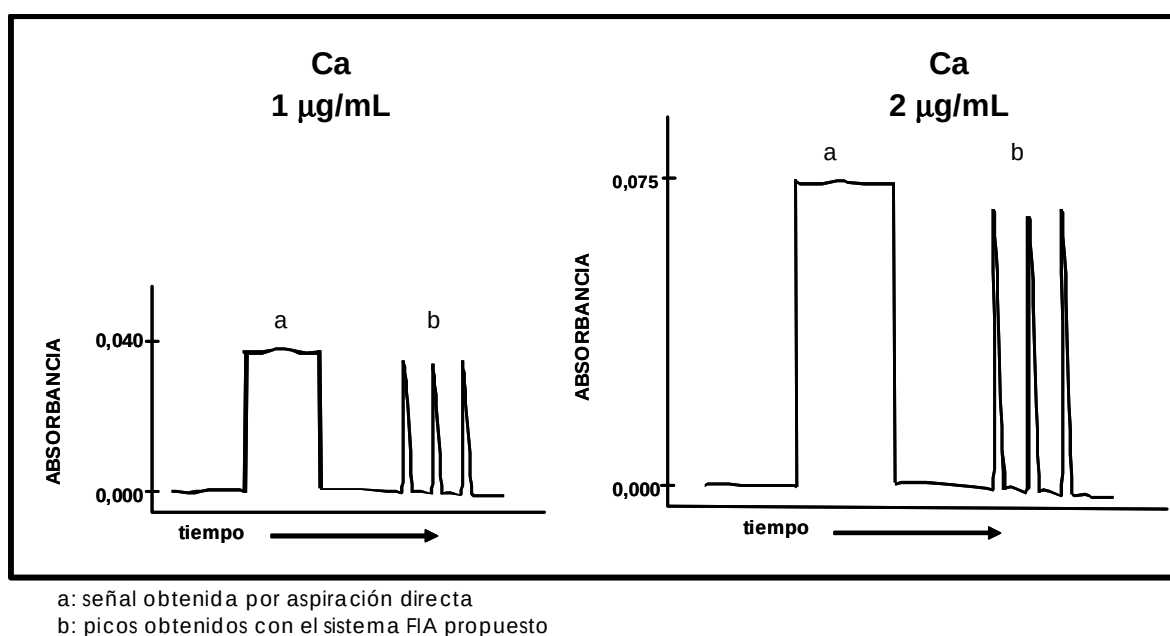


Figura 17 (A,B). Señales de absorbancia obtenidas para 1 y 2 $\mu\text{g/mL}$ de calcio realizando las medidas por aspiración directa (a, calibrado directo) y utilizando el sistema FIA propuesto(b).

Se estudió además la **precisión** del proceso de calibrado FIA. Para ello se ha hecho un estudio de la repetibilidad de dicho proceso de calibrado. La repetibilidad se define desde un punto de vista cualitativo como la concordancia entre los resultados sucesivos obtenidos sobre una misma muestra, que en este caso son los patrones metálicos, cuando se llevan a cabo determinaciones siguiendo el mismo método analítico, en idénticas condiciones experimentales (instrumentos, operador, laboratorio...) y trabajando con poca diferencia de tiempo entre las determinaciones. Desde

un punto de vista cuantitativo, la repetibilidad se puede definir como la diferencia máxima entre dos resultados cualesquiera expresados en valor absoluto obtenidos en unas condiciones especificadas para un determinado nivel de significación ($P=0,05$) [166]. Para realizar este estudio se midieron 11 veces cada una de las disoluciones patrón de cada metal con el sistema FIA en las condiciones óptimas. De estos resultados se calculó la desviación estándar, la desviación estándar media, el coeficiente de variación y el intervalo de concentración obtenido.

La **desviación típica media o desviación estándar**, σ , viene dada por la siguiente expresión:

$$\sigma = \pm \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

Siendo:

x_i = valor de la concentración hallado en la muestra.

$\bar{x}$ = media aritmética de las concentraciones

$x_i - \bar{x}$ = diferencia entre cada valor de la concentración y la media aritmética respectiva

n = número de medidas efectuadas en cada caso

La **desviación media**, σ_m :

$$\sigma_m = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

Siendo:

σ = desviación típica media o desviación estándar

n = número de medidas efectuadas en cada caso

El **coeficiente de variación**, CV :

$$CV = \frac{\sigma}{\bar{x}} \times 100$$

Siendo:

σ = desviación típica media o desviación estándar

$\bar{x}$ = media aritmética de las concentraciones

El **intervalo de confianza**, se define como:

$$[Me]_{media} \pm \sigma_m t$$

donde:

$[Me]_{media}$ = concentración media del metal

σ_m = desviación media

t = valor t del Test t-Student al 95% de probabilidad

Los calibrados directo y FIA obtenidos, la dispersión del método analítico así como los resultados del estudio de la repetibilidad del proceso de calibrado FIA para cada metal se indican en las siguientes tablas (Tablas 14-25).

2.1 Calcio

Tabla 14. Calibrado directo y calibrado FIA para el calcio. Ajuste mediante el método de Mínimos Cuadrados de dichos calibrados y dispersión del método analítico

Ca, µg/mL	Absorbancia	
	Calibrado directo	Calibrado FIA
0,0	0,000	0,000
1,0	0,037	0,034
2,0	0,074	0,069
3,0	0,112	0,102
4,0	0,148	0,135
5,0	0,185	0,170

Ajuste por Mínimos Cuadrados	Calibrado directo	Calibrado FIA
Ordenada en el origen (o)	$9,52 \times 10^{-5}$	$2,86 \times 10^{-4}$
Pendiente (m)	0,037	0,034
Coefficiente de correlación (r)	0,999	0,999

Dispersión del método analítico	1,1

Tabla 15. Estudio de la repetibilidad del calibrado FIA para el calcio

[Ca]=1,0 µg/mL		[Ca]=2,0 µg/mL		[Ca]=3,0 µg/mL		[Ca]=4,0 µg/mL		[Ca]=5,0 µg/mL	
Abs	[Ca] µg/mL	Abs	[Ca] µg/mL	Abs	[Ca] µg/mL	Abs	[Ca] µg/mL	Abs	[Ca] µg/mL
0,034	0,99	0,069	2,03	0,102	3,00	0,135	3,98	0,170	5,01
0,034	0,99	0,069	2,03	0,102	3,00	0,135	3,98	0,170	5,01
0,034	0,99	0,069	2,03	0,102	3,00	0,135	3,98	0,170	5,01
0,034	0,99	0,069	2,03	0,102	3,00	0,135	3,98	0,170	5,01
0,034	0,99	0,069	2,03	0,102	3,00	0,135	3,98	0,170	5,01
0,034	0,99	0,069	2,03	0,102	3,00	0,135	3,98	0,170	5,01
0,034	0,99	0,069	2,03	0,102	3,00	0,135	3,98	0,170	5,01
0,035	1,02	0,069	2,03	0,102	3,00	0,135	3,98	0,170	5,01
0,035	1,02	0,068	2,00	0,102	3,00	0,136	4,00	0,170	5,01
0,035	1,02	0,068	2,00	0,103	3,03	0,136	4,00	0,169	4,98
0,035	1,02	0,068	2,00	0,103	3,03	0,136	4,00	0,169	4,98
$\sigma = 0,01$		$\sigma = 0,01$		$\sigma = 0,01$		$\sigma = 0,01$		$\sigma = 0,01$	
$\sigma_m = 4,49 \times 10^{-3}$		$\sigma_m = 4,16 \times 10^{-3}$		$\sigma_m = 3,60 \times 10^{-3}$		$\sigma_m = 4,16 \times 10^{-3}$		$\sigma_m = 3,60 \times 10^{-3}$	
CV= 1,5 %		CV= 0,7 %		CV= 0,4 %		CV= 0,4 %		CV= 0,2 %	
$[Ca] \pm \sigma_m t$		$[Ca] \pm \sigma_m t$		$[Ca] \pm \sigma_m t$		$[Ca] \pm \sigma_m t$		$[Ca] \pm \sigma_m t$	
1,01 ± 0,01µg/mL		2,02 ± 0,01µg/mL		3,01 ± 0,01µg/mL		3,98 ± 0,01µg/mL		5,00 ± 0,01µg/mL	

Abs, Absorbancia; σ , desviación típica media o desviación estándar; σ_m , desviación media; CV, coeficiente de variación; t, de Student (t=2,23)

2.2 Cinc

Tabla 16. Calibrado directo y calibrado FIA para el cinc. Ajuste mediante el método de Mínimos Cuadrados de dichos calibrados y dispersión del método analítico

Zn, µg/mL	Absorbancia	
	Calibrado directo	Calibrado FIA
0,0	0,000	0,000
0,2	0,048	0,043
0,4	0,093	0,085
0,6	0,138	0,125
0,8	0,185	0,168
1,0	0,231	0,210

Ajuste por Mínimos Cuadrados	Calibrado directo	Calibrado FIA
Ordenada en el origen (o)	7,62x10 ⁻⁴	5,24x10 ⁻⁴
Pendiente (m)	0,230	0,209
Coefficiente de correlación (r)	0,999	0,999

Dispersión del método analítico	1,1

Tabla 17. Estudio de la repetibilidad del calibrado FIA para el cinc

[Zn]=0,2µg/mL		[Zn]=0,4µg/mL		[Zn]=0,6µg/mL		[Zn]=0,8µg/mL		[Zn]=1,0µg/mL	
Abs	[Zn] µg/mL	Abs	[Zn] µg/mL	Abs	[Zn] µg/mL	Abs	[Zn] µg/mL	Abs	[Zn] µg/mL
0,043	0,20	0,085	0,40	0,125	0,59	0,168	0,80	0,210	1,00
0,043	0,20	0,085	0,40	0,125	0,59	0,168	0,80	0,210	1,00
0,043	0,20	0,085	0,40	0,125	0,59	0,168	0,80	0,210	1,00
0,043	0,20	0,085	0,40	0,125	0,59	0,168	0,80	0,210	1,00
0,043	0,20	0,085	0,40	0,125	0,59	0,168	0,80	0,210	1,00
0,043	0,20	0,085	0,40	0,125	0,59	0,168	0,80	0,210	1,00
0,043	0,20	0,085	0,40	0,125	0,59	0,168	0,80	0,210	1,00
0,043	0,20	0,085	0,40	0,125	0,59	0,168	0,80	0,210	1,00
0,044	0,21	0,085	0,40	0,126	0,60	0,168	0,80	0,210	1,00
0,044	0,21	0,084	0,40	0,126	0,60	0,168	0,80	0,211	1,01
0,044	0,21	0,084	0,40	0,126	0,60	0,169	0,81	0,211	1,01
0,044	0,21	0,086	0,41	0,126	0,60	0,169	0,81	0,211	1,01
$\sigma = 2,41 \times 10^{-3}$		$\sigma = 2,58 \times 10^{-3}$		$\sigma = 2,41 \times 10^{-3}$		$\sigma = 1,93 \times 10^{-3}$		$\sigma = 2,23 \times 10^{-3}$	
$\sigma_m = 7,27 \times 10^{-4}$		$\sigma_m = 7,77 \times 10^{-4}$		$\sigma_m = 7,27 \times 10^{-4}$		$\sigma_m = 5,83 \times 10^{-4}$		$\sigma_m = 6,73 \times 10^{-4}$	
CV= 1,2 %		CV= 0,6 %		CV= 0,4 %		CV= 0,2 %		CV= 0,2 %	
$[Zn] \pm \sigma_m t$		$[Zn] \pm \sigma_m t$		$[Zn] \pm \sigma_m t$		$[Zn] \pm \sigma_m t$		$[Zn] \pm \sigma_m t$	
0,20 ± 0,00µg/mL		0,40 ± 0,00µg/mL		0,60 ± 0,00µg/mL		0,80 ± 0,00µg/mL		1,00 ± 0,00µg/mL	

Abs, Absorbancia; σ , desviación típica media o desviación estándar; σ_m , desviación media; CV, coeficiente de variación; t, de Student (t=2,23)

2.3 Cobre

Tabla 18. Calibrado directo y calibrado FIA para el cobre. Ajuste mediante el método de Mínimos Cuadrados de dichos calibrados y dispersión del método analítico

Cu, µg/mL	Absorbancia	
	Calibrado directo	Calibrado FIA
0,0	0,000	0,000
1,0	0,051	0,047
2,0	0,102	0,094
3,0	0,151	0,139
4,0	0,202	0,186
5,0	0,252	0,231

Ajuste por Mínimos Cuadrados	Calibrado directo	Calibrado FIA
Ordenada en el origen (o)	4,76x10 ⁻⁴	6,67x10 ⁻⁴
Pendiente (m)	0,050	0,046
Coefficiente de correlación (r)	0,999	0,999

Dispersión del método analítico	1,1

Tabla 19. Estudio de la repetibilidad del calibrado FIA para el cobre

[Cu]=1,0 µg/mL		[Cu]=2,0 µg/mL		[Cu]=3,0 µg/mL		[Cu]=4,0 µg/mL		[Cu]=5,0 µg/mL	
Abs	[Cu] µg/mL	Abs	[Cu] µg/mL	Abs	[Cu] µg/mL	Abs	[Cu] µg/mL	Abs	[Cu] µg/mL
0,046	0,98	0,093	2,00	0,139	2,99	0,185	3,99	0,231	4,99
0,046	0,98	0,093	2,00	0,139	2,99	0,186	4,01	0,231	4,99
0,046	0,98	0,094	2,02	0,140	3,02	0,186	4,01	0,232	5,01
0,047	1,00	0,094	2,02	0,140	3,02	0,186	4,01	0,232	5,01
0,047	1,00	0,094	2,02	0,140	3,02	0,186	4,01	0,232	5,01
0,047	1,00	0,094	2,02	0,140	3,02	0,186	4,01	0,232	5,01
0,047	1,00	0,094	2,02	0,140	3,02	0,186	4,01	0,232	5,01
0,047	1,00	0,094	2,02	0,140	3,02	0,186	4,01	0,232	5,01
0,047	1,00	0,094	2,02	0,140	3,02	0,186	4,01	0,232	5,01
0,048	1,02	0,095	2,04	0,140	3,02	0,186	4,01	0,232	5,01
0,048	1,02	0,095	2,04	0,140	3,02	0,187	4,03	0,232	5,01
0,048	1,02	0,095	2,04	0,141	3,04	0,187	4,03	0,232	5,01
$\sigma = 0,02$		$\sigma = 0,02$		$\sigma = 0,01$		$\sigma = 0,01$		$\sigma = 0,01$	
$\sigma_m = 5,06 \times 10^{-3}$		$\sigma_m = 4,57 \times 10^{-3}$		$\sigma_m = 3,52 \times 10^{-3}$		$\sigma_m = 3,52 \times 10^{-3}$		$\sigma_m = 2,64 \times 10^{-3}$	
CV= 1,7 %		CV= 0,8 %		CV= 0,4 %		CV= 0,3 %		CV= 0,2 %	
[Cu] ± $\sigma_m t$		[Cu] ± $\sigma_m t$		[Cu] ± $\sigma_m t$		[Cu] ± $\sigma_m t$		[Cu] ± $\sigma_m t$	
1,00 ± 0,01µg/mL		2,02 ± 0,01µg/mL		3,01 ± 0,01µg/mL		4,01 ± 0,01µg/mL		5,00 ± 0,01µg/mL	

Abs, Absorbancia; σ , desviación típica media o desviación estándar; σ_m , desviación media; CV, coeficiente de variación; t, de Student (t=2,23)

2.4 Hierro

Tabla 20. Calibrado directo y calibrado FIA para el hierro. Ajuste mediante el método de Mínimos Cuadrados de dichos calibrados y dispersión del método analítico

Fe, µg/mL	Absorbancia	
	Calibrado directo	Calibrado FIA
0,0	0,000	0,000
1,0	0,033	0,031
2,0	0,066	0,060
3,0	0,100	0,091
4,0	0,131	0,120
5,0	0,165	0,150

Ajuste por Mínimos Cuadrados	Calibrado directo	Calibrado FIA
Ordenada en el origen (o)	1,43x10 ⁻⁴	4,76x10 ⁻⁴
Pendiente (m)	0,033	0,030
Coefficiente de correlación (r)	0,999	0,999

Dispersión del método analítico	1,1

Tabla 21. Estudio de la repetibilidad del calibrado FIA para el hierro

[Fe]=1,0 µg/mL		[Fe]=2,0 µg/mL		[Fe]=3,0 µg/mL		[Fe]=4,0 µg/mL		[Fe]=5,0 µg/mL	
Abs	[Fe] µg/mL	Abs	[Fe] µg/mL	Abs	[Fe] µg/mL	Abs	[Fe] µg/mL	Abs	[Fe] µg/mL
0,030	0,99	0,060	1,99	0,090	2,99	0,121	4,03	0,151	5,03
0,030	0,99	0,060	1,99	0,090	2,99	0,121	4,03	0,151	5,03
0,031	1,02	0,060	1,99	0,090	2,99	0,121	4,03	0,151	5,03
0,031	1,02	0,061	2,02	0,090	2,99	0,120	3,99	0,150	4,99
0,031	1,02	0,061	2,02	0,091	3,02	0,120	3,99	0,150	4,99
0,031	1,02	0,061	2,02	0,091	3,02	0,120	3,99	0,150	4,99
0,031	1,02	0,061	2,02	0,091	3,02	0,120	3,99	0,150	4,99
0,031	1,02	0,061	2,02	0,091	3,02	0,120	3,99	0,150	4,99
0,031	1,02	0,061	2,02	0,091	3,02	0,120	3,99	0,150	4,99
0,031	1,02	0,061	2,02	0,091	3,02	0,120	3,99	0,150	4,99
0,031	1,02	0,061	2,02	0,091	3,02	0,120	3,99	0,150	4,99
$\sigma = 0,01$		$\sigma = 0,02$		$\sigma = 0,02$		$\sigma = 0,02$		$\sigma = 0,02$	
$\sigma_m = 4,07 \times 10^{-3}$		$\sigma_m = 4,70 \times 10^{-3}$		$\sigma_m = 5,08 \times 10^{-3}$		$\sigma_m = 4,70 \times 10^{-3}$		$\sigma_m = 4,70 \times 10^{-3}$	
CV= 1,3 %		CV= 0,8 %		CV= 0,6 %		CV= 0,4 %		CV= 0,3 %	
$[Fe] \pm \sigma_m t$		$[Fe] \pm \sigma_m t$		$[Fe] \pm \sigma_m t$		$[Fe] \pm \sigma_m t$		$[Fe] \pm \sigma_m t$	
1,01 ± 0,01µg/mL		2,01 ± 0,01µg/mL		3,01 ± 0,01µg/mL		4,00 ± 0,01µg/mL		5,00 ± 0,01µg/mL	

Abs, Absorbancia; σ , desviación típica media o desviación estándar; σ_m , desviación media; CV, coeficiente de variación; t, de Student (t=2,23)

2.5 Magnesio

Tabla 22. Calibrado directo y calibrado FIA para el magnesio. Ajuste mediante el método de Mínimos Cuadrados de dichos calibrados y dispersión del método analítico

Mg, µg/mL	Absorbancia	
	Calibrado directo	Calibrado FIA
0,0	0,000	0,000
0,1	0,056	0,051
0,2	0,114	0,104
0,3	0,168	0,153
0,4	0,223	0,204
0,5	0,282	0,256

Ajuste por Mínimos Cuadrados	Calibrado directo	Calibrado FIA
Ordenada en el origen (o)	$1,43 \times 10^{-4}$	$2,86 \times 10^{-4}$
Pendiente (m)	0,561	0,511
Coefficiente de correlación (r)	0,999	0,999

Dispersión del método analítico	1,1

Tabla 23. Estudio de la repetibilidad del calibrado FIA para el magnesio

[Mg]=0,1µg/mL		[Mg]=0,2 µg/mL		[Mg]=0,3 µg/mL		[Mg]=0,4µg/mL		[Mg]=0,5 µg/mL	
Abs	[Mg] µg/mL	Abs	[Mg] µg/mL	Abs	[Mg] µg/mL	Abs	[Mg] µg/mL	Abs	[Mg] µg/mL
0,051	0,10	0,104	0,20	0,153	0,30	0,204	0,40	0,256	0,50
0,051	0,10	0,104	0,20	0,153	0,30	0,204	0,40	0,256	0,50
0,051	0,10	0,104	0,20	0,153	0,30	0,204	0,40	0,256	0,50
0,051	0,10	0,104	0,20	0,153	0,30	0,204	0,40	0,256	0,50
0,051	0,10	0,104	0,20	0,153	0,30	0,204	0,40	0,256	0,50
0,051	0,10	0,104	0,20	0,153	0,30	0,204	0,40	0,256	0,50
0,051	0,10	0,104	0,20	0,153	0,30	0,204	0,40	0,256	0,50
0,051	0,10	0,104	0,20	0,154	0,30	0,204	0,40	0,256	0,50
0,05	0,10	0,103	0,20	0,154	0,30	0,203	0,40	0,255	0,50
0,05	0,10	0,103	0,20	0,154	0,30	0,205	0,40	0,255	0,50
0,05	0,10	0,103	0,20	0,154	0,30	0,205	0,40	0,255	0,50
$\sigma = 0,00$		$\sigma = 0,00$		$\sigma = 0,00$		$\sigma = 0,00$		$\sigma = 0,00$	
$\sigma_m = 0,28 \times 10^{-3}$		$\sigma_m = 0,28 \times 10^{-3}$		$\sigma_m = 0,30 \times 10^{-3}$		$\sigma_m = 0,32 \times 10^{-3}$		$\sigma_m = 0,28 \times 10^{-3}$	
CV= 0,9 %		CV= 0,5 %		CV= 0,3 %		CV= 0,3 %		CV= 0,2 %	
$[Mg] \pm \sigma_m t$		$[Mg] \pm \sigma_m t$		$[Mg] \pm \sigma_m t$		$[Mg] \pm \sigma_m t$		$[Mg] \pm \sigma_m t$	
0,10 ± 0,00µg/mL		0,20 ± 0,00µg/mL		0,30 ± 0,01µg/mL		0,40 ± 0,01µg/mL		0,50 ± 0,00µg/mL	

Abs, Absorbancia; σ , desviación típica media o desviación estándar; σ_m , desviación media; CV, coeficiente de variación; t, de Student (t=2,23)

2.6 Manganeso

Tabla 24. Calibrado directo y calibrado FIA para el manganeso. Ajuste mediante el método de Mínimos Cuadrados de dichos calibrados y dispersión del método analítico

Mn $\mu\text{g/mL}$	Absorbancia	
	Calibrado directo	Calibrado FIA
0,0	0,000	0,000
0,5	0,035	0,032
1,0	0,067	0,061
1,5	0,102	0,093
2,0	0,136	0,124

Ajuste por Mínimos Cuadrados	Calibrado directo	Calibrado FIA
Ordenada en el origen (o)	$2,00 \times 10^{-4}$	$2,00 \times 10^{-4}$
Pendiente (m)	0,068	0,062
Coefficiente de correlación (r)	0,999	0,999

Dispersión del método analítico	1,1

Tabla 25. Estudio de la repetibilidad del calibrado FIA para el manganeso

[Mn]=0,5g/mL		[Mn]=1,0/mL		[Mn]=1,5/mL		[Mn]=2,0mL	
Abs	[Mn] $\mu\text{g/mL}$	Abs	[Mn] $\mu\text{g/mL}$	Abs	[Mn] $\mu\text{g/mL}$	Abs	[Mn] $\mu\text{g/mL}$
0,032	0,51	0,062	1,00	0,092	1,49	0,124	2,00
0,032	0,51	0,062	1,00	0,092	1,49	0,124	2,00
0,032	0,51	0,061	0,98	0,092	1,49	0,124	2,00
0,032	0,51	0,061	0,98	0,092	1,49	0,124	2,00
0,031	0,50	0,061	0,98	0,092	1,49	0,124	2,00
0,031	0,50	0,061	0,98	0,092	1,49	0,124	2,00
0,031	0,50	0,061	0,98	0,092	1,49	0,124	2,00
0,031	0,50	0,061	0,98	0,092	1,49	0,124	2,00
0,031	0,50	0,061	0,98	0,092	1,49	0,124	2,00
0,031	0,50	0,061	0,98	0,093	1,50	0,124	2,00
0,031	0,50	0,061	0,98	0,093	1,50	0,123	1,99
$\sigma = 0,01$		$\sigma = 0,01$		$\sigma = 0,01$		$\sigma = 0,00$	
$\sigma_m = 2,46 \cdot 10^{-3}$		$\sigma_m = 1,97 \times 10^{-3}$		$\sigma_m = 1,97 \times 10^{-3}$		$\sigma_m = 1,47 \times 10^{-3}$	
CV= 1,6 %		CV= 0,7 %		CV= 0,4 %		CV= 0,2 %	
$[\text{Mn}] \pm \sigma_m t$		$[\text{Mn}] \pm \sigma_m t$		$[\text{Mn}] \pm \sigma_m t$		$[\text{Mn}] \pm \sigma_m t$	
$0,50 \pm 0,00 \mu\text{g/mL}$		$0,99 \pm 0,00 \mu\text{g/mL}$		$1,49 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$		$2,00 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$	

Abs, Absorbancia; σ , desviación típica media o desviación estándar; σ_m , desviación media; CV, coeficiente de variación; t, de Student (t=2,23)

3. CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DEL SISTEMA FIA RELATIVAS AL CALIBRADO

3.1 Límite de detección

El límite de detección (LOD) se define como la menor concentración que puede determinarse siendo estadísticamente distinta de un blanco estadístico [154-163, 165]. Para un nivel de confianza de un 99%, el límite de detección se define como:

$$\text{LOD}=3\sigma$$

σ =desviación estándar de una serie de 30 medidas de un blanco

Según la definición de la IUPAC, el LOD, expresado como la concentración X_d , se obtiene de la menor medida, y_d , que puede detectarse con certidumbre razonable para un procedimiento analítico [166]. De esta definición se deduce claramente que la discusión ha de llevarse a cabo en dos etapas:

1. Establecer una señal de detección
2. Mediante la curva de calibrado convertir esta señal en una concentración.

El cálculo del LOD se realizó en base a la determinación de 30 medidas de un blanco, realizadas en las condiciones óptimas, se calculó el valor de 3σ y se sustituyó en la recta de calibrado del método. En la Tabla 26 se recogen los valores de LOD expresados en $\mu\text{g/mL}$ para los metales objeto de estudio.

3.2 Límite de cuantificación

El límite de cuantificación (LOQ) se define como el nivel por encima del cual pueden obtenerse resultados cuantitativos con un nivel de confianza del 99%.

$$\text{LOQ}=10\sigma$$

σ =desviación estándar de una serie de 30 medidas de un blanco

El cálculo de LOQ se realizó en base a la determinación de 30 medidas de un blanco, realizadas en las condiciones óptimas, se calculó 10σ y se substituyó este valor en la recta de calibrado del método. En la Tabla 26 se encuentran los valores de LOQ expresados en $\mu\text{g/mL}$ para los metales objeto de estudio.

3.3 Sensibilidad

La sensibilidad de un método analítico mide la capacidad de dicho método para diferenciar entre pequeñas variaciones en la concentración de analito. Según la IUPAC la sensibilidad se define como la pendiente de la recta de calibrado del método. También se define la sensibilidad para un 1% de absorción (absorbancia=0,0044) en el caso de métodos espectroscópicos. En la Tabla 26 se muestran los valores de la sensibilidad del método analítico expresados en $\mu\text{g/mL}$ para los metales objeto de estudio.

3.4 Intervalo lineal

Se ha calculado el intervalo lineal alcanzado con el sistema FIA propuesto. Para ello se ha tenido en cuenta la ecuación de la recta de calibrado FIA, el límite de cuantificación obtenido, y el intervalo lineal de cada metal estudiado cuando se determina por espectroscopía de absorción atómica con llama. En la Tabla 26 se recogen los intervalos lineales para cada metal objeto de estudio expresados en $\mu\text{g/mL}$.

Tabla 26. Desviación estándar (σ), límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ), sensibilidad e intervalo lineal para Ca, Zn, Cu, Fe, Mg y Mn utilizando los sistemas FIA propuestos

	Ca ^a	Zn	Cu	Fe	Mg ^a	Mn
σ ($\mu\text{g/mL}$)	4,3x10 ⁻⁴	4,5x10 ⁻⁴	4,3x10 ⁻⁴	4,3x10 ⁻⁴	4,5x10 ⁻⁴	4,50x10 ⁻⁴
LOD ($\mu\text{g/mL}$)	0,03	4,0x10 ⁻³	0,01	0,03	2,1x10 ⁻³	0,02
LOQ ($\mu\text{g/mL}$)	0,12	0,02	0,08	0,13	8,2x10 ⁻³	0,07
Sensibilidad (1% Absorción) ($\mu\text{g/mL}$)	0,12	0,02	0,08	0,13	8,1x10 ⁻³	0,07
Intervalo lineal ($\mu\text{g/mL}$)	0,1-5,5	2x10 ⁻² -1,1	0,1-5,4	0,1-5,5	1x10 ⁻² -0,6	0,1-2,2

a. En los casos del calcio y el magnesio estos parámetros analíticos son calculados haciendo uso del sistema sin dilución. Se recalcularán posteriormente teniendo en cuenta las diluciones pertinentes en cada caso.

4. OPTIMIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS QUE AFECTAN A LA EXTRACCIÓN DE LOS METALES DE LAS MUESTRAS SÓLIDAS/DISOLUCIÓN DE LA MUESTRA SÓLIDA EN LOS SISTEMAS FIA

Se ha estudiado la extracción/disolución y determinación del calcio, cinc, cobre, hierro, magnesio y manganeso en las matrices sólidas siguientes:

- Moluscos y pescados
- Carnes
- Cereales y derivados
- Frutos secos
- Legumbres
- Verduras, hortalizas y frutas
- Leche en polvo y fórmulas infantiles

Estos procesos se han optimizado, y dichas optimizaciones se han clasificado en función de la naturaleza del mismo, es decir, si el proceso es una extracción o una disolución. Así, por una parte se optimizaron los parámetros implicados en el CUES (extracción), y por otra, los parámetros implicados en el CUDS (disolución). La optimización del CUDS se ha realizado para las muestras de leche en polvo y fórmulas infantiles, ya que es con este tipo de muestras donde la determinación se realiza en la suspensión de la misma, y no mediante una extracción de los metales, proceso que ocurre en las muestras restantes.

Además esta optimización se ha subdividido en tres partes:

- La optimización mediante un diseño factorial de los parámetros que afectan a la extracción/disolución del metal de la muestra sólida de naturaleza alimenticia

- La optimización de las características propias de la muestra sólida de naturaleza alimenticia utilizada, es decir, la cantidad y el tamaño de partícula de la misma
- La optimización de los parámetros FIA que vienen determinados por las características físicas del sistema, que a su vez, vienen determinadas por los valores óptimos de los parámetros que afectan a la extracción/disolución del metal de la muestra sólida de naturaleza alimenticia

Para realizar la optimización de los parámetros que afectan a la extracción/disolución del metal de la muestra sólida de naturaleza alimenticia se ha utilizado un diseño factorial debido a que el número de variables potencialmente implicadas es elevado (6 variables para el cinc, cobre, hierro y manganeso y 7 variables para el calcio y magnesio). Así, es necesario aplicar un diseño factorial de *Screening*, para reducir de modo significativo el número de experimentos a realizar en la optimización. Uno de los diseños de *Screening* más utilizados es el diseño de Plackett-Burman. Este diseño permite fraccionar un diseño factorial completo proporcionando números de combinaciones de factores que son un múltiplo de cuatro. Por ejemplo, si se aplicara un diseño factorial completo a 2 niveles para 6 variables (2^6) implicaría la realización de 64 experimentos y para 7 variables (2^7) habría que realizar 128 experimentos. Sin embargo, aplicando el diseño de Plackett-Burman con un punto central, como el que se aplica en este trabajo, hay que realizar 13 experimentos en ambos casos.

Las variables a optimizar en el proceso de extracción/disolución son las siguientes:

- Concentración de HNO_3
- Concentración de HCl
- Tiempo de sonicación
- Temperatura de extracción/disolución
- Caudal de extracción/disolución
- Volumen de disolución “extractante”

El ácido nítrico y el clorhídrico se utilizan como disolución “extractante”. En un principio también se consideró dentro de los componentes de la disolución “extractante” el H_2O_2 , pero estudios previos realizados por el grupo de investigación indicaron que este reactivo bajo la acción de la energía de ultrasonidos genera muchas burbujas (desprendimiento de oxígeno) que, por una parte, impedían conocer el volumen exacto de disolución extractante en el sistema y, por otra, daban lugar a presiones dentro de dicho sistema haciendo seriamente dificultosa la extracción del metal.

En los casos de la extracción/disolución del calcio y magnesio se incluye una variable más, que es la concentración de lantano, a pesar de que no es una variable implicada directamente en el proceso de extracción/disolución. Esta variable se ha incluido en este grupo porque para poder realizar la determinación tanto del calcio como del magnesio, es necesario eliminar las posibles interferencias químicas que sufren estos dos metales en la celda de atomización. Además, el extracto debe de ser diluido, ya que las concentraciones de estos dos metales presentes en las muestras objeto de estudio son muy elevadas.

Para poder realizar este diseño es necesario fijar un valor máximo y un valor mínimo para cada variable. Estos valores fueron seleccionados en función de experimentos realizados en estudios previos en todos los casos.

Los diseños factoriales aplicados son los de Plackett-Burman $2^{6*3/16}$ de resolución tipo IV con 6 grados de libertad y $2^{7*3/32}$ de resolución tipo III con 5 grados de libertad, ambos con un punto central (Statgraphic v. 4.0). Se aplicó un diseño u otro para 6 y 7 variables, respectivamente. En los dos casos la optimización con estos dos diseños implica realizar 13 experimentos no randomizados. En este diseño se ha considerado un punto central en el que las variables toman un valor medio entre el límite superior e inferior establecidos. Las Tablas 27 y 28 muestran las matrices correspondientes a estos dos diseños factoriales con los 13 experimentos a realizar para la optimización del proceso. En estas matrices se indica como +1 cuando la variable en el experimento toma como valor el límite superior, como -1 cuando toma el límite inferior y 0 cuando toma el valor medio. Como se puede observar en las dos matrices de experimentos, la última fila dada por este tipo de diseño está formada por los valores mínimos de cada variable. Además, se mantiene la ortogonalidad, ya

que el número de veces en que aparecen los niveles altos (+1) es igual al número que aparecen los niveles bajos (-1).

Tabla 27. Matriz del diseño de Plackett- Burman $2^6 \cdot 3/16$ en el que se obtienen 13 experimentos para las 6 variables citadas

Experimento	A	B	C	D	E	F
1	+1	-1	+1	-1	-1	-1
2	+1	+1	-1	+1	-1	-1
3	-1	+1	+1	-1	+1	-1
4	+1	-1	+1	+1	-1	+1
5	+1	+1	-1	+1	+1	-1
6	+1	+1	+1	-1	+1	+1
7	0	0	0	0	0	0
8	-1	+1	+1	+1	-1	+1
9	-1	-1	+1	+1	+1	-1
10	-1	-1	-1	+1	+1	+1
11	+1	-1	-1	-1	+1	+1
12	-1	+1	-1	-1	-1	+1
13	-1	-1	-1	-1	-1	-1

A, [HNO₃]; B, [HCl]; C, Tiempo sonicación; D, Temperatura de extracción/disolución; E, Caudal de extracción/disolución; F, Volumen de disolución "extractante"

Tabla 28. Matriz del diseño de Plackett- Burman $2^7 \cdot 3/32$ en el que se obtienen 13 experimentos para las 7 variables citadas

Experimento	A	B	C	D	E	F	G
1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1
2	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1
3	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1
4	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1
5	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1
6	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1
7	0	0	0	0	0	0	0
8	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1
9	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1
10	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1
11	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1
12	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1
13	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

A, [HNO₃]; B, [HCl]; C, Tiempo sonicación; D, Temperatura de extracción/disolución; E, Caudal de extracción/disolución; F, Volumen de disolución "extractante"; G, [La].

Una vez obtenida la matriz adecuada en función de las variables implicadas en el proceso, se realizaron los experimentos fijados en la misma utilizando los dispositivos FIA indicados en la Figuras 11 y 12 (pág. 76) en función del metal objeto de estudio. Para realizar estos experimentos sobre las diferentes matrices, se han utilizado materiales de referencia, en los casos en los que se certificaba la concentración del metal objeto de estudio y, en los otros casos, se han utilizado muestras de las que se determinó por triplicado la concentración del mismo por el método de referencia descrito previamente (pág. 86). La cantidad del material de referencia o muestra utilizada para llevar a cabo la optimización del proceso de extracción ácida se ha fijado en función de la concentración del metal objeto de estudio presente.

La variable respuesta es el % eficacia en la extracción del metal en cada experimento propuesto por el diseño, como se indica en la siguiente ecuación:

$$(\%) \text{Eficacia en la extracción} = \frac{A}{B} \times 100$$

A: Concentración del metal objeto de estudio obtenida utilizando el sistema FIA propuesto

B: Concentración del metal objeto de estudio obtenida mediante el método de referencia

Los experimentos se han realizado por duplicado, por lo que el % eficacia en la extracción indicado es la media obtenida de los dos experimentos.

Una vez obtenidos los datos experimentales se procedió en cada caso al análisis correspondiente del diseño.

En lo que respecta a las optimizaciones de las características de la muestra sólida (cantidad y tamaño de partícula de la misma) y de los parámetros FIA, éstas se han realizado de modo univariante.

4.1 Optimización de los parámetros que afectan a la extracción de los metales de las muestras sólidas de naturaleza alimenticia utilizando el sistema continuo de extracción asistida por ultrasonidos (CUES)

4.1.1 Extracción de calcio

La optimización de este proceso se ha realizado utilizando el dispositivo FIA indicado en la Figura 12 (pág. 76) en el que se incluye un canal de dilución de lantano para, por una parte, diluir las elevadas concentraciones de calcio presentes en las muestras de alimentos y, por otra, eliminar las interferencias químicas que sufre este metal en la celda de atomización. Las diluciones llevadas a cabo dependen de las concentraciones de calcio presentes en las muestras. Así, en función de la concentración de calcio presente en las muestras se proponen 3 sistemas:

- un sistema que realiza una dilución con lantano 1:10 para las muestras de moluscos y pescados
- un sistema que realiza una dilución con lantano 1:25 para las muestras de verduras, hortalizas y frutas
- un sistema que realiza una dilución con lantano 1:4 para las muestras de carne, cereales y derivados, frutos secos y legumbres

Para realizar la optimización del proceso se ha utilizado el diseño de Plackett-Burman $2^{7*3}/32$ de resolución tipo III con 5 grados de libertad y un punto central (Tabla 28), ya que como se ha comentado previamente la extracción de calcio está afectada por las 6 variables implicadas propiamente en la extracción (concentración de HNO_3 , concentración de HCl , tiempo de sonicación, temperatura de extracción, caudal de extracción y volumen de disolución extractante) además de la concentración de lantano, que es utilizado como reactivo que elimina las interferencias químicas del calcio en la celda de atomización y como diluyente. Para poder realizar el diseño se han fijado los valores máximos y mínimos indicados en la Tabla 29. Estos valores

fueron seleccionados en función de experimentos realizados en estudios previos.

Tabla 29. Valores máximos y mínimos establecidos para cada variable en el diseño de Plackett-Burman

VARIABLE	NOTACIÓN	VALOR MÍNIMO	VALOR MÁXIMO
[HNO ₃]	A	0 M	3M
[HCl]	B	0 M	3 M
Tiempo de sonicación	C	0,5 min	5 min
Temperatura de extracción	D	20 °C	70 °C
Caudal de extracción	E	3,5 mL/min	6 mL/min
Volumen de disolución extractante	F	1,0 mL	5mL ó 3 mL ^a
[La]	G	0%	5%

a. En el caso de la muestra de carne dado que las concentraciones no son tan elevadas como en el resto de las matrices

Una vez obtenida la matriz del diseño, se realizaron los 13 experimentos fijados en la misma utilizando el dispositivo FIA indicado en la Figura 12. Para realizar estos experimentos sobre las diferentes matrices, se han utilizado materiales de referencia, en los casos en los que se certificaba la concentración de calcio y, en los otros casos, se han utilizado muestras en las que se había determinado su concentración de calcio previamente y por triplicado utilizando el método de referencia, ya descrito en la página 86 (Tabla 30). La cantidad de material de referencia o muestra utilizada para llevar a cabo la optimización del proceso se ha fijado en función de la concentración de calcio presente y de la dilución propuesta para cada tipo de matriz.

Tabla 30. Muestras y materiales de referencia utilizados en la optimización del proceso continuo de extracción ácida, concentración de calcio presente en dichas muestras y cantidad utilizada en la optimización

Tipo de matriz	Muestra con la que se realiza la optimización	[Ca]($\mu\text{g/g}$)	Cantidad de muestra (g, peso seco)
Moluscos y pescados	Mejillón	$3414,3 \pm 39,0$	0,0050
Carnes	Músculo de pollo	$1121,0 \pm 13,8$	0,0100
Cereales y derivados	Harina de trigo	$479,7 \pm 6,9$	0,0100
Frutos secos	Castañas	$831,4 \pm 20,6$	0,0100
Legumbres	Habas	$858,4 \pm 20,6$	0,0100
Verduras, hortalizas y frutas	Te NCS ^a DC 73351	4300 ± 200	0,0100

a. NCS:China National Analysis Center for Iron and Steel

La matriz del diseño de Plackett-Burman con los valores que toma cada variable en cada experimento y el % eficacia en la extracción obtenidos en cada uno de ellos para cada tipo de muestra se recogen en la Tabla 31. Los experimentos se han realizado por duplicado, por lo que el % eficacia en la extracción indicado es la media obtenida de los dos experimentos.

Una vez obtenidos los datos experimentales se procedió al análisis correspondiente del diseño. En principio es necesario conocer que variables son significativas, es decir aquellas que van a tener una gran influencia sobre la extracción del calcio, para ello se recurre a la **Carta Pareto estandarizada** (Figura 18). En este gráfico se representa el valor absoluto del efecto estimado de cada variable en el proceso mediante barras, lo que ayuda a estudiar la importancia relativa de las mismas.

Tabla 31. Matriz del diseño de Plackett-Burman con los valores de cada variable en cada experimento, con el %eficacia en la extracción de calcio obtenidas en cada uno de ellos para cada tipo de muestra

							%Eficacia en la extracción					
A	B	C	D	E	F	G	Moluscos y pescados	Carnes ^a	Cereales y derivados	Frutos secos	Legumbres	Verduras, hortalizas y frutas
3	0	5	20	3,5	1	5	101,5	102,7	100,2	100,2	99,8	100,5
3	3	0,5	70	3,5	1	0	58,3	58,6	58,6	57,8	58,8	59,7
0	3	5	20	6	1	0	51,4	51,3	48,8	49,4	49,2	49,9
3	0	5	70	3,5	5	0	40,7	40,6	47,8	48,8	47,3	54,0
3	3	0,5	70	6	1	5	101,5	101,6	102,7	91,8	101,2	92,4
3	3	5	20	6	5	0	66,7	65,8	72,3	70,0	74,7	62,1
1,5	1,5	2,75	45	4,75	3	2,5	102,2	102,6	102,2	101,4	102,3	100,9
0	3	5	70	3,5	5	5	84,0	84,6	84,6	91,2	81,5	102,9
0	0	5	70	6	1	5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
0	0	0,5	70	6	5	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
3	0	0,5	20	6	5	5	92,6	90,9	96,9	91,2	95,2	102,9
0	3	0,5	20	3,5	5	5	84,0	84,6	84,6	84,2	81,5	94,8
0	0	0,5	20	3,5	1	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

A, [HNO₃]; B, [HCl]; C, Tiempo sonicación; D, Temperatura de extracción; E, Caudal de extracción; F, Volumen de disolución extractante; G, [La].

a. En el caso de las muestras de carne el volumen de disolución extractante se ha estudiado entre 1-3mL. Por lo tanto, en los experimentos de la matriz de Plackett-Burman que esta variable toma el valor de 5mL, para las muestras de carne el volumen es de 3 mL, y donde el volumen toma el valor de 3 mL, para este tipo de muestras es de 1,5 mL.

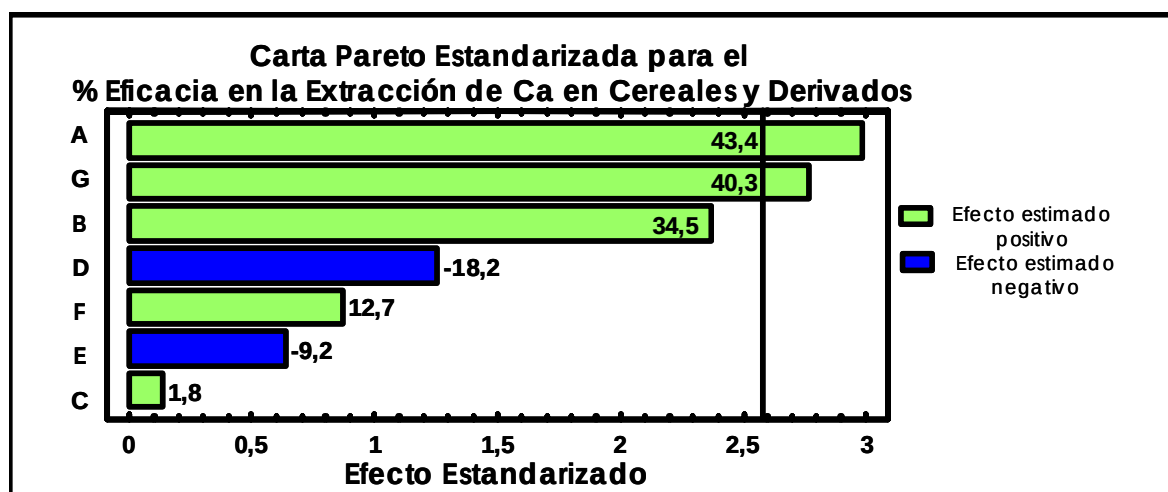
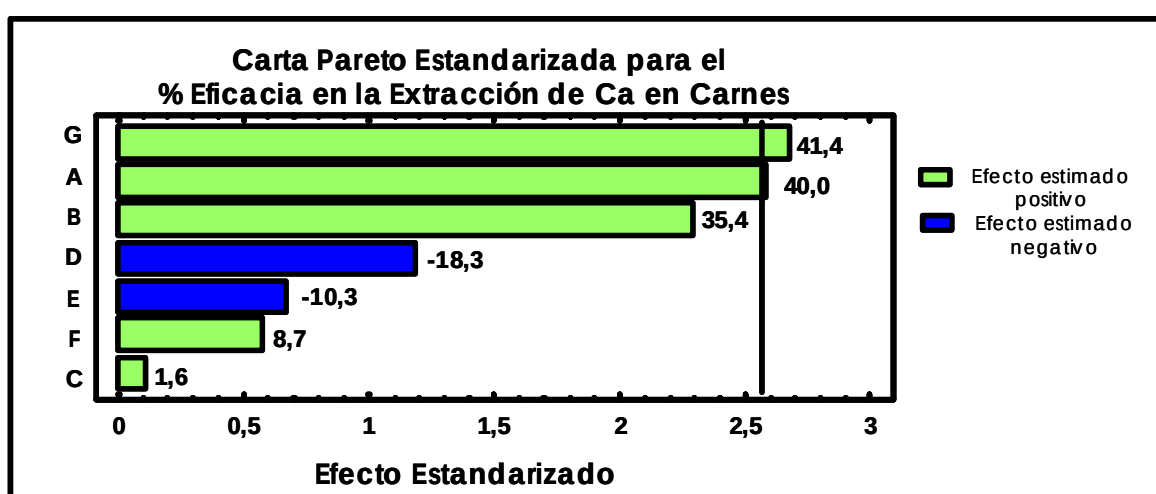
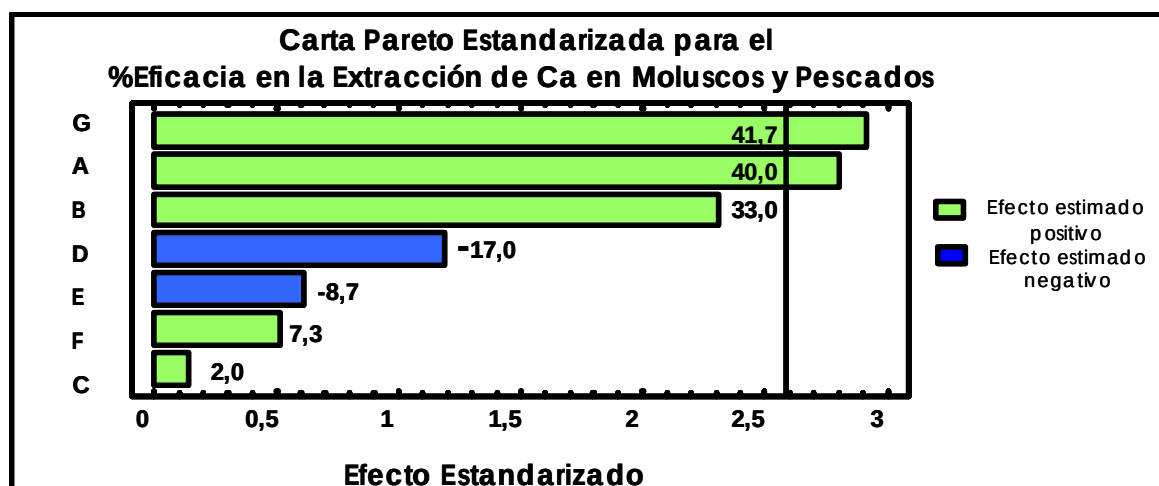


Figura 18. Carta Pareto estandarizada de los efectos principales estandarizados en el diseño factorial; la flecha vertical indica el límite de significación estadística para los efectos. A, $[\text{HNO}_3]$; B, $[\text{HCl}]$; C, Tiempo sonicación; D, Temperatura de extracción; E, Caudal de extracción; F, Volumen de disolución extractante; G, $[\text{La}]$.

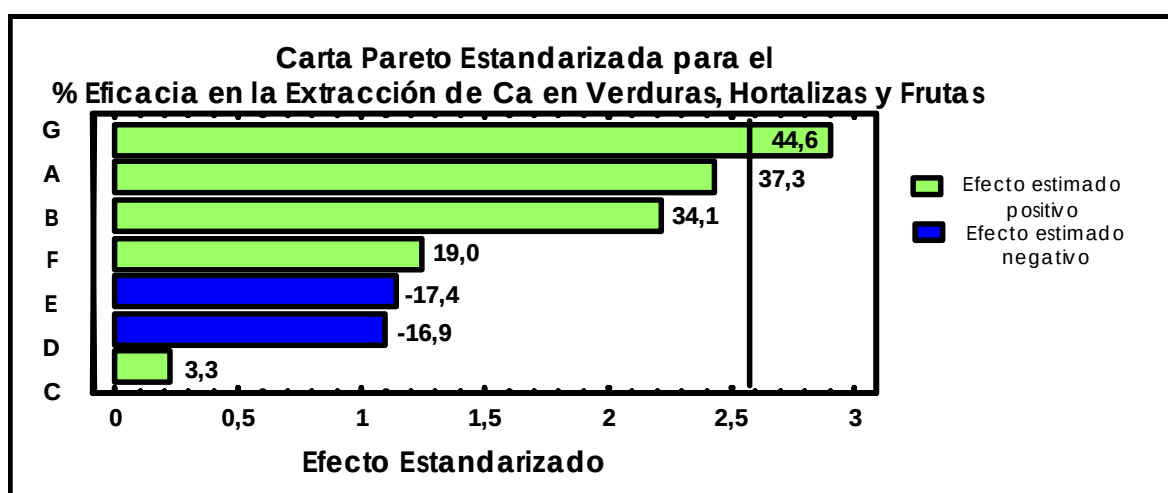
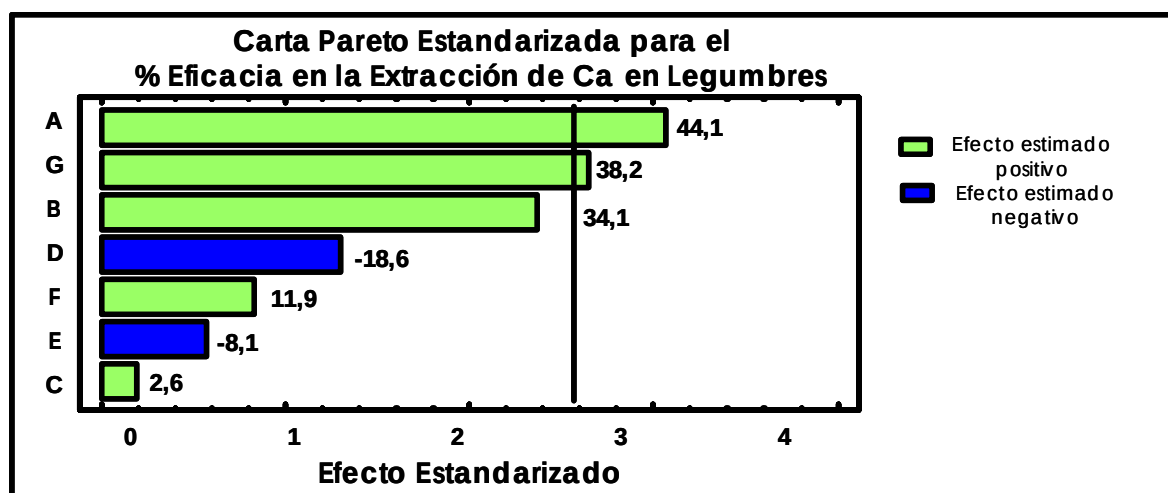
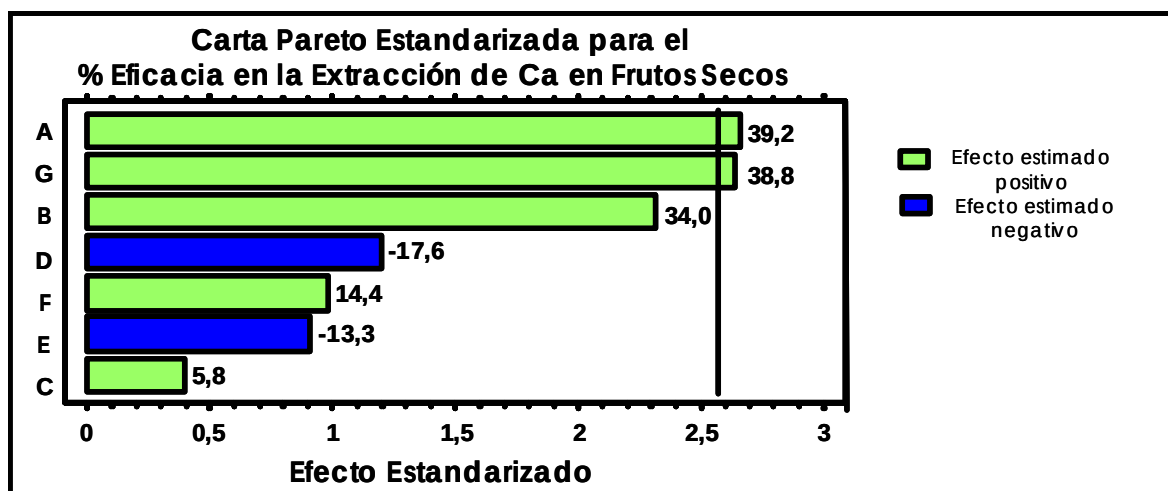


Figura 18 (continuación). Carta Pareto estandarizada de los efectos principales estandarizados en el diseño factorial; la flecha vertical indica el límite de significación estadística para los efectos. A, $[\text{HNO}_3]$; B, $[\text{HCl}]$; C, Tiempo sonicación; D, Temperatura de extracción; E, Caudal de extracción; F, Volumen de disolución extractante; G, $[\text{La}]$.

- **Análisis de los resultados obtenidos con el diseño factorial**

En los resultados obtenidos al aplicar el diseño de Screening a la extracción de calcio, se observa que para la mayoría de los tipos de muestras son dos las variables estadísticamente significativas en el proceso. Estas variables son la concentración de lantano y la concentración de HNO_3 , ya que son las que sobrepasan el límite de significación estadístico para los efectos (95%). Sólo para las verduras, hortalizas y frutas la situación es diferente, ya que la extracción ácida en este tipo de muestras viene determinada sólo por una variable significativa, la concentración de lantano.

Estos dos factores, las concentraciones de La y HNO_3 , presentan en todos los casos estudiados, una gran influencia positiva en el proceso, lo que significa que para los niveles estudiados un incremento en el valor de estas variables implica un incremento en la eficacia en la extracción de calcio tal y como se observa en las superficies de respuesta para estas dos variables (Figura 19).

Si la concentración de lantano no es la suficiente para complejar las sustancias interferentes, se produce una reacción entre éstas y el calcio que hace que su concentración en la celda de atomización sea menor, por lo que la señal de absorbancia es menor. En el caso del ácido nítrico, el efecto positivo en la extracción es debido a su poder oxidante que mejora significativamente el proceso de extracción ácida.

Las demás variables tienen una mayor o menor influencia sobre la extracción en el intervalo estudiado, pero como se observa en los gráficos obtenidos (Figura 18), no superan el nivel de significación establecido (un 95% de confianza representado por la línea vertical).

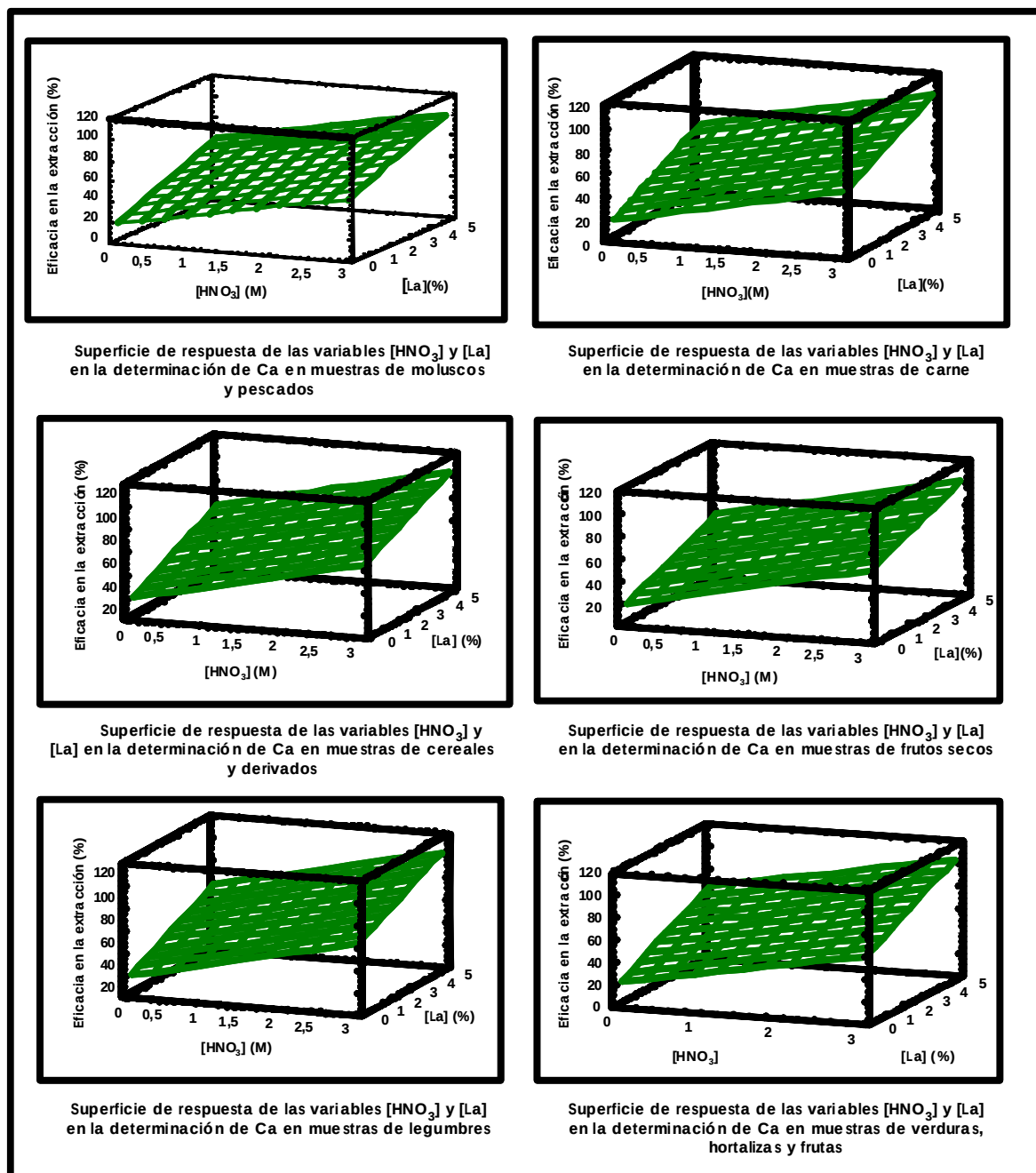


Figura 19. Superficies de respuesta proporcionadas por el diseño de Plackett-Burman para las variables $[HNO_3]$ y $[La]$ en la determinación de calcio en todos los tipos de muestras estudiados (las demás variables toman el valor medio del intervalo de estudio establecido en el diseño)

La concentración de HCl, el tiempo de sonicación y el volumen de disolución extractante son variables estadísticamente no significativas que presentan un efecto estimado positivo. El efecto positivo de la concentración de HCl, se explica teniendo en cuenta que este ácido es un ácido fuerte, y, como tal, favorece la extracción. El tiempo de sonicación también favorece la

extracción, ya que cuanto más tiempo permanezca la muestra bajo la acción de la energía de ultrasonidos, mayor contacto se produce entre la muestra y la disolución extractante, y por tanto, son más favorables las condiciones para la extracción. Sin embargo, tiempos de sonicación elevados suponen elevados tiempos de análisis, lo que se traduce en una reducción de la frecuencia de muestreo. En lo que respecta al volumen de la disolución extractante, se observa que tiene un efecto positivo en la extracción, pero este efecto no es de gran valor analítico. Esto se debe a que la extracción es cuantitativa para el intervalo de volúmenes de disolución extractante estudiados y además, en la determinación de calcio, el extracto debe ser diluido con lantano en todos los casos, con lo que el resultado final será el mismo, pues la dilución se ajustará a la concentración de calcio presente en la muestra y al intervalo lineal de este metal en FAAS.

Por otra parte, se observa que los efectos estimados de la temperatura y el caudal de extracción son negativos, lo que indica que la eficacia de la extracción es inversamente proporcional a dichos factores en los intervalos establecidos (la extracción de calcio se ve favorecida cuanto menores sean estos valores). El efecto negativo de la temperatura simplifica bastante el proceso de extracción, pues las medidas se pueden realizar a temperatura ambiente (20 °C), es decir, no es necesario un calentamiento previo del agua del baño de ultrasonidos y no se trabaja con un extracto ácido caliente. En lo que respecta al caudal de extracción, se puede justificar su efecto negativo por posibles compactaciones de la muestra que pueden tener lugar en el interior de la columna si el caudal es elevado.

En el caso de las muestras de verduras, hortalizas y frutas, a pesar de que el proceso sólo se ve afectado significativamente por la concentración de lantano, el comportamiento de cada una de las variables se ajusta a la tendencia general explicada previamente.

Una vez analizados los resultados obtenidos al aplicar el diseño de Plackett-Burman, los valores óptimos según el diseño de Screening para cada una de las variables son los indicados en la Tabla 32.

Tabla 32. Valores óptimos según el diseño de Plackett-Burman para cada una de las variables implicadas en el proceso de extracción de calcio de los diferentes tipos de muestras

Variables	VALORES ÓPTIMOS PARA CADA UNA DE LAS VARIABLES SEGÚN EL DISEÑO DE PLACKETT-BURMAN					
	Moluscos y pescados	Carnes ^a	Cereales y derivados	Frutos secos	Legumbres	Verduras, hortalizas y frutas
A (M)	3	3	3	3	3	3
B (M)	3	3	3	3	3	3
C (min)	5	5	5	5	5	5
D (°C)	20	20	20	20	20	20
E (mL/min)	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
F (mL)	5	3	5	5	5	5
G (%)	5	5	5	5	5	5

A, [HNO₃]; B, [HCl]; C, Tiempo sonicación; D, Temperatura de extracción; E, Caudal de extracción; F, Volumen de disolución extractante; G, [La].

a. En el caso de las muestras de carne el volumen de disolución extractante se ha estudiado entre 1-3mL dado que las [Ca] encontradas en este tipo de muestras son inferiores

Dado que los resultados proporcionados por el diseño de Plackett-Burman son las tendencias de cada una de las variables hacia el valor óptimo, se realizaron una serie de experimentos fuera del marco del diseño, de acuerdo con los resultados obtenidos por el mismo, para obtener los valores óptimos de cada variable para cada tipo de muestra.

• Experimentos realizados fuera del marco del diseño

Como ya se ha comentado, los valores establecidos por el diseño de Plackett-Burman sólo indican la tendencia de cada variable hacia el valor óptimo dentro del intervalo de valores establecido previamente para cada variable. Por tanto, se han realizado una serie de experimentos fuera del marco de este diseño para obtener los valores óptimos de las variables. No se ha aplicado otro diseño factorial para afinar estos valores debido a que un diseño que proporcione el valor óptimo preciso implica realizar un gran número de experimentos (por ejemplo aplicar un diseño factorial completo a 2 niveles para 7 variables (2⁷) implicaría la realización de 128 experimentos). Además de que en este punto se dispone de bastante información del comportamiento de cada variable implicada en el proceso de extracción

como para poder ajustar estos valores óptimos realizando un número relativamente pequeño de experimentos.

Para realizar esta optimización se realizaron una serie de experimentos (por triplicado) mediante un estudio variable a variable y partiendo de los valores propuestos por el diseño.

- **Experimentos realizados para la optimización de la extracción de calcio en la muestras de Moluscos y Pescados**

Se estudiaron primero aquellas variables que parecía que no tenían tanto “peso” en la extracción. Dentro de las variables no significativas con efecto positivo se encuentran el volumen de disolución extractante (efecto estimado= 7,3) y el tiempo de sonicación (efecto estimado= 2,0). El **volumen de disolución extractante**, se ha estudiado entre 1mL y 5 mL. Según los resultados obtenidos, el volumen óptimo sería 5 mL, pero se ha estudiado la posibilidad de disminuirlo, ya que así el circuito de extracción no sería tan grande, el extracto estaría más concentrado y el volumen de los ácidos utilizados sería menor (Tabla 33).

Tabla 33. Experimentos realizados para la optimización del volumen de disolución extractante

Volumen de disolución extractante (mL) ^a	[Ca] µg/g ^b	(%) Eficacia en la extracción
5	3358,6 ± 170,4	98,4
4	3395,2 ± 136,3	99,4
3	3431,7 ± 102,2	100,5
2	3428,9 ± 68,1	100,4
1	3445,7 ± 34,8	100,9

a. [HNO₃]=3M; [HCl]=3M; Tiempo de sonicación = 5 min; Temperatura de extracción= 20°C; Caudal de extracción=3,5 mL/min; [La]=5%

b. [Ca] = Media ± desviación estándar (n=3)

Como se puede observar en la Tabla 33, 1 mL de disolución extractante es suficiente para extraer cuantitativamente el calcio existente en las muestras de moluscos y pescados. Además, se observa que, aunque en todos los casos las extracciones son cuantitativas, a medida que disminuye el volumen de disolución extractante los resultados son más precisos (menor desviación estándar), ya que las señales de absorbancia son mayores (para un volumen de disolución extractante de 4 mL la absorbancia es en torno a 0,0150 y con 1

mL es en torno a 0,059). Por tanto, el volumen óptimo de disolución extractante se establecerá en 1 mL. No se estudió la posibilidad de disminuir más el volumen de disolución extractante por las características físicas del sistema, ya que volúmenes menores implicarían un circuito de extracción demasiado pequeño.

El **tiempo de sonicación** se ha optimizado con el **caudal de extracción**, ya que estas dos variables están relacionadas, pues a mayor caudal de extracción el tiempo necesario para extraer el metal es menor. Así se ha estudiado el tiempo de sonicación a los dos caudales que se han establecido en el intervalo de estudio, 3,5 mL/min y 6,0 mL/min (Figura 20). El objetivo es minimizar el tiempo de extracción, pues así se maximiza la frecuencia de muestreo. De esta forma, se comprueba que el tiempo mínimo necesario para realizar una extracción cuantitativa a una caudal de 3,5 mL/min es de 1 minuto. Sin embargo, si el caudal es de 6 mL/min el tiempo mínimo necesario es de 0,5 minutos. Como se ha comentado previamente, el objetivo es obtener la mayor frecuencia de muestreo, y así los valores considerados óptimos para estas dos variables son 6 mL/min para el caudal de extracción, y 0,5 minutos para el tiempo de sonicación.

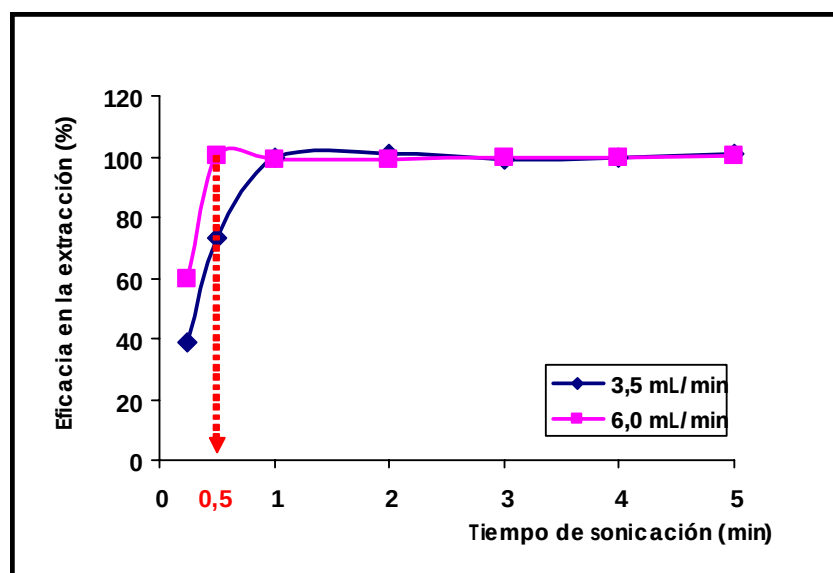


Figura 20. Experimentos realizados para la optimización del tiempo de sonicación a un caudal de extracción de 3,5 mL/min y 6,0 mL/min. $[\text{HNO}_3]=3\text{M}$; $[\text{HCl}]=3\text{M}$; Temperatura de extracción= 20°C ; Volumen de disolución extractante=1mL; $[\text{La}]=5\%$

La **temperatura de extracción** es una variable no significativa y tiene un efecto estimado negativo (efecto estimado=-17). Esto significa que a temperatura ambiente (20°C) la extracción es cuantitativa (ver experimento 1, Tabla 31). Como la realización del análisis a temperatura ambiente simplifica el proceso porque no se necesita un calentamiento previo del baño de ultrasonidos, y además, resulta un proceso con menos riesgos para el analista, ya que no se trabaja con ácidos a temperatura elevada, el valor óptimo para esta variable no se ha estudiado fuera del marco del diseño y se ha establecido en 20 °C.

Con respecto a la **composición de la disolución extractante**, interesa que la concentración ácida presente sea la menor posible, por los posibles daños que pueda causar esta concentración ácida en los conductos del nebulizador del espectrofotómetro de absorción atómica con llama. Con este objetivo se hicieron dos estudios:

-primero, la disminución de la **concentración de HCl**, ya que es este el componente de la disolución extractante que no es una variable significativa (Tabla 34).

-segundo, una vez optimizada la concentración de HCl, se estudió la posibilidad de disminuir la **concentración de HNO₃** de la disolución extractante.

Tabla 34. Experimentos realizados para la optimización de la concentración de HCl

[HCl] (M) ^a	[Ca] µg/g ^b	(%)Eficacia en la extracción
3,0	3426,1 ± 34,1	100,3
1,5	3445,8 ± 34,1	100,5
0,0	3426,1 ± 34,1	100,3

a. [HNO₃]=3M; Tiempo de sonicación=0,5 min; Temperatura de extracción= 20°C; Caudal de extracción=6,0 mL/min; Volumen de disolución extractante=1mL; [La]=5%

b. [Ca] = *Media ± desviación estándar (n=3)

En la Tabla 34 se observa que si se elimina HCl de la disolución extractante, se obtienen eficacias en la extracción cuantitativas (esto viene también reflejado en el experimento 1 de la matriz de Plackett-Burman, Tabla 31). Por

tanto, como valor óptimo de la concentración de HCl se tomará el cero, es decir, se elimina este ácido de la disolución extractante.

Una vez eliminado el HCl de la disolución extractante, se estudió la posibilidad de disminuir la concentración del HNO_3 . Por tanto, se realizó por triplicado un experimento con una concentración de HNO_3 2M, obteniéndose una eficacia en la extracción de un 81,3%. Así, la disolución extractante óptima final es una disolución de HNO_3 3M.

La **concentración de lantano** es la variable significativa con mayor influencia en el proceso, pero a pesar de ello se ha estudiado la posibilidad de disminuir su valor fuera del marco del diseño (Tabla 35). Esto se ha llevado a cabo debido a que el $\text{LaCl}_3 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ es un reactivo caro y porque en el diseño se ha estudiado una concentración entre un 0% y un 5%, con lo que se vió factible la posibilidad de disminuir su concentración.

Tabla 35. Experimentos realizados para la optimización de la concentración de lantano

[La] (%) ^a	[Ca] $\mu\text{g/g}$ ^b	(%)Eficacia en la extracción
5	3445,8 $\pm$ 34,1	100,9
4	3426,1 $\pm$ 90,2	100,3
3	3426,1 $\pm$ 34,1	100,3
2	3445,8 $\pm$ 34,1	100,9
1	2796,5 $\pm$ 34,1	81,9

a. $[\text{HNO}_3]=3\text{M}$; $[\text{HCl}]=0\text{M}$; Tiempo de sonicación= 0,5 min; Temperatura de extracción= 20°C; Caudal de extracción=6,0 mL/min; Volumen de disolución extractante=1mL

b. [Ca] = Media $\pm$ desviación estándar (n=3)

A la vista de los resultados (Tabla 35), se concluye que una concentración de La de un 2% es suficiente para eliminar las interferencias químicas.

Los resultados obtenidos para las dos variables significativas del proceso, se corroboran si se analiza con detenimiento la superficie de respuesta para estas dos variables establecida previamente por el diseño de Plackett-Burman (Figura 21).

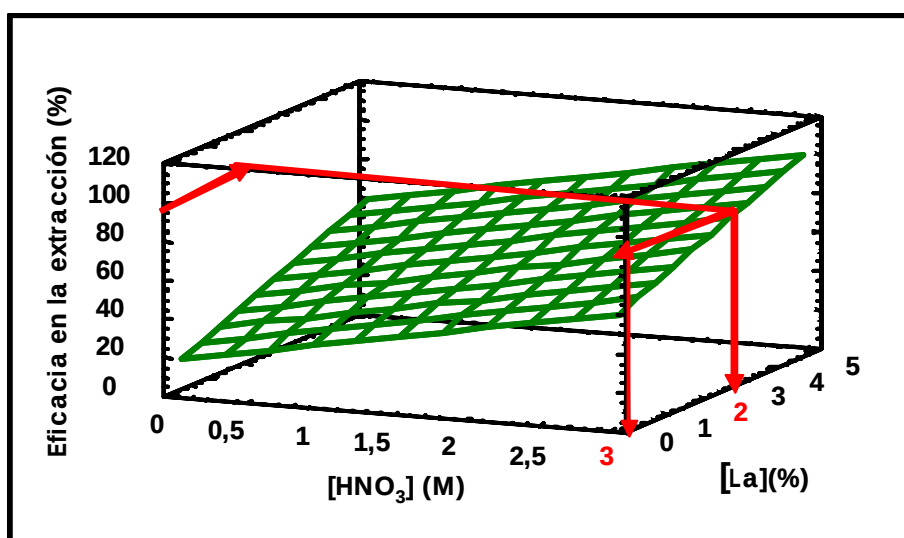


Figura 21. Superficie de respuesta obtenida con el modelo de Plackett-Burman para las variables significativas del proceso ([La] (%) y $[\text{HNO}_3]$ (M)) en el análisis de muestras de moluscos y pescados, donde las demás variables toman un el valor medio del intervalo de estudio establecido en el diseño. $[\text{HCl}] = 1,5 \text{ M}$; Tiempo de sonicación = 2,75 min; Temperatura de extracción = 45°C ; Caudal de extracción = 4,75 mL/min; Volumen de disolución extractante = 3 mL

Una vez optimizados todos los valores, según los resultados obtenidos en el diseño de Plackett-Burman, los valores óptimos para cada variable en la extracción de calcio en las muestras de moluscos y pescados se indican en la Tabla 36.

Tabla 36. Valores óptimos para cada una de las variables implicadas en el proceso de extracción de calcio de las muestras de moluscos y pescados

VARIABLE	VALORES ÓPTIMOS PARA CADA UNA DE LAS VARIABLES
$[\text{HNO}_3]$	3M
$[\text{HCl}]$	0M
Tiempo de sonicación	0,5 min
Temperatura de extracción	20°C
Caudal de extracción	6,0 mL/min
Volumen de disolución extractante	1 mL
[La]	2 %

- **Experimentos realizados para la optimización de la extracción de calcio en muestras de Carne**

En la extracción de calcio en muestras de carne, como para casi todos los tipos de muestras objeto de estudio, la extracción y determinación de calcio está afectada principalmente por las concentraciones de La y HNO_3 . A pesar de que estas variables tienen un elevado efecto estimado positivo, se estudió también fuera del marco del diseño la posibilidad de disminuir su concentración. Para llevar a cabo el ajuste de los óptimos obtenidos con el diseño factorial, se ha comenzado por aquellas variables que no son significativas. Dentro de estas variables no significativas se encuentran la concentración de HCl , el volumen de disolución extractante y el tiempo de sonicación (con efectos positivos), y, por otra parte, la temperatura y el caudal de extracción (con efectos negativos).

El **volumen de disolución extractante**, se ha estudiado entre 1 mL y 3 mL, a diferencia de los casos restantes donde el límite superior establecido para el volumen es de 5 mL. Esto es debido a que la concentración de calcio en este tipo de muestras es inferior a la existente en los otros tipos de muestras estudiados. A pesar de que esta variable presenta un efecto positivo, se observa que 1 mL de disolución es capaz de extraer cuantitativamente todo el calcio de las muestras de carne (experimentos 1 y 5 de la matriz de Plackett-Burman, Tabla 31). Así, debido a que un volumen pequeño de disolución extractante ofrece las ventajas ya indicadas, se ha tomado 1 mL como el valor óptimo para esta variable.

El **tiempo de sonicación** es otra variable no significativa con efecto positivo en la extracción. Como en los anteriores casos, esta variable se ha optimizado con el **caudal de extracción** debido a la relación existente entre estas variables (Figura 22). A la vista de los resultados obtenidos para los diferentes experimentos y teniendo en cuenta que el objetivo es minimizar el tiempo de extracción para obtener una mayor frecuencia de muestreo, se han tomado como valores óptimos 0,5 min y 6,0 mL/min para estas dos variables, respectivamente.

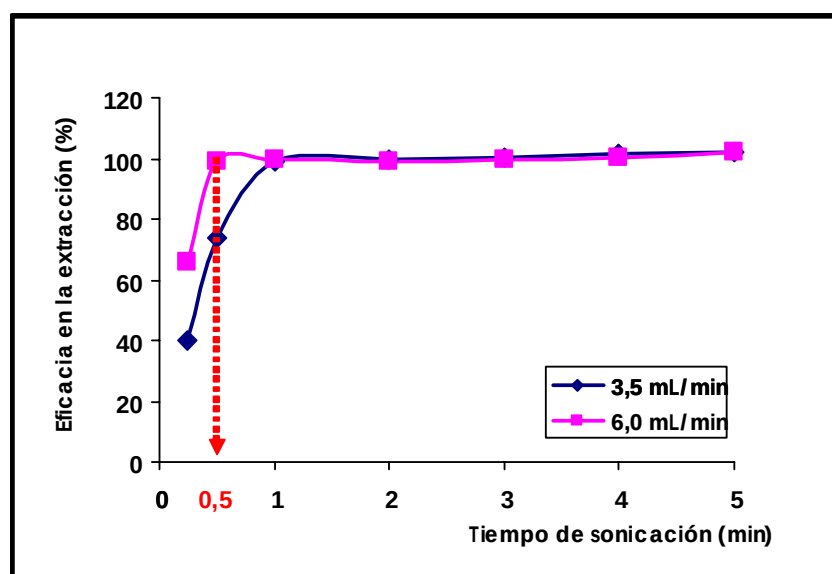


Figura 22. Experimentos realizados para la optimización del tiempo de sonicación a un caudal de extracción de 3,5 mL/min y 6,0 mL/min. $[\text{HNO}_3]=3\text{M}$; $[\text{HCl}]=3\text{M}$; Temperatura de extracción= 20°C ; Volumen de disolución extractante=1mL; $[\text{La}]=5\%$

El valor óptimo de **temperatura de extracción** se ha fijado en 20°C , que es el óptimo propuesto por el diseño de Screening, ya que a esta temperatura se extrae cuantitativamente el metal (experimento 1 de la matriz de Plackett-Burman, Tabla 31) y se simplifica el proceso.

En lo que respecta a la disolución extractante, se ha estudiado la posibilidad de disminuir al máximo la concentración ácida por los inconvenientes que conlleva trabajar con ácidos concentrados. Se ha comenzado disminuyendo **la concentración de HCl**, ya que es esta la variable no tiene un efecto significativo. En la Tabla 37 se observa que si se elimina de la disolución extractante el HCl, se obtienen eficacias en la extracción cuantitativas. Por tanto, como el objetivo es disminuir la concentración ácida de la disolución, el valor óptimo elegido para esta variable, a pesar del efecto estimado positivo que presentaba en el diseño de Screening, será cero.

Tabla 37. Experimentos realizados para la optimización de la concentración de HCl

[HCl] (M) ^a	[Ca] µg/g ^b	(%)Eficacia en la extracción
3,0	1139,1 ± 11,8	101,6
1,5	1143,0 ± 6,8	102,0
0,0	1115,6 ± 11,8	99,5

a. [HNO₃]=3M; Tiempo de sonicación=0,5 min; Temperatura de extracción= 20°C; Caudal de extracción=6,0 mL/min; Volumen de disolución extractante=1mL; [La]=5%

b. [Ca] = Media ± desviación estándar (n=3)

Una vez eliminado el HCl de la disolución extractante se ha estudiado la posibilidad de disminuir **la concentración de HNO₃**, a pesar de que esta sea una variable significativamente positiva par el proceso (Tabla 38). Con estos resultados se observa que una concentración de HNO₃ 1,5 M es suficiente para realizar la extracción cuantitativa de calcio en las muestras de carne.

Tabla 38. Experimentos realizados para la optimización de la concentración de HNO₃

[HNO ₃] (%) ^a	[Ca] µg/g ^b	(%)Eficacia en la extracción
3,0	1143,0 ± 6,8	102,0
1,5	1119,5 ± 6,8	99,9
0,75	978,5 ± 6,8	87,3

a. [HCl]=0M; Tiempo de sonicación= 0,5 min; Temperatura de extracción= 20°C; Caudal de extracción=6,0 mL/min; Volumen de disolución extractante=1mL; [La]=5%

b. [Ca] = Media ± desviación estándar (n=3)

La **concentración de lantano**, es la variable de mayor efecto estimado en el proceso. En los diferentes experimentos realizados (Tabla 39) se observa que utilizando La al 2% se obtienen eficacias en la extracción cuantitativas, y no es necesario utilizar una disolución más concentrada.

Tabla 39. Experimentos realizados para la optimización de la concentración de lantano

[La] (%) ^a	[Ca] µg/g ^b	(%)Eficacia en la extracción
5	1146,9 ± 6,8	102,3
4	1143,0 ± 6,8	102,0
3	1135,2 ± 6,8	101,3
2	1119,5 ± 6,8	99,9
1	892,3 ± 11,8	79,6

a. [HNO₃]=1,5M; [HCl]=0M; Tiempo de sonicación= 0,5 min; Temperatura de extracción= 20°C; Caudal de extracción=6,0 mL/min; Volumen de disolución extractante=1mL

b. [Ca] = Media ± desviación estándar (n=3)

Los resultados obtenidos para los óptimos de la concentración de La y la concentración de HNO_3 se corroboran si se estudia detenidamente la gráfica de superficie propuesta previamente por el diseño de Plackett-Burman para estas dos variables (Figura 23).

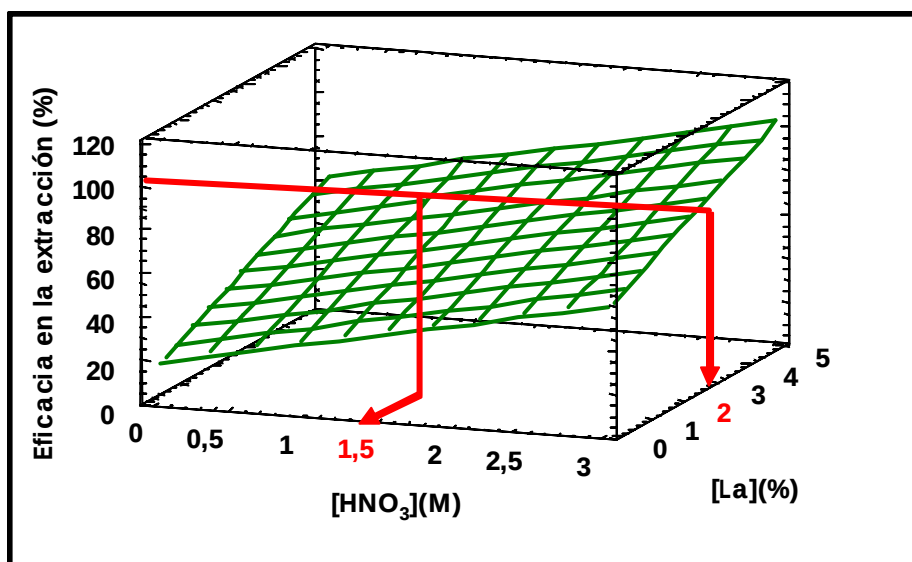


Figura 23. Superficie de respuesta obtenida con el modelo de Plackett-Burman para las variables significativas del proceso ($[\text{La}]$ (%) y $[\text{HNO}_3]$ (M)) en el análisis de muestras de carne, donde las demás variables toman un el valor medio del intervalos de establecido en el diseño. $[\text{HCl}] = 1,5 \text{ M}$; Tiempo de sonicación = 2,75 min; Temperatura de extracción = 45°C ; Caudal de extracción = 4,75 mL/min; Volumen de disolución extractante = 3 mL

Los valores óptimos obtenidos una vez estudiadas todas las variables implicadas en la extracción de calcio en muestras de carne se indican en la Tabla 40.

Tabla 40. Valores óptimos para cada una de las variables implicadas en el proceso de extracción de las muestras de carne para la determinación de calcio

VARIABLE	VALORES ÓPTIMOS PARA CADA UNA DE LAS VARIABLES
$[\text{HNO}_3]$	1,5M
$[\text{HCl}]$	0M
Tiempo de sonicación	0,5 min
Temperatura de extracción	20°C
Caudal de extracción	6,0 mL/min
Volumen de disolución extractante	1 mL
$[\text{La}]$	2 %

- Experimentos realizados para la optimización de la extracción de calcio en la muestras de Cereales y Derivados

Los resultados obtenidos para este tipo de muestras, como ya se indicado previamente, son muy similares a los obtenidos para las muestras de carne.

Al igual que en este último caso, se observa que un **volumen de disolución extractante** de 1mL es suficiente para extraer cuantitativamente el calcio de las muestras de cereales (experimentos 1 y 5 de la matriz de Plackett-Burman, Tabla 31).

Con respecto al **tiempo de sonicación** y al **caudal de extracción**, los estudios realizados (Figura 24) indican que el menor tiempo de extracción para el que se obtiene un %eficacia en la extracción cuantitativo es de 1 min (caudal 6 mL/min). Como de este modo se obtiene la máxima frecuencia de muestreo, son éstos los valores considerados como óptimos para estas dos variables.

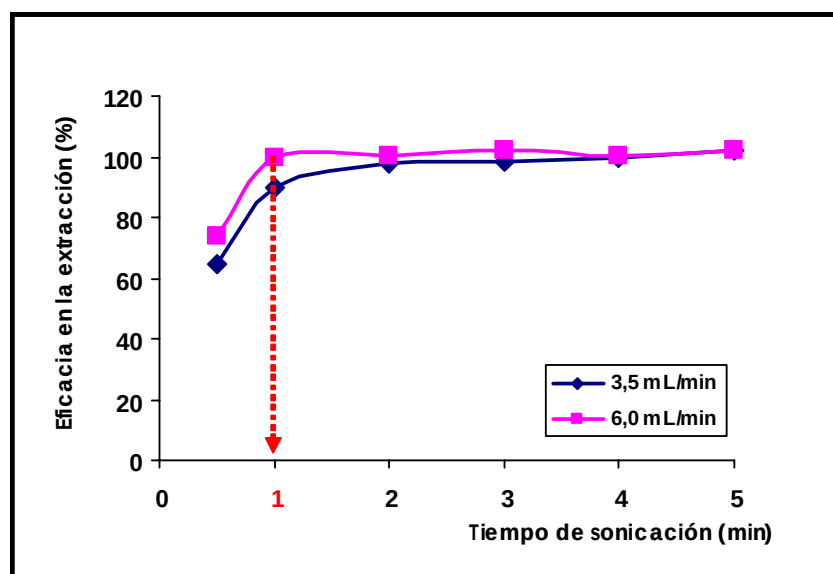


Figura 24. Experimentos realizados para la optimización del tiempo de sonicación a un caudal de extracción de 3,5 mL/min y 6,0 mL/min. $[\text{HNO}_3]=3\text{M}$; $[\text{HCl}]=3\text{M}$; Temperatura de extracción= 20°C ; Volumen de disolución extractante=1mL; $[\text{La}]=5\%$

El valor óptimo establecido para la **temperatura de extracción** es de 20°C , ya que a esta temperatura se extrae cuantitativamente el calcio de las

muestras de cereales, como se observa en los experimentos 1 y 11 de la matriz del diseño aplicado previamente (Tabla 31).

En lo que respecta a la disolución extractante, como se ha realizado en todo este estudio, se estudió la posibilidad de disminuir la concentración ácida. En primer lugar se llevaron a cabo diferentes experimentos para evaluar la posibilidad de eliminar o al menos disminuir **la concentración de HCl**, ya que es éste el componente de la disolución extractante de menor efecto estimado (Tabla 41). Se observa que este ácido no es indispensable para obtener eficacias en la extracción cuantitativas del metal objeto de estudio, con lo que se eliminó de la disolución extractante.

Tabla 41. Experimentos realizados para la optimización de la concentración de HCl

[HCl] (M) ^a	[Ca] µg/g ^b	(%)Eficacia en la extracción
3,0	480,8 ± 11,8	100,2
1,5	480,8 ± 11,8	100,2
0,0	476,9 ± 6,8	99,4

a. [HNO₃]=3M; Tiempo de sonicación=1,0 min; Temperatura de extracción= 20°C; Caudal de extracción=6,0 mL/min; Volumen de disolución extractante=1mL; [La]=5%
b. [Ca] = Media ± desviación estándar (n=3)

A pesar de que la concentración de HNO₃ es una variable significativa se ha estudiado la posibilidad de disminuirla en la disolución extractante. Así se ha comprobado que en el caso de los cereales, al igual que en el caso de las muestras de carne, una concentración de HNO₃ 1,5 M es suficiente para extraer todo el calcio (Tabla 42).

Tabla 42. Experimentos realizados para la optimización de la concentración de HNO₃

[HNO ₃] (%) ^a	[Ca] µg/g ^b	(%)Eficacia en la extracción
3,0	476,9 ± 6,8	99,4
1,5	488,7 ± 6,8	101,9
0,75	402,5 ± 6,8	83,9

a. [HCl]=0M; Tiempo de sonicación= 1,0 min; Temperatura de extracción= 20°C; Caudal de extracción=6,0 mL/min; Volumen de disolución extractante=1mL; [La]=5%
b. [Ca] = Media ± desviación estándar (n=3)

En el estudio realizado para determinar la posibilidad de disminuir la concentración de lantano, se observa al igual que en los casos estudiados previamente, que una disolución de La al 2% es suficiente para determinar sin

interferencias químicas el calcio existente en las muestras de cereales (Tabla 43).

Tabla 43. Experimentos realizados para la optimización de la concentración de lantano

[La] (%) ^a	[Ca] µg/g ^b	(%)Eficacia en la extracción
5	476,9 ± 6,8	99,4
4	488,7 ± 6,8	101,9
3	476,9 ± 6,8	99,4
2	480,8 ± 11,8	100,2
1	390,7 ± 6,8	81,5

a. [HNO₃]=1,5M; [HCl]=0M; Tiempo de sonicación= 1,0 min; Temperatura de extracción= 20°C; Caudal de extracción=6,0 mL/min; Volumen de disolución extractante=1mL

b. [Ca] = Media ± desviación estándar (n=3)

La gráfica de superficie para las variables concentración de La y concentración de HNO₃ obtenida mediante el diseño de Plackett-Burman para las muestras de cereales es idéntica a la obtenida en el estudio de la extracción de calcio en las muestras de carne (Figura 23), y como en el caso anterior, corrobora la información obtenida experimentalmente.

Los resultados óptimos para las diferentes variables en la extracción de calcio en muestras de cereales se muestran en la Tabla 44.

Tabla 44. Valores óptimos para cada una de las variables implicadas en el proceso de extracción de las muestras de cereales y derivados para la determinación de calcio

VARIABLE	VALORES ÓPTIMOS PARA CADA UNA DE LAS VARIABLES
[HNO ₃]	1,5M
[HCl]	0M
Tiempo de sonicación	1,0 min
Temperatura de extracción	20°C
Caudal de extracción	6,0 mL/min
Volumen de disolución extractante	1 mL
[La]	2 %

- Experimentos realizados para la optimización de la extracción de calcio en la muestras de Frutos Secos

Los resultados obtenidos en el diseño de Plackett-Burman para extracción de calcio en muestras de frutos secos no difieren de la tónica general comprobada para la extracción de este metal en matrices sólidas alimenticias.

Para el **volumen de disolución extractante**, se ha observado que 1mL es suficiente para extraer cuantitativamente el calcio de las muestras de cereales (experimentos 1 de la matriz de Plackett-Burman, Tabla 31). Por tanto, como ya se ha indicado que un volumen de disolución pequeño aporta una serie de ventajas, será este valor el considerado como óptimo para esta variable.

Con respecto al **tiempo de sonicación** y al **caudal de extracción**, los estudios realizados (Figura 25) indican que el menor tiempo de extracción para el que se obtiene un %eficacia en la extracción cuantitativo es de 1 min (caudal 6 mL/min).

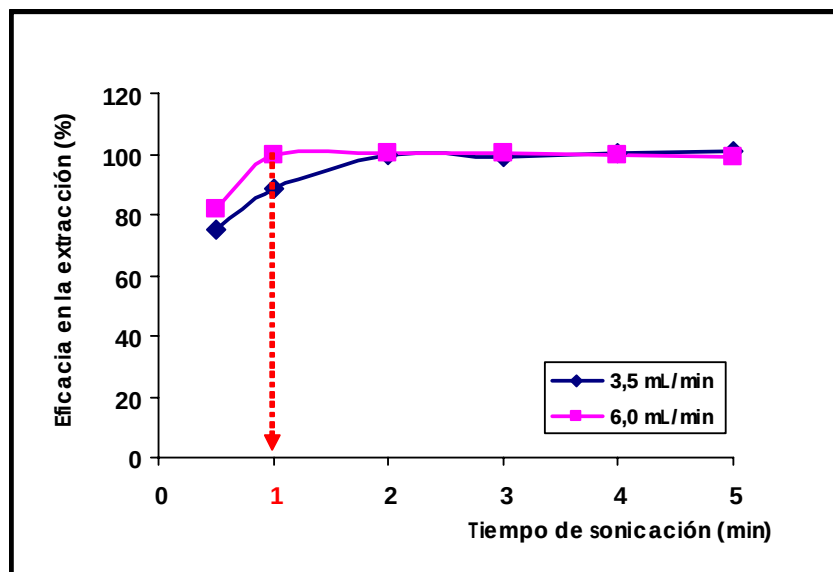


Figura 25. Experimentos realizados para la optimización del tiempo de sonicación a un caudal de extracción de 3,5 mL/min y 6,0 mL/min. $[\text{HNO}_3]=3\text{M}$; $[\text{HCl}]=3\text{M}$; Temperatura de extracción= 20°C ; Volumen de disolución extractante=1mL; $[\text{La}]=5\%$

El valor óptimo establecido para la **temperatura de extracción** es de 20°C , ya que a esta temperatura se obtienen eficacias en la extracción cuantitativas

de calcio (experimento 1 de la matriz de Plackett-Burman, Tabla 31) de las muestras de frutos secos.

En lo que respecta a la disolución extractante, se ha estudiado la posibilidad de eliminar o al menos disminuir **la concentración de HCl**, ya que este el componente de la disolución extractante no tiene un efecto significativo en la extracción (Tabla 45). Se observa que este ácido no es indispensable para obtener % eficacia en la extracción cuantitativos, con lo que se eliminará de la disolución extractante.

Tabla 45. Experimentos realizados para la optimización de la concentración de HCl

[HCl] (M) ^a	[Ca] µg/g ^b	(%)Eficacia en la extracción
3,0	825,6 ± 6,8	99,3
1,5	833,5 ± 11,8	100,2
0,0	841,3 ± 6,8	101,2

a. [HNO₃]=3M; Tiempo de sonicación=1,0 min; Temperatura de extracción= 20°C; Caudal de extracción=6,0 mL/min; Volumen de disolución extractante=1mL; [La]=5%

b. [Ca] = Media ± desviación estándar (n=3)

A pesar de que la concentración de HNO₃ es una variable significativa, se realizó un experimento por triplicado utilizando como disolución extractante una concentración de HNO₃ 2M obteniéndose una eficacia en la extracción de un 79,5%. Por tanto, para la determinación de calcio en muestras de frutos secos, la disolución extractante óptima es una disolución de HNO₃ 3M.

En el caso de la concentración de lantano, se ha estudiado también la posibilidad de disminuir el valor de esta variable a pesar de su significación. Los resultados obtenidos indican que una concentración de La de un 2% es suficiente para determinar satisfactoriamente el calcio en este tipo de matrices (Tabla 46).

Tabla 46. Experimentos realizados para la optimización de la concentración de lantano

[La] (%) ^a	[Ca] µg/g ^b	(%)Eficacia en la extracción
5	833,5 ± 11,8	100,2
4	841,3 ± 6,8	101,2
3	841,3 ± 6,8	101,2
2	829,5 ± 6,8	99,8
1	657,2 ± 11,8	79,0

a. [HNO₃]=3M; [HCl]=0M; Tiempo de sonicación= 1 min; Temperatura de extracción= 20°C; Caudal de extracción=6,0 mL/min; Volumen de disolución extractante=1mL

b. [Ca] = Media ± desviación estándar (n=3)

Los resultados obtenidos se corroboran si se analiza con profundidad la gráfica de superficie para las variables concentración de La y concentración de HNO₃ obtenida previamente en el diseño de Plackett-Burman para las muestras de frutos secos y que recoge los resultados obtenidos experimentalmente para estas dos variables (Figura 26).

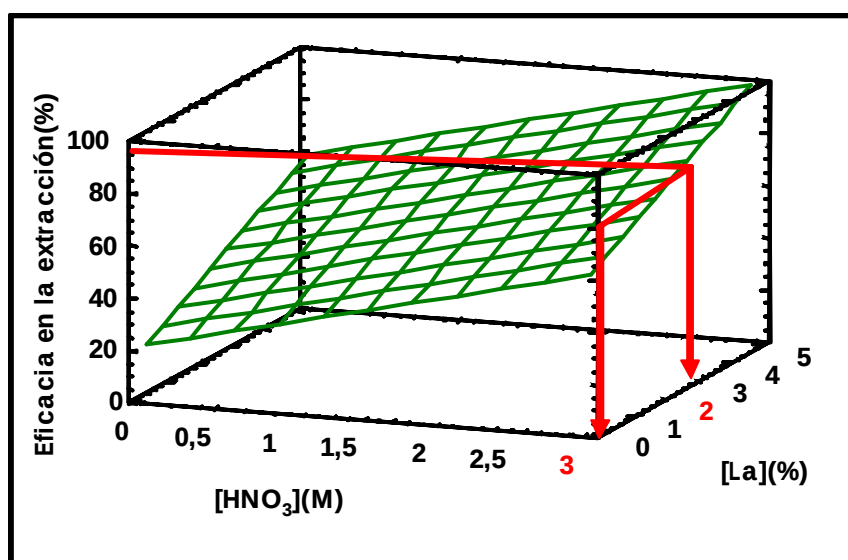


Figura 26. Superficie de respuesta obtenida con el modelo de Plackett-Burman para las variables significativas del proceso ([La] (%) y [HNO₃] (M)) en el análisis de muestras de frutos secos, donde las demás variables toman un el valor medio del intervalo de estudio establecido en el diseño. [HCl]=1,5 M; Tiempo de sonicación=2,75 min; Temperatura de extracción=45°C; Caudal de extracción= 4,75 mL/min; Volumen de disolución extractante=3 mL

Los resultados óptimos para las diferentes variables implicadas en la extracción de calcio en muestras de frutos secos se recogen en la Tabla 47.

Tabla 47. Valores óptimos para cada una de las variables implicadas en el proceso de extracción de las muestras de frutos secos para la determinación de calcio

VARIABLE	VALORES ÓPTIMOS PARA CADA UNA DE LAS VARIABLES
[HNO ₃]	3,0M
[HCl]	0M
Tiempo de sonicación	1,0 min
Temperatura de extracción	20°C
Caudal de extracción	6,0 mL/min
Volumen de disolución extractante	1 mL
[La]	2 %

- Experimentos realizados para la optimización de la extracción de calcio en la muestras de Legumbres

En la extracción del calcio en este tipo de matrices se observa, al igual que en los restantes casos, que el valor óptimo para **volumen de disolución extractante** es de 1 mL, ya que éste es el menor volumen que es suficiente para extraer cuantitativamente el metal (experimentos 1 y 5 de la matriz de Plackett-Burman, Tabla 31). Menores volúmenes no se han podido estudiar, como se ha comentado, debido a las características físicas del sistema.

Los experimentos realizados para optimización del **tiempo de sonicación** y el **caudal de extracción** (Figura 27) indican que el menor tiempo de extracción para el que se obtiene un %eficacia en la extracción cuantitativo es de 1 min (caudal 6 mL/min). Por tanto, son éstos los valores que se han tomado como óptimos para estas variables.

Con respecto a la **temperatura de extracción**, se observa que a temperatura ambiente los resultados son satisfactorios (experimento 1 de la matriz de Plackett-Burman, Tabla 31), y en consecuencia, se elige como valor óptimo para esta variable 20 °C.

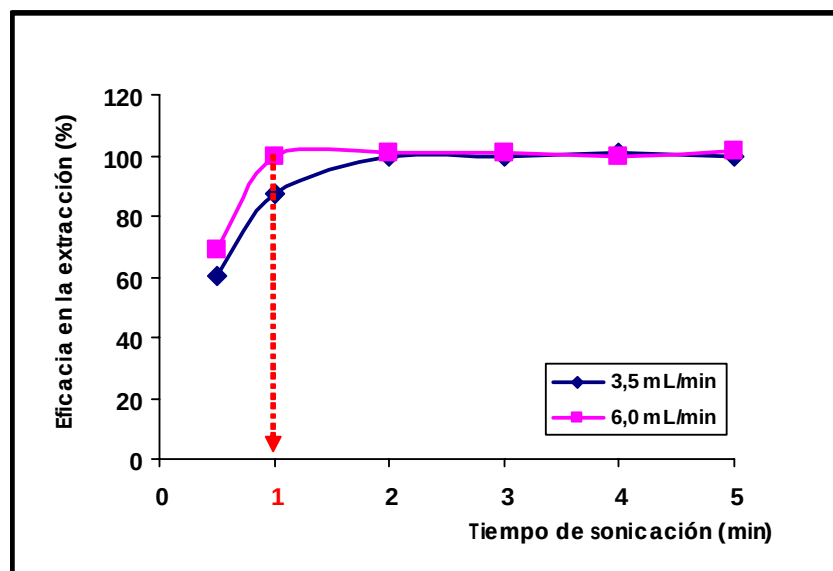


Figura 27. Experimentos realizados para la optimización del tiempo de sonicación a un caudal de extracción de 3,5 mL/min y 6,0 mL/min. $[\text{HNO}_3]=3\text{M}$; $[\text{HCl}]=3\text{M}$; Temperatura de extracción= 20°C ; Volumen de disolución extractante=1mL; $[\text{La}]=5\%$

Se ha estudiado además la posibilidad de disminuir la concentración ácida de la disolución extractante. Para ello se ha comenzado estudiando la posibilidad de eliminar o por lo menos disminuir la **concentración de HCl** (Tabla 48).

Tabla 48. Experimentos realizados para la optimización de la concentración de HCl

$[\text{HCl}] \text{ (M)}^a$	$[\text{Ca}] \mu\text{g/g}^b$	(%)Eficacia en la extracción
3,0	$864,3 \pm 6,8$	100,7
1,5	$860,9 \pm 6,8$	100,3
0,0	$860,9 \pm 6,8$	100,3

a. $[\text{HNO}_3]=3\text{M}$; Tiempo de sonicación=1,0 min; Temperatura de extracción= 20°C ; Caudal de extracción=6,0 mL/min; Volumen de disolución extractante=1mL; $[\text{La}]=5\%$

b. $[\text{Ca}] = \text{Media} \pm \text{desviación estándar (n=3)}$

A la vista de los resultados se concluye que este ácido no es indispensable para extraer cuantitativamente el calcio, con lo que se puede eliminar como componente de la disolución extractante. Por otra parte, y a pesar de ser la variable significativa de mayor efecto estimado, se ha estudiado la posibilidad de disminuir la **concentración de HNO_3** (Tabla 49) y se ha observado que una concentración 1,5M es suficiente para extraer cuantitativamente el metal.

Tabla 49. Experimentos realizados para la optimización de la concentración de HNO_3

[HNO_3] (%) ^a	[Ca] $\mu\text{g/g}$ ^b	(%)Eficacia en la extracción
3,0	860,9 $\pm$ 6,8	100,3
1,5	853,1 $\pm$ 6,8	99,4
0,75	668,9 $\pm$ 11,8	77,9

a. [HCl]=0M; Tiempo de sonicación= 1,0 min; Temperatura de extracción= 20°C; Caudal de extracción=6,0 mL/min; Volumen de disolución extractante=1mL; [La]=5%

b. [Ca] = Media $\pm$ desviación estándar (n=3)

Con respecto a la otra variable significativa, la concentración de lantano, tras haber realizado diferentes experimentos se observa que una concentración de un 2% es suficiente para determinar satisfactoriamente el calcio en este tipo de matrices sin que se produzcan interferencias (Tabla 50).

Tabla 50. Experimentos realizados para la optimización de la concentración de lantano

[La] (%) ^a	[Ca] $\mu\text{g/g}$ ^b	(%)Eficacia en la extracción
5	872,7 $\pm$ 6,8	101,7
4	857,0 $\pm$ 11,8	99,8
3	860,9 $\pm$ 6,8	100,3
2	853,1 $\pm$ 6,8	99,4
1	704,2 $\pm$ 11,8	82,0

a. [HNO_3]=1,5M; [HCl]=0M; Tiempo de sonicación= 1 min; Temperatura de extracción= 20°C; Caudal de extracción=6,0 mL/min; Volumen de disolución extractante=1mL

b. [Ca] = Media $\pm$ desviación estándar (n=3)

Los datos obtenidos experimentalmente se corroboran estudiando con detenimiento la gráfica de superficie para las variables concentración de La y concentración de HNO_3 , obtenida previamente en el diseño de Plackett-Burman, que para este tipo de muestras es idéntica a la obtenida para las muestras de carne (Figura 23).

Los resultados óptimos para las diferentes variables implicadas en la extracción de calcio en muestras de legumbres se indican en la Tabla 51.

Tabla 51. Valores óptimos para cada una de las variables implicadas en el proceso de extracción de las muestras de legumbres para la determinación de calcio

VARIABLE	VALORES ÓPTIMOS PARA CADA UNA DE LAS VARIABLES
[HNO ₃]	1,5M
[HCl]	0M
Tiempo de sonicación	1,0 min
Temperatura de extracción	20°C
Caudal de extracción	6,0 mL/min
Volumen de disolución extractante	1 mL
[La]	2 %

- Experimentos realizados para la optimización de la extracción de calcio en la muestras de Verduras, Hortalizas y Frutas

Para evaluar la variable **volumen de disolución extractante** no se ha realizado ningún experimento adicional pues, teniendo en cuenta el experimento 1 de la matriz de Plackett-Burman (Tabla 31), se puede concluir que 1 mL de disolución extractante es suficiente para extraer cuantitativamente el calcio existente en las muestras.

Para la optimización del **tiempo de sonicación** y el **caudal de extracción** se han realizado diferentes experimentos (Figura 28) en los que se observa que el menor tiempo necesario para obtener una extracción cuantitativa es de 0,5 min a una caudal de 6mL/min, siendo éstos en consecuencia los valores tomados como óptimos para dichas variables.

Con respecto a la **temperatura de extracción**, se observa que a temperatura ambiente los resultados son satisfactorios (experimento 1 y 11 de la matriz de Plackett-Burman, Tabla 31), y en consecuencia, se tomó como valor óptimo para esta variable 20 °C.

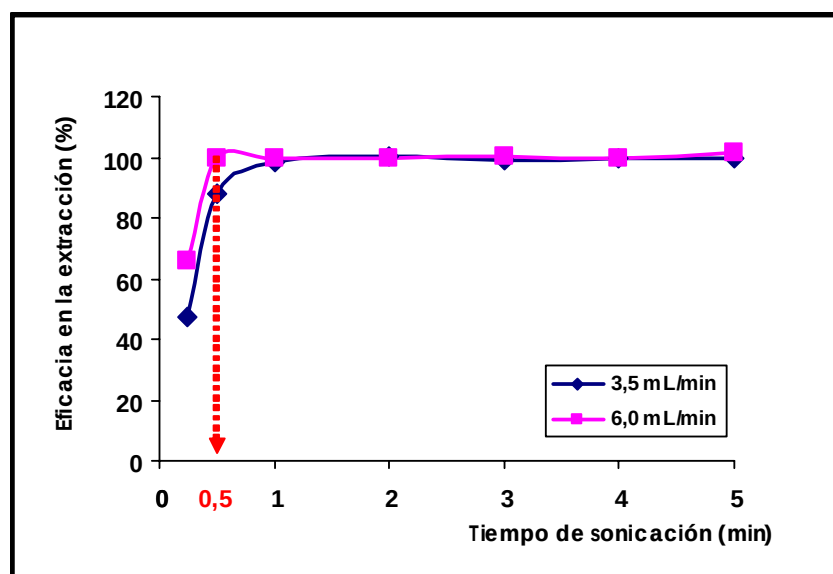


Figura 28. Experimentos realizados para la optimización del tiempo de sonicación a un caudal de extracción de 3,5 mL/min y 6,0 mL/min. $[\text{HNO}_3]=3\text{M}$; $[\text{HCl}]=3\text{M}$; Temperatura de extracción= 20°C ; Volumen de disolución extractante=1mL; $[\text{La}]=5\%$

Se ha estudiado además la posibilidad de disminuir la concentración ácida de la disolución extractante. Así, se ha estudiado en primer lugar la posibilidad de eliminar el HCl de esta disolución, y se demostró que con una **concentración de HCl** 0M se obtiene una extracción cuantitativa (Tabla 52), con lo que este será el valor elegido para la extracción. Por otra parte, se ha estudiado también la posibilidad de disminuir la **concentración de HNO_3** , y se ha comprobado que es necesaria una concentración 3M de este ácido para realizar extracciones cuantitativas (con una $[\text{HNO}_3]=1,5\text{M}$ se obtiene un %eficacia en la extracción de un 66,8%).

Tabla 52. Experimentos realizados para la optimización de la concentración de HCl

[HCl] (M) ^a	[Ca] $\mu\text{g/g}$ ^b	(%)Eficacia en la extracción
3,0	4345,4 $\pm$ 40,5	101,1
1,5	4322,0 $\pm$ 70,1	100,5
0,0	4275,2 $\pm$ 40,5	99,4

a. $[\text{HNO}_3]=3\text{M}$; Tiempo de sonicación=1,0 min; Temperatura de extracción= 20°C ; Caudal de extracción=6,0 mL/min; Volumen de disolución extractante=1mL; $[\text{La}]=5\%$

b. [Ca] = Media $\pm$ desviación estándar (n=3)

Con respecto a la otra variable significativa, la concentración de lantano, tras haber realizado diferentes experimentos se observa que una concentración de La de un 2% es suficiente para determinar satisfactoriamente el calcio en este tipo de matrices sin que se produzcan interferencias (Tabla 53).

Tabla 53. Experimentos realizados para la optimización de la concentración de lantano

[La] (%) ^a	[Ca] µg/g ^b	(%)Eficacia en la extracción
5	4345,4 ± 40,5	101,1
4	4328,0 ± 70,1	100,5
3	4368,7 ± 40,5	101,6
2	4298,6 ± 40,5	100,0
1	3363,4 ± 40,5	78,2

a. [HNO₃]=3 M; [HCl]=0M; Tiempo de sonicación= 1 min; Temperatura de extracción= 20°C; Caudal de extracción=6,0 mL/min; Volumen de disolución extractante=1mL

b. [Ca] = Media ± desviación estándar (n=3)

La gráfica de superficie para las variables concentración de La y concentración de HNO₃ obtenida mediante el diseño de Plackett-Burman para las muestras de verduras, hortalizas y frutas es idéntica a la obtenida para las muestras de carne (Figura 23), y, en ella se ven corroborados los resultados obtenidos experimentalmente para estas dos variables.

Los resultados óptimos para las diferentes variables en la extracción de calcio en muestras de legumbres se muestran en la Tabla 54.

Tabla 54. Valores óptimos para cada una de las variables implicadas en el proceso de extracción de las muestras de verduras, hortalizas y frutas para la determinación de calcio

VARIABLE	VALORES ÓPTIMOS PARA CADA UNA DE LAS VARIABLES
[HNO ₃]	3M
[HCl]	0M
Tiempo de sonicación	0,5 min
Temperatura de extracción	20°C
Caudal de extracción	6,0 mL/min
Volumen de disolución extractante	1 mL
[La]	2 %

En la Tabla 55 se recoge un resumen de los valores óptimos para cada una de las variables implicadas en el proceso de extracción de calcio en los diferentes tipos de muestras de alimentos. En los resultados obtenidos se observa que la concentración de HCl, la temperatura de extracción, el caudal, el volumen de disolución extractante y la concentración de La toman el mismo valor óptimo para todos los tipos de matriz, mientras que el tiempo de sonicación y la concentración de HNO₃ dependen del tipo de muestra.

Así, se observa que para los moluscos y pescados, los frutos secos y las verduras, hortalizas y frutas es necesaria una disolución extractante con una concentración ácida más elevada ([HNO₃]=3M) que en los restantes casos. Para las muestras de carne, cereales y derivados y legumbres, la concentración de la disolución extractante óptima es la mitad que en los casos anteriores ([HNO₃]=1,5M). También se observa que en todos los casos no es necesaria una mezcla de los dos ácidos estudiados, y que es el HNO₃ el ácido que ofrece mejores resultados a más bajas concentraciones.

Tabla 55. Valores óptimos para cada una de las variables implicadas en el proceso de extracción de calcio de los diferentes tipos de muestras alimenticias

Variables	VALORES ÓPTIMOS PARA CADA UNA DE LAS VARIABLES IMPLICADAS EN LA EXTRACCIÓN DE CALCIO EN LOS DIFERENTES TIPOS DE MUESTRAS ALIMENTICIAS					
	Moluscos y pescados	Carnes	Cereales y derivados	Frutos secos	Legumbres	Verduras, Hortalizas y frutas
A (M)	3	1,5	1,5	3,0	1,5	3
B (M)	0	0	0	0	0	0
C (min)	0,5	0,5	1,0	1,0	1,0	0,5
D (°C)	20	2	20	20	20	20
E (mL/min)	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
F (mL)	1	1	1	1	1	1
G (%)	2	2	2	2	2	2

A, [HNO₃]; B, [HCl]; C, Tiempo sonicación; D, Temperatura de extracción; E, Caudal de extracción; F, Volumen de disolución extractante; G, [La].

Desde el punto de vista del tiempo de sonicación, se observa que las muestras necesitan un mayor tiempo para que se produzca la extracción del calcio son los cereales y derivados, los frutos secos y las legumbres (necesitan 1 min de tiempo de sonicación a un caudal de 6 mL/min para obtener eficacias

de extracción cuantitativas). En los restantes casos son necesarios sólo 0,5 min al mismo caudal para obtener resultados satisfactorios.

Con respecto a la temperatura, al volumen de disolución extractante y la concentración de lantano se observa que para todos los tipos de muestras se lleva a cabo la extracción óptima a temperatura ambiente, utilizando 1 mL de disolución extractante y una concentración de La de un 2%.

4.1.1.1 Estudio de la cantidad de muestra

En la optimización de las distintas variables que afectan al proceso de extracción se han utilizado las cantidades de muestra indicadas en la Tabla 30, pero también se ha investigado la posibilidad de analizar cantidades de muestra mayores. El objetivo de este estudio es poder utilizar este sistema continuo para muestras con una concentración menor de calcio, y mejorar así la sensibilidad del método analítico. Por tanto, se estudió la posibilidad de aumentar la cantidad de muestra hasta 0,0300 g, ya que utilizando mayores cantidades de la misma tienen lugar presiones elevadas en el sistema FIA que hacen inviables los análisis.

Para las muestras de moluscos y pescados, el estudio de la optimización se ha realizado con 0,0100 g de muestra y se ha demostrado experimentalmente que se puede utilizar como máximo una cantidad de muestra de 0,0150g (%eficacia en la extracción del 100,3%) manteniendo los valores óptimos obtenidos inicialmente. No se han propuesto mayores cantidades de muestra, ya que habría que aplicar una dilución mayor, pues las señales de absorbancia estarían fuera del intervalo lineal para este metal.

En el caso de las muestras de carne, verduras, hortalizas y frutas se observa que no se puede utilizar una mayor cantidad de muestra que las utilizadas en el proceso de optimización, debido a que las concentraciones de calcio presentes son bastante elevadas, y un aumento de dicha cantidad implicaría aplicar una dilución mayor para que las señales estuvieran dentro del intervalo lineal de detección del Ca.

Con respecto a las muestras de cereales y derivados, frutos secos y legumbres, se ha observado que se puede utilizar mayor cantidad de muestra

sin aumentar la dilución, pero el procedimiento óptimo es diferente al obtenido previamente en función de las cantidades de muestra utilizadas.

En el caso de las muestras de cereales, se ha observado que se puede utilizar hasta 0,0300 g de muestra, pero se necesita aumentar la concentración de HNO_3 a 3M y el tiempo de sonicación también aumenta, ya que se necesitarían 2 min para 0,0200 g y 3 min para 0,0300 g de muestra, respectivamente.

En el análisis de los frutos secos y las legumbres se puede utilizar una cantidad de muestra máxima de 0,0200 g, ya que para 0,0300 g es necesario aplicar una mayor dilución. Para analizar 0,0200 g de muestra de frutos secos, se necesita un tiempo de extracción de 3 min, pero se mantiene la disolución extractante óptima utilizada para 0,0100 g de muestra ($[\text{HNO}_3] = 3\text{M}$). Sin embargo, en el análisis de 0,0200 g de muestras de legumbres se necesita aumentar la concentración de HNO_3 a 3M y el tiempo de extracción a 2 minutos para obtener un %eficacia en la extracción cuantitativa.

4.1.1.2 Estudio de la influencia del tamaño de partícula de la muestra

Todos los estudios que se han descrito se realizaron utilizando un diámetro de partícula de la muestra menor de 30 μm . Con el objetivo de estudiar si esta variable influye en el proceso de extracción del calcio en las muestras se utilizaron diferentes porciones de la misma muestra con diferentes tamaños de partícula. Los diámetros de partícula estudiados fueron dos:

- diámetros menores de 30 μm
- diámetros comprendidos entre 30-100 μm

Para llevar a cabo este estudio se han analizado las muestras utilizadas en la optimización, excepto en los casos de los cereales y derivados, verduras, hortalizas y frutas. Esto es debido a que en la optimización de estos dos tipos de muestras se han utilizado una muestra de harina y un material de referencia de té (NCS DC 73351) respectivamente, muestras donde es imposible realizar estudios de tamaño de partícula, ya que éste es uniforme. En su lugar se han utilizado una muestra de galletas (para estudiar las muestras de cereales,

[Ca]=443,7 $\pm$ 6,9 $\mu\text{g/g}$) y una muestra de lechuga (para estudiar las muestras de verduras, hortalizas y frutas, [Ca]=9130,7 $\pm$ 103,1 $\mu\text{g/g}$).

Con las porciones de diferente diámetro de cada muestra se ha realizado por una parte el análisis siguiendo el método de referencia descrito previamente (pág. 86) y por otra el análisis continuo de las mismas utilizando las metodologías propuestas, y se compararon los resultados obtenidos. Los %eficacia en la extracción obtenidos se indican en la Tabla 56. De estos resultados se deduce que el tamaño de partícula no influye en la determinación de calcio con el sistema propuesto. Esto simplifica mucho el análisis, ya que no hay que someter la muestra a ningún tratamiento previo que garantice un cierto tamaño de partícula.

Tabla 56. Experimentos realizados en porciones de muestras con diferente tamaño de partícula para todos los tipos de muestras estudiados utilizando el método de referencia y las metodologías continuas propuestas. Se indica además la eficacia en la extracción del sistema FIA

Tipo de muestra	Tamaño de partícula	[Ca] obtenida mediante el método de referencia ($\mu\text{g/g}$)	[Ca]obtenida mediante los métodos continuos propuestos ($\mu\text{g/g}$)	(%)Eficacia en la extracción
Moluscos y pescados	<30 μm	3414,3 $\pm$ 39,0	3426,1 $\pm$ 34,1	100,3
	30-100 μm	3391,9 $\pm$ 39,0	3386,7 $\pm$ 34,1	99,8
Carnes	<30 μm	1121,4 $\pm$ 13,8	1131,3 $\pm$ 6,8	100,9
	30-100 μm	1103,4 $\pm$ 13,8	1131,3 $\pm$ 6,8	102,5
Cereales y derivados	<30 μm	443,7 $\pm$ 6,9	441,1 $\pm$ 2,3	99,4
	30-100 μm	442,2 $\pm$ 6,9	443,7 $\pm$ 2,3	100,3
Frutos secos	<30 μm	831,4 $\pm$ 20,6	833,5 $\pm$ 11,8	100,2
	30-100 μm	826,9 $\pm$ 20,6	829,9 $\pm$ 18,0	100,3
Legumbres	<30 μm	858,4 $\pm$ 20,6	857,0 $\pm$ 11,8	99,8
	30-100 μm	853,9 $\pm$ 20,6	860,9 $\pm$ 6,8	100,3
Verduras, hortalizas y frutas	<30 μm	9130 $\pm$ 103	9161 $\pm$ 70	100,3
	30-100 μm	9175 $\pm$ 135	9185 $\pm$ 107	100,1

4.1.2 Extracción de cinc

La optimización se ha realizado aplicando el diseño factorial de Plackett-Burman $2^6 \cdot 3/16$ de resolución tipo IV con 6 grados de libertad y un punto central, cuya matriz de experimentos se recoge en la Tabla 27. Se ha aplicado este diseño porque en este caso las variables que afectan al proceso de extracción son seis. Las variables que afectan a la extracción de cinc, así como los valores máximos y mínimos, seleccionados en función de estudios previos, se reflejan en la Tabla 57.

Tabla 57. Valores máximos y mínimos establecidos para cada variable en el diseño de Plackett-Burman

VARIABLE	NOTACIÓN	VALOR MÍNIMO	VALOR MÁXIMO
[HNO ₃]	A	0 M	3M
[HCl]	B	0 M	3 M
Tiempo de sonicación	C	0,5 min	5 min
Temperatura de extracción	D	20 °C	70 °C
Caudal de extracción	E	3,5 mL/min	6 mL/min
Volumen de disolución extractante	F	1,0 mL	3 mL

Una vez obtenida esta matriz, se realizaron los experimentos fijados por la misma. Para realizar estos experimentos sobre las diferentes matrices, se han utilizado materiales de referencia, en los casos en los que se certificaba la concentración de cinc y, en los otros casos, se han utilizado muestras en las previamente se había determinado su concentración de cinc por triplicado utilizando el método de referencia indicado en la página 86 (Tabla 58). La cantidad de material de referencia o muestra utilizada para optimizar el proceso se ha fijado en función de la concentración de cinc presente en las muestras.

Tabla 58. Muestras y materiales de referencia utilizados en la optimización del proceso continuo de extracción ácida, concentración de cinc presente en dichas muestras y cantidad utilizada en la optimización

Tipo de matriz	Muestra con la que se realiza la optimización	[Zn]($\mu\text{g/g}$)	Cantidad de muestra (g, peso seco)
Moluscos y pescados	NRCC-Tort 1 ^a	177 ± 10	0,0050
Carnes	Músculo de bovino BCR-184 ^b	$166,0 \pm 3,0$	0,0050
Cereales y derivados	Harina integral BCR-189 ^b	$56,5 \pm 1,7$	0,0100
Frutos secos	Avellanas	$55,9 \pm 0,7$	0,0100
Legumbres	Habas	$35,1 \pm 0,9$	0,0100
Verduras, hortalizas y frutas	Te NCS ^c DC 73351	$26,1 \pm 0,9$	0,0100

a.NRCC: Nacional Research Council of Canada

b.BCR: Community Bureau of Reference

c. NCS:China National Analysis Center for Iron and Steel

La matriz del diseño de Plackett-Burman con los valores que toma cada variable en cada experimento y el %eficacia en la extracción obtenido en cada caso se recoge en la Tabla 59. Los experimentos se han realizado por duplicado, por lo que la eficacia de la extracción indicada es la media obtenida de los dos experimentos.

Una vez realizados los experimentos, se procede al análisis de los datos. Para conocer que variables son significativas se recurre a las **Cartas Pareto estandarizadas** para cada tipo de muestra (Figura 29).

Tabla 59. Matriz del diseño de Plackett-Burman con los valores de cada variable en cada experimento, con el %eficacia en la extracción de cinc obtenidas en cada uno de ellos para cada tipo de muestra

						% Eficacia en la extracción					
A	B	C	D	E	F	Moluscos y pescados	Carnes	Cereales y derivados	Frutos secos	Legumbres	Verduras, hortalizas y frutas
3	0	5	20	3,5	1	99,1	100,4	100,2	100,5	99,9	100,8
3	3	0,5	70	3,5	1	98,0	101,0	101,0	99,6	101,2	99,0
0	3	5	20	6	1	99,6	99,9	100,2	98,8	99,9	97,2
3	0	5	70	3,5	3	99,6	95,8	100,2	98,7	99,8	100,7
3	3	0,5	70	6	1	100,7	101,0	100,2	100,5	99,9	99,0
3	3	5	20	6	3	102,8	97,5	97,6	98,7	99,8	100,7
1,5	1,5	2,75	45	4,75	1,5	99,9	100,7	100,6	100,0	99,2	103,5
0	3	5	70	3,5	3	98,0	94,1	97,6	96,2	95,7	100,7
0	0	5	70	6	1	20,2	3,7	2,9	0,0	4,7	59,0
0	0	0,5	70	6	3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	29,8
3	0	0,5	20	6	3	102,8	94,1	100,2	98,7	99,8	100,7
0	3	0,5	20	3,5	3	99,6	94,1	100,2	96,2	99,8	95,3
0	0	0,5	20	3,5	1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	6,3

A, [HNO₃]; B, [HCl]; C, Tiempo sonicación; D, Temperatura de extracción; E, Caudal de extracción; F, Volumen de disolución extractante.

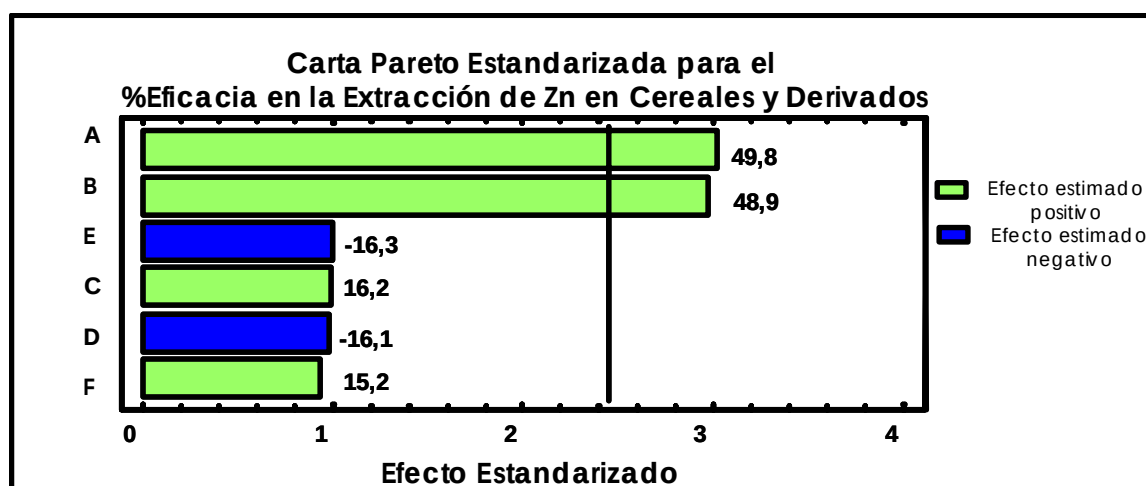
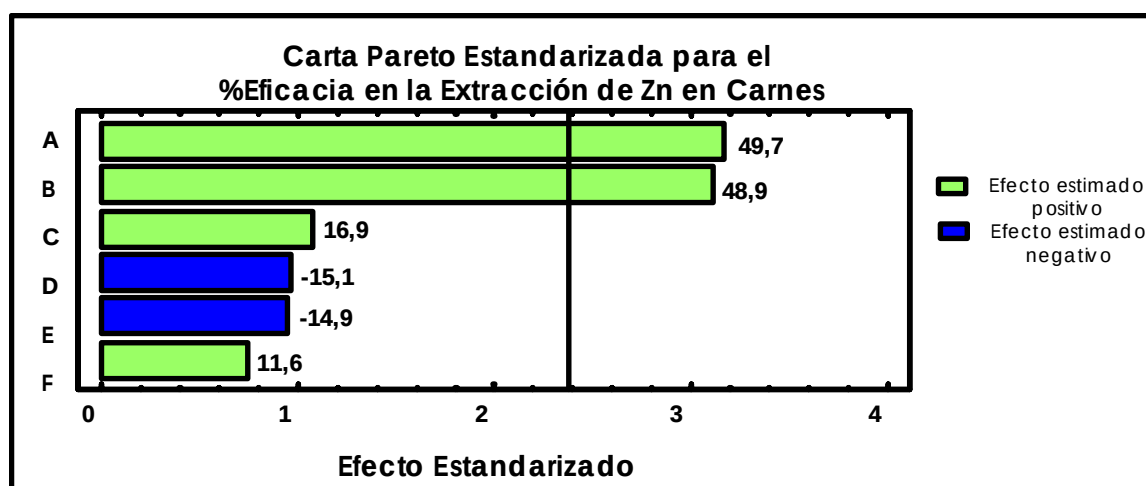
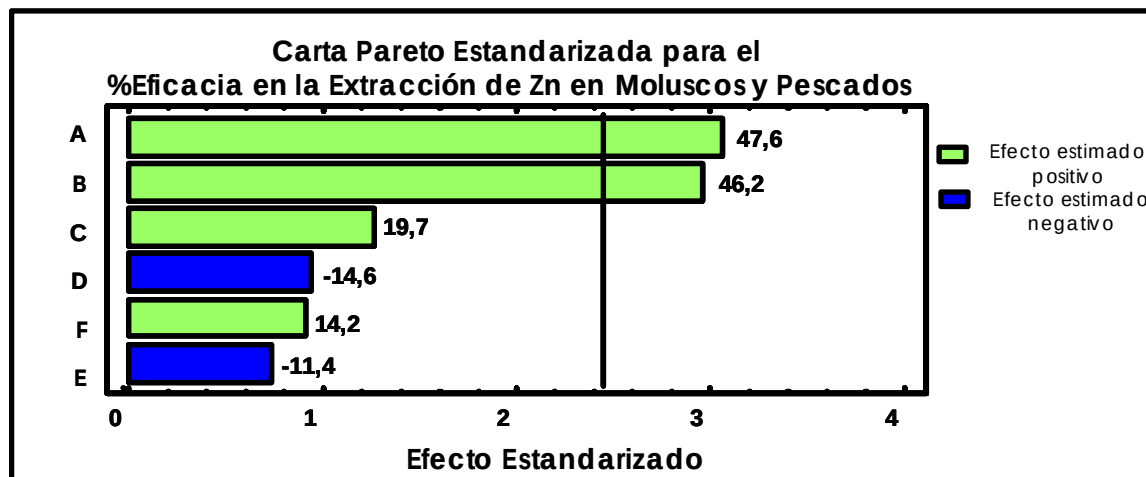


Figura 29. Carta Pareto estandarizada de los efectos principales estandarizados en el diseño factorial; la flecha vertical indica el límite de significación estadística para los efectos. A, $[\text{HNO}_3]$; B, $[\text{HCl}]$; C, Tiempo sonicación; D, Temperatura de extracción; E, Caudal de extracción; F, Volumen de disolución extractante.

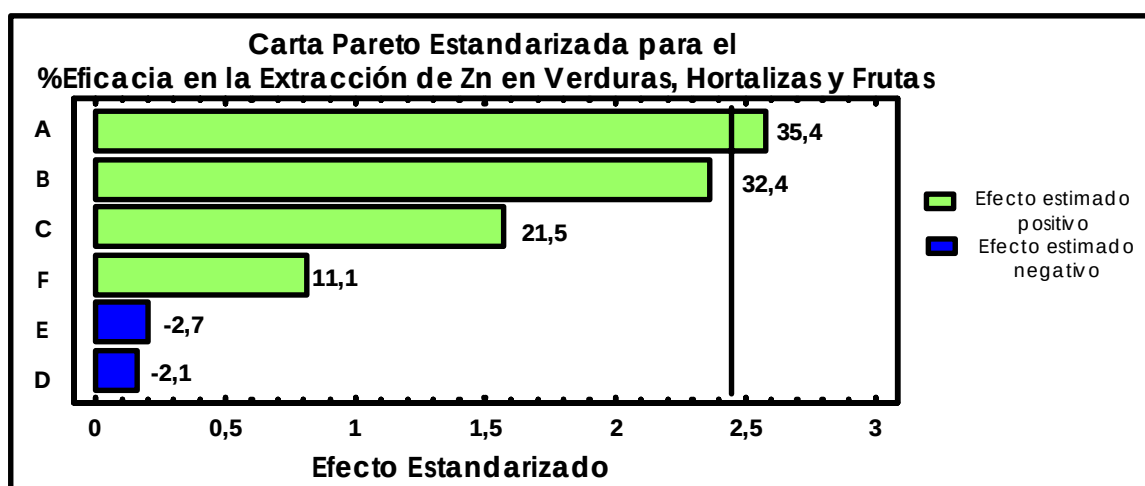
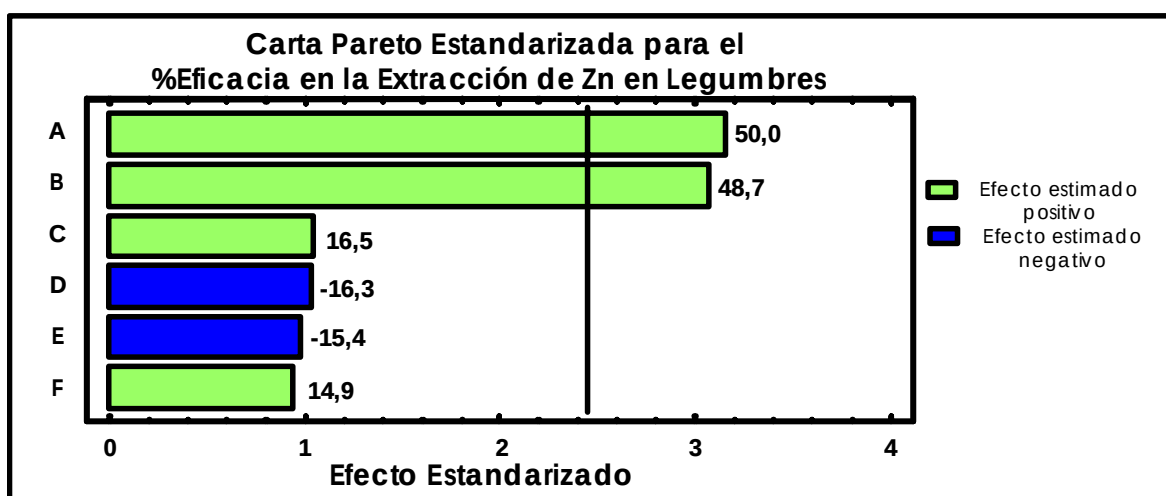
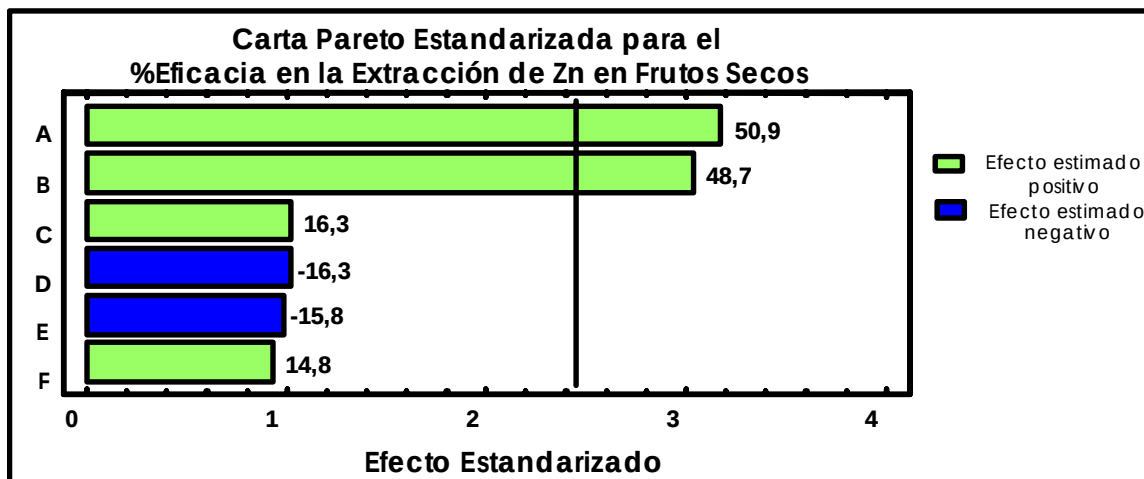


Figura 29 (continuación). Carta Pareto estandarizada de los efectos principales estandarizados en el diseño factorial; la flecha vertical indica el límite de significación estadística para los efectos. A, $[\text{HNO}_3]$; B, $[\text{HCl}]$; C, Tiempo sonicación; D, Temperatura de extracción; E, Caudal de extracción; F, Volumen de disolución extractante.

- **Análisis de los resultados obtenidos con el diseño factorial**

En los resultados obtenidos al aplicar el diseño de Plackett-Burman a la extracción de cinc en los diferentes tipos de muestras, se observa que para todas ellas, las variables estadísticamente significativas para el proceso son las concentraciones de los ácidos que constituyen la disolución extractante (el ácido nítrico y el ácido clorhídrico). Estas variables presentan una gran influencia positiva en el proceso de extracción entre los valores estudiados, tal y como se puede observar en las correspondientes superficies de respuesta proporcionadas por el diseño aplicado (Figura 30).

Las demás variables tienen una mayor o menor influencia sobre la extracción en el intervalo estudiado, pero no superan el nivel de significación establecido por el método para un 95% de confianza (representado por la línea vertical). Dentro de estas variables no significativas, se observa un comportamiento bastante regular para las diferentes matrices. La temperatura y el caudal de extracción son variables no significativas de efecto estimado negativo, y por otra parte, el tiempo de extracción y el volumen de disolución extractante tienen un efecto positivo.

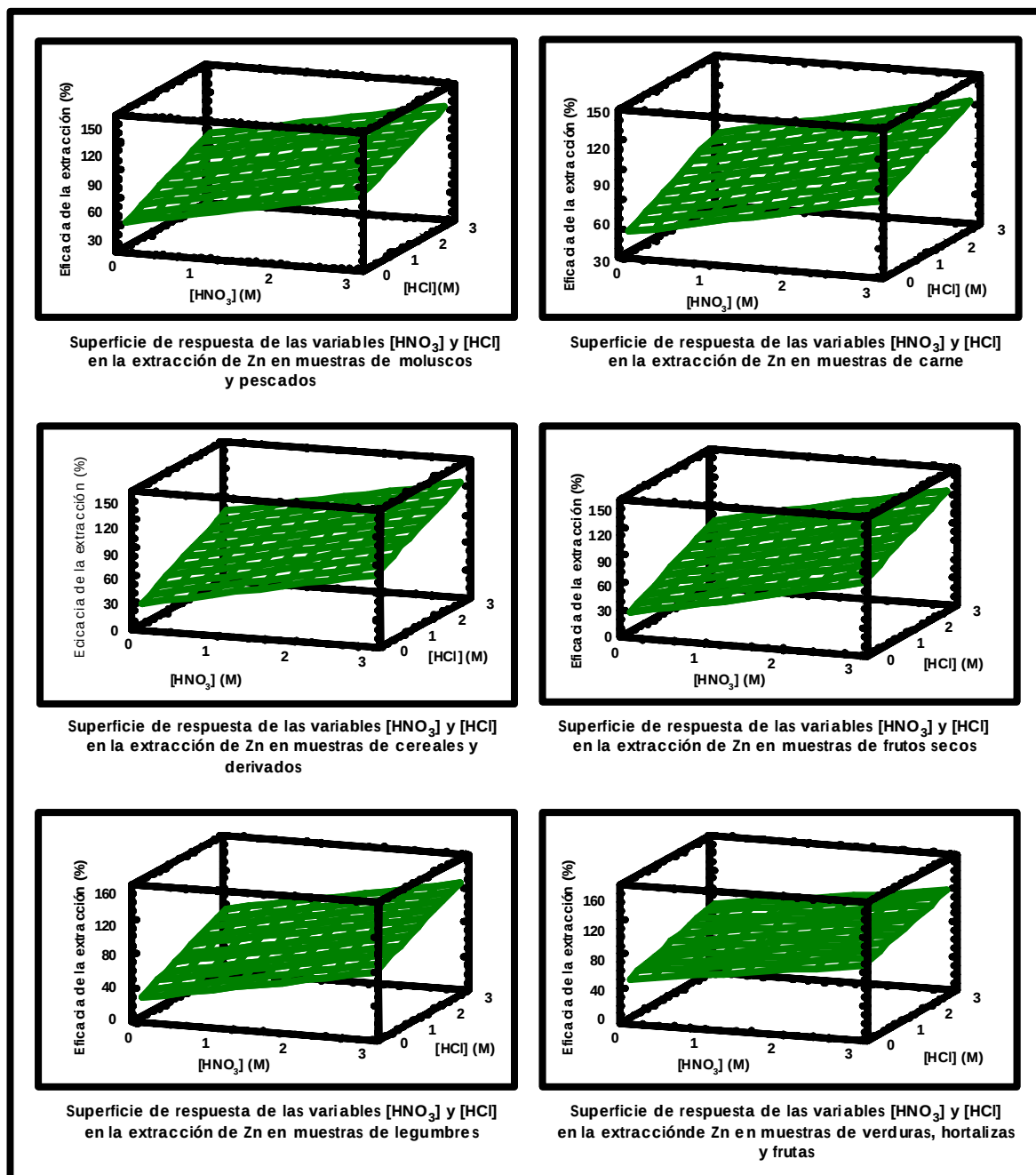


Figura 30. Superficies de respuesta proporcionadas por el diseño de Plackett-Burman para las variables $[\text{HNO}_3]$ y $[\text{HCl}]$ en la determinación de cinc en todos los tipos de muestra estudiados ((las demás variables toman el valor medio del intervalo de estudio establecido en el diseño)

Una vez analizados los resultados obtenidos al aplicar el diseño de Plackett-Burman, los valores óptimos según el diseño de Screening para cada una de las variables son los que aparecen en la Tabla 60.

Tabla 60. Valores óptimos según el diseño de Plackett-Burman para cada una de las variables implicadas en el proceso de extracción de cinc de los diferentes tipos de muestras

Variables	VALORES ÓPTIMOS PARA CADA UNA DE LAS VARIABLES SEGÚN EL DISEÑO DE PLACKETT-BURMAN					
	Moluscos y pescados	Carnes	Cereales y derivados	Frutos secos	Legumbres	Verduras, hortalizas y frutas
A (M)	3	3	3	3	3	3
B (M)	3	3	3	3	3	3
C (min)	5	5	5	5	5	5
D (°C)	20	20	20	20	20	20
E (mL/min)	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
F (mL)	3	3	3	3	3	3

A, [HNO₃]; B, [HCl]; C, Tiempo sonicación; D, Temperatura de extracción; E, Caudal de extracción; F, Volumen de disolución extractante

Como el diseño de Plackett-Burman proporciona las tendencias de cada una de las variables hacia el óptimo, y no el valor óptimo en sí mismo, se realizaron una serie de experimentos fuera del marco del diseño, de acuerdo con los resultados obtenidos por el mismo, para determinar los valores óptimos de cada una de las variables que afectan a la extracción de cinc en los diferentes tipos de muestras objeto de estudio.

- **Experimentos realizados fuera del marco del diseño**
- **Experimentos realizados para la optimización de la extracción de cinc en las muestras de Moluscos y Pescados**

Se estudiaron primero aquellas variables que resultaron estadísticamente no significativas en la extracción del cinc. Dentro estas variables no significativas con efecto positivo se encuentran el tiempo de sonicación (efecto estimado= 19,7) y el volumen de disolución extractante (efecto estimado= 14,2). En lo que respecta al **volumen de disolución extractante**, se ha estudiado la posibilidad de disminuir al máximo este volumen (el mínimo volumen que se puede utilizar es 1mL por las características físicas del sistema) para diluir menos el extracto y obtener una mayor sensibilidad. De esta manera, se obtuvieron eficacias en la extracción cuantitativas utilizando un volumen de disolución de 1 mL

(experimentos 1, 2, 3 y 5 de la matriz de Plackett-Burman, Tabla 59), por lo que éste será el valor considerado como óptimo para esta variable en la extracción de cinc.

El **tiempo de sonicación** es la otra variable no significativa con efecto positivo en la extracción. Esta variable se ha optimizado con el **caudal de extracción** debido a la relación existente entre estas dos variables (Figura 31).

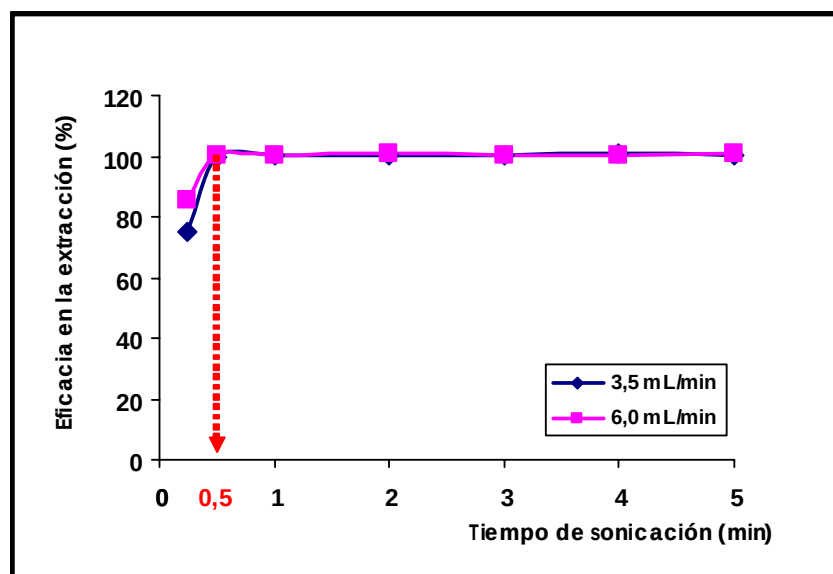


Figura 31. Experimentos realizados para la optimización del tiempo de sonicación a un caudal de extracción de 3,5 mL/min y 6,0 mL/min. $[\text{HNO}_3]=3\text{M}$; $[\text{HCl}]=3\text{M}$; Temperatura de extracción= 20°C ; Volumen de disolución extractante=1mL

A la vista de los resultados, se observa que el menor tiempo de extracción necesario para obtener eficacias en la extracción cuantitativas es 0,5 min, bien sea a un caudal de 3,5 mL/min o de 6 mL/min. Así, el valor óptimo para la variable tiempo de extracción se ha establecido en 0,5 min, y sin embargo, para la variable caudal se pueden considerar ambos valores como óptimos.

La **temperatura de extracción** es una variable no significativa y tiene un efecto estimado negativo. Teniendo en cuenta el valor de este efecto estimado y las eficacias en la extracción cuantitativas obtenidas en la matriz de Plackett-Burman a temperatura ambiente (experimentos 1, 3, 6, 11 y 12, Tabla 59), se ha fijado el óptimo para esta variable en 20°C .

En lo que respecta a los componentes de la disolución extractante se observa que las **concentraciones de ambos ácidos** tienen efectos estimados

bastante elevados y similares. Como el objetivo es disminuir al máximo la concentración ácida necesaria consiguiendo eficacias en la extracción cuantitativas, se ha estudiado la posibilidad de eliminar uno de los componentes de la disolución ácida y, a su vez, de disminuir al máximo esta concentración (Tablas 61 y 62).

Tabla 61. Experimentos realizados para la optimización de la concentración de HNO_3

$[\text{HNO}_3]$ (M) ^a	$[\text{Zn}]$ $\mu\text{g/g}^b$	(%) Eficacia en la extracción
3,0	$177,6 \pm 0,6$	100,3
1,5	$177,9 \pm 0,6$	100,5
0,75	$176,9 \pm 0,6$	100,0
0,4	$176,6 \pm 0,6$	99,8
0,2	$176,0 \pm 0,6$	99,4
0,1	$133,3 \pm 1,0$	75,3

a. $[\text{HCl}]=0\text{M}$; Tiempo de sonicación=0,5 min; Temperatura de extracción= 20°C; Caudal de extracción=6,0 mL/min; Volumen de disolución extractante=1mL

b. $[\text{Zn}]$ = Media $\pm$ desviación estándar (n=3)

Tabla 62. Experimentos realizados para la optimización de la concentración de HCl

$[\text{HCl}]$ (M) ^a	$[\text{Zn}]$ $\mu\text{g/g}^b$	(%) Eficacia en la extracción
3,0	$176,6 \pm 0,6$	99,8
1,5	$176,3 \pm 1,0$	99,6
0,75	$175,7 \pm 0,6$	99,2
0,4	$167,7 \pm 1,0$	94,7
0,2	$157,2 \pm 1,0$	88,8

a. $[\text{HNO}_3]=0\text{M}$; Tiempo de sonicación=0,5 min; Temperatura de extracción= 20°C; Caudal de extracción=6,0 mL/min; Volumen de disolución extractante=1mL

b. $[\text{Zn}]$ = Media $\pm$ desviación estándar (n=3)

De los resultados obtenidos se concluye que no es necesaria la presencia de ambos ácidos en la disolución extractante. Además, se observa que el HNO_3 extrae mejor el Zn de las muestras de moluscos y pescados, ya que con sólo una concentración 0,2 M se obtienen % eficacia en la extracción cuantitativos. El HCl ofrece también buenos resultados hasta una concentración de 0,75M. Si se utilizan menores concentraciones de HCl no se obtienen eficacias en la extracción cuantitativas. Como el objetivo es utilizar concentraciones bajas de ácidos, se tomó como valor óptimo una concentración de HNO_3 de 0,2 M.

Los valores óptimos para cada variable en la extracción de cinc en las muestras de moluscos y pescados se indican en la Tabla 63.

Tabla 63. Valores óptimos para cada una de las variables implicadas en el proceso de extracción de cinc de las muestras de moluscos y pescados

VARIABLE	VALORES ÓPTIMOS PARA CADA UNA DE LAS VARIABLES
[HNO ₃]	0,2 M
[HCl]	0 M
Tiempo de sonicación	0,5 min
Temperatura de extracción	20 °C
Caudal de extracción	3,5 ó 6,0 mL/min
Volumen de disolución extractante	1mL

- Experimentos realizados para la optimización de la extracción de cinc en muestras de Carne

En la extracción de cinc en muestras de carne las variables significativas son las concentraciones de los ácidos que forman la disolución extractante.

Los estudios fuera del marco el diseño se comenzaron por aquellas variables que presentaban menor influencia en la extracción. El **volumen de disolución extractante** es la variable de menor efecto estimado. Se ha demostrado que un de 1 mL de disolución es suficiente para extraer cuantitativamente el cinc de este tipo de muestras (experimentos 1, 2, 3 y 5 de la matriz de Plackett-Burman, Tabla 59) con lo que este será el valor óptimo tomado para esta variable.

El **tiempo de sonicación** es la otra variable no significativa con efecto positivo en la extracción. Esta variable se ha optimizado con el **caudal de extracción** debido a la relación existente entre estas variables (Figura 32).

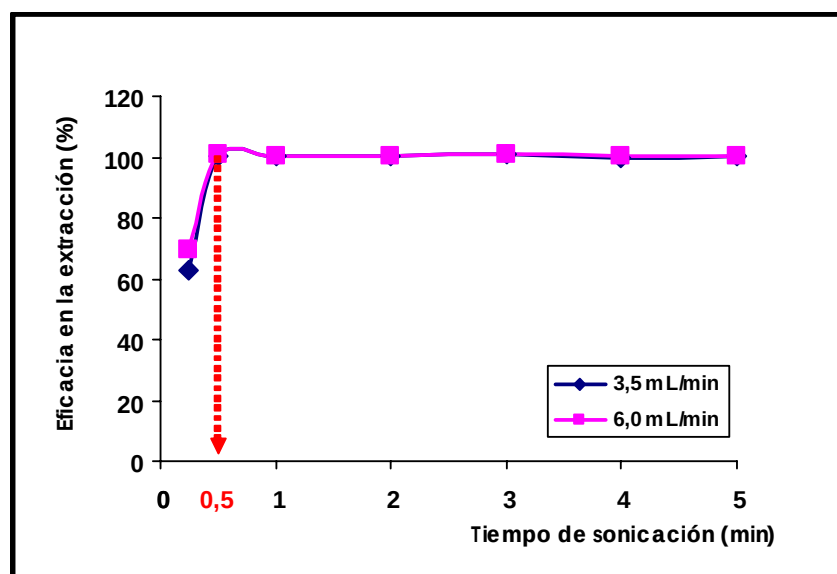


Figura 32. Experimentos realizados para la optimización del tiempo de sonicación a un caudal de extracción de 3,5 mL/min y 6,0 mL/min. $[\text{HNO}_3]=3\text{M}$; $[\text{HCl}]=3\text{M}$; Temperatura de extracción= 20°C ; Volumen de disolución extractante=1mL

A la vista de los resultados se observa que el menor tiempo de extracción necesario para obtener eficacias en la extracción cuantitativas es 0,5 min para ambos caudales. Así, el valor óptimo para esta variable es de 0,5 min. El valor óptimo para el caudal de extracción puede ser tanto 3,5 como 6,0 mL/min, ya que a ambos caudales se obtienen eficacias en la extracción cuantitativas.

En el caso de la **temperatura de extracción** se ha observado que a temperatura ambiente (20°C) se obtienen eficacias en la extracción cuantitativas (experimentos 1 y 3 de la matriz de Plackett-Burman, Tabla 59), con lo que el valor considerado como óptimo para esta variable es de 20°C .

En lo que respecta a las variables estadísticamente significativas, las **concentraciones de los ácidos de la disolución extractante**, éstas tienen efectos estimados bastante elevados y similares, por lo que, como se observa en la superficie de respuesta correspondiente, cuanto mayores sean los valores, dentro del intervalo establecido en el diseño, mayor es el %eficacia en la extracción obtenido (Figura 30). Como el objetivo es disminuir al máximo esta concentración se ha estudiado la posibilidad de eliminar uno de los componentes de la disolución ácida y/o disminuir al máximo la concentración de los mismos (Tablas 64 y 65). En los resultados obtenidos se comprueba que una disolución 0,75 M bien de HNO_3 o de HCl es suficiente para obtener

%eficacia en la extracción cuantitativos, y que no son necesarios ambos ácidos en la disolución extractante. En los posteriores estudios de la extracción de cinc en muestras de carne se utilizó una disolución de HNO_3 0,75M, simplemente por tomar uno de los valores óptimos, pero no porque se obtengan mejores resultados.

Tabla 64. Experimentos realizados para la optimización de la concentración de HNO_3

$[\text{HNO}_3]$ (M) ^a	$[\text{Zn}]$ $\mu\text{g/g}^b$	(%) Eficacia en la extracción
3,0	$166,4 \pm 0,6$	100,3
1,5	$167,1 \pm 0,6$	100,6
0,75	$166,1 \pm 0,6$	100,1
0,4	$128,5 \pm 0,0$	77,4

a. $[\text{HCl}]=0\text{M}$; Tiempo de sonicación=0,5 min; Temperatura de extracción= 20°C; Caudal de extracción=6,0 mL/min; Volumen de disolución extractante=1mL

b. $[\text{Zn}]$ = Media $\pm$ desviación estándar (n=3)

Tabla 65. Experimentos realizados para la optimización de la concentración de HCl

$[\text{HCl}]$ (M) ^a	$[\text{Zn}]$ $\mu\text{g/g}^b$	(%) Eficacia en la extracción
3,0	$167,4 \pm 0,6$	100,8
1,5	$165,8 \pm 1,0$	99,9
0,75	$166,1 \pm 0,6$	100,1
0,4	$124,1 \pm 0,6$	74,7

a. $[\text{HNO}_3]=0\text{M}$; Tiempo de sonicación=0,5 min; Temperatura de extracción= 20°C; Caudal de extracción=6,0 mL/min; Volumen de disolución extractante=1mL

b. $[\text{Zn}]$ = Media $\pm$ desviación estándar (n=3)

Los valores óptimos para cada variable en la extracción de cinc en las muestras de carne se muestran en la Tabla 66.

Tabla 66. Valores óptimos para cada una de las variables implicadas en el proceso de extracción de cinc de las muestras de carne

VARIABLE	VALORES ÓPTIMOS PARA CADA UNA DE LAS VARIABLES
$[\text{HNO}_3]$	0,75 M / 0M
$[\text{HCl}]$	0 M / 0,75M
Tiempo de sonicación	0,5 min
Temperatura de extracción	20 °C
Caudal de extracción	3,5 ó 6,0 mL/min
Volumen de disolución extractante	1mL

- Experimentos realizados para la optimización de la extracción de cinc en las muestras de Cereales y Derivados

En lo que respecta a las variables **volumen de disolución extractante** y **temperatura de extracción** (ambas variables no significativas) se observa en la matriz del diseño (experimentos 1 y 3, Tabla 59) que tomando sus valores más bajos establecidos dentro del intervalo estudiado, 1mL y 20°C, respectivamente, las eficacias en la extracción obtenidas son cuantitativas, por lo que éstos serán los valores óptimos considerados para estas variables.

En el estudio del **tiempo de sonicación** y del **caudal de extracción** (Figura 33) se observa que el menor tiempo de sonicación necesario para una extracción cuantitativa es de 0,5 min a un caudal de 6 mL/min. Como son estos valores los que proporcionan la mejor frecuencia de muestreo, éstos fueron los valores considerados como óptimos para estas dos variables.

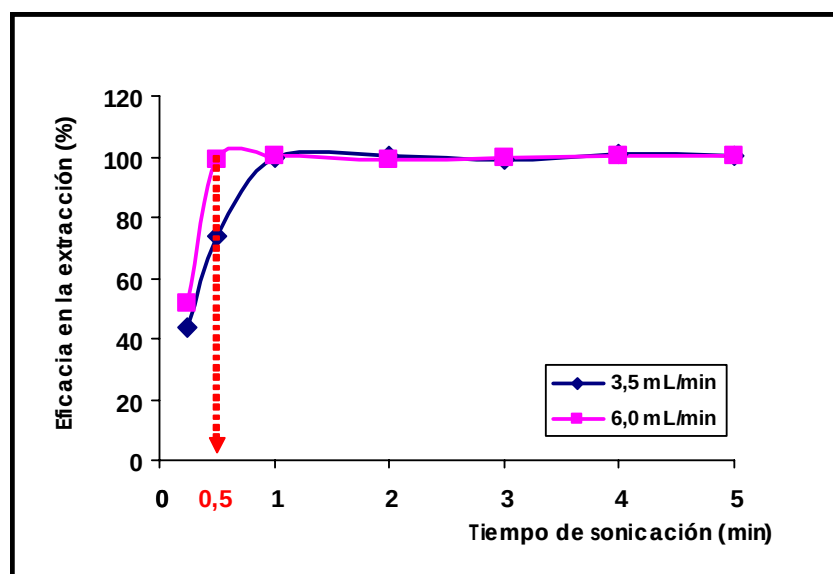


Figura 33. Experimentos realizados para la optimización del tiempo de sonicación a un caudal de extracción de 3,5 mL/min y 6,0 mL/min. $[\text{HNO}_3]=3\text{M}$; $[\text{HCl}]=3\text{M}$; Temperatura de extracción= 20°C; Volumen de disolución extractante=1mL

Se ha estudiado también la posibilidad de eliminar de la disolución extractante alguno de los ácidos constituyentes y de disminuir al máximo las **concentraciones de estos ácidos**. En los estudios realizados (Tablas 67 y 68) se ha observado que una disolución 0,2 M de HNO_3 o de HCl es suficiente para

extraer cuantitativamente el cinc de las muestras de cereales. Ambas son disoluciones extractantes óptimas para esta extracción, pero arbitrariamente se ha tomado una concentración de HNO_3 0,2 M para continuar realizando los estudios con esta matriz.

Tabla 67. Experimentos realizados para la optimización de la concentración de HNO_3

$[\text{HNO}_3]$ (M) ^a	$[\text{Zn}]$ $\mu\text{g/g}^b$	(%) Eficacia en la extracción
3,0	$56,8 \pm 0,3$	100,5
1,5	$56,6 \pm 0,5$	100,2
0,75	$56,8 \pm 0,3$	100,5
0,4	$56,3 \pm 0,3$	99,6
0,2	$56,5 \pm 0,3$	99,9
0,1	$33,0 \pm 0,3$	58,5

a. $[\text{HCl}]=0\text{M}$; Tiempo de sonicación=0,5 min; Temperatura de extracción= 20°C; Caudal de extracción=6,0 mL/min; Volumen de disolución extractante=1mL

b. $[\text{Zn}]$ = Media $\pm$ desviación estándar (n=3)

Tabla 68. Experimentos realizados para la optimización de la concentración de HCl

$[\text{HCl}]$ (M) ^a	$[\text{Zn}]$ $\mu\text{g/g}^b$	(%) Eficacia en la extracción
3,0	$56,8 \pm 0,3$	100,5
1,5	$56,3 \pm 0,3$	99,6
0,75	$56,5 \pm 0,3$	99,9
0,4	$56,1 \pm 0,5$	99,3
0,2	$56,5 \pm 0,3$	99,9
0,1	$32,4 \pm 0,3$	57,3

a. $[\text{HNO}_3]=0\text{M}$; Tiempo de sonicación=0,5 min; Temperatura de extracción= 20°C; Caudal de extracción=6,0 mL/min; Volumen de disolución extractante=1mL

b. $[\text{Zn}]$ = Media $\pm$ desviación estándar (n=3)

Los valores óptimos para cada variable en la extracción de cinc en las muestras de cereales y derivados se indican en la Tabla 69.

Tabla 69. Valores óptimos para cada una de las variables implicadas en el proceso de extracción de cinc de las muestras de cereales y derivados

VARIABLE	VALORES ÓPTIMOS PARA CADA UNA DE LAS VARIABLES
[HNO ₃]	0,2M / 0 M
[HCl]	0 M / 0,2 M
Tiempo de sonicación	0,5 min
Temperatura de extracción	20 °C
Caudal de extracción	6,0 mL/min
Volumen de disolución extractante	1mL

- Experimentos realizados para la optimización de la extracción de cinc en las muestras de Frutos Secos

Para las variables **volumen de disolución extractante** y **temperatura de extracción** (ambas variables no significativas) se observa que su valor mínimo, dentro del intervalo de estudio, es suficiente para obtener eficacias en la extracción cuantitativas (experimentos 1 y 3 de la matriz de Plackett-Burman, Tabla 59). Así, los valores considerados como óptimos para estas variables son 1mL y 20°C, respectivamente.

En el estudio del **tiempo de sonicación** y del **caudal de extracción** (Figura 34) se observa que los valores considerados como óptimos, ya que con ellos se consigue un % eficacia en la extracción cuantitativo y la frecuencia de muestreo más elevada, son un tiempo de sonicación de 0,5 min y un caudal de extracción de 6 mL/min.

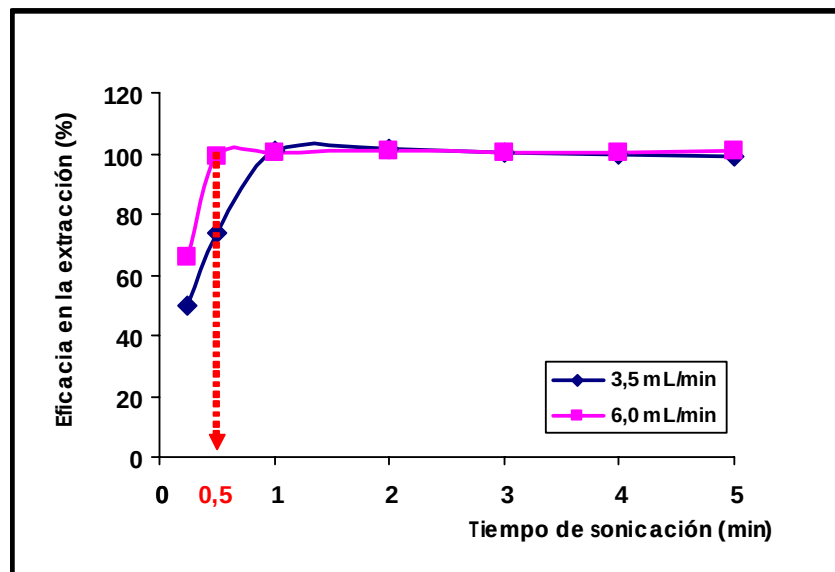


Figura 34. Experimentos realizados para la optimización del tiempo de sonicación a un caudal de extracción de 3,5 mL/min y 6,0 mL/min. $[\text{HNO}_3]=3\text{M}$; $[\text{HCl}]=3\text{M}$; Temperatura de extracción= 20°C ; Volumen de disolución extractante=1mL

Con respecto a las variables significativas, a pesar de su elevado efecto positivo, se ha estudiado, como en los restantes casos, la posibilidad de eliminar alguno de los dos ácidos constituyentes de la disolución extractante, así como de disminuir al máximo la **concentración de estos ácidos** en esta disolución. En este estudio (Tablas 70 y 71) se observa que la concentración ácida mínima para extraer cuantitativamente el cinc de las matrices de frutos secos es 0,4 M cuando la disolución es HNO_3 , siendo ésta la disolución extractante óptima para este tipo de matrices.

Tabla 70. Experimentos realizados para la optimización de la concentración de HNO_3

$[\text{HNO}_3]$ (M) ^a	$[\text{Zn}]$ $\mu\text{g/g}^b$	(%) Eficacia en la extracción
3,0	$56,5 \pm 0,3$	101,0
1,5	$56,1 \pm 0,0$	100,5
0,75	$55,8 \pm 0,3$	99,9
0,4	$55,7 \pm 0,5$	99,6
0,2	$46,7 \pm 0,3$	83,6

a. $[\text{HCl}]=0\text{M}$; Tiempo de sonicación=0,5 min; Temperatura de extracción= 20°C ; Caudal de extracción=6,0 mL/min; Volumen de disolución extractante=1mL

b. $[\text{Zn}]$ = Media $\pm$ desviación estándar (n=3)

Tabla 71. Experimentos realizados para la optimización de la concentración de HCl

[HCl] (M) ^a	[Zn] µg/g ^b	(%) Eficacia en la extracción
3,0	56,0 ± 0,3	100,2
1,5	55,8 ± 0,3	99,9
0,75	55,2 ± 0,5	98,8
0,4	47,1 ± 0,5	84,2

a. [HNO₃]=0M; Tiempo de sonicación=0,5 min; Temperatura de extracción= 20°C; Caudal de extracción=6,0 mL/min; Volumen de disolución extractante=1mL

b. [Zn] = Media ± desviación estándar (n=3)

Los valores óptimos para cada variable implicada en la extracción de cinc en las muestras de frutos secos se indican en la Tabla 72.

Tabla 72. Valores óptimos para cada una de las variables implicadas en el proceso de extracción de cinc de las muestras de frutos secos

VARIABLE	VALORES ÓPTIMOS PARA CADA UNA DE LAS VARIABLES
[HNO ₃]	0,4M
[HCl]	0 M
Tiempo de sonicación	0,5 min
Temperatura de extracción	20 °C
Caudal de extracción	6,0 mL/min
Volumen de disolución extractante	1mL

- Experimentos realizados para la optimización de la extracción de cinc en las muestras de Legumbres**

La extracción de cinc de muestras de legumbres está afectada significativamente por las concentraciones de los ácidos presentes en la disolución extractante, mientras que las demás variables casi no afectan al proceso.

Los valores óptimos establecidos para las variables **volumen de disolución extractante** y **temperatura de extracción** son los valores mínimos establecidos en el intervalo de estudio, es decir, 1mL y 20°C respectivamente, ya que se observa que con estos valores se obtienen eficacias en la extracción cuantitativas (experimentos 1 y 3 de la matriz de Plackett-Burman, Tabla 59) y,

a su vez, se mejoran las características analíticas del sistema y se simplifica el proceso (no hay que controlar la temperatura).

En el estudio de las variables **tiempo de sonicación** y del **caudal de extracción** (Figura 35) se observa que la mejor frecuencia de muestreo se alcanza a un caudal de 6,0 mL/min donde el %eficacia en la extracción es cuantitativo en un tiempo de 0,5 min, siendo éstos elegidos como los valores óptimos para estas dos variables.

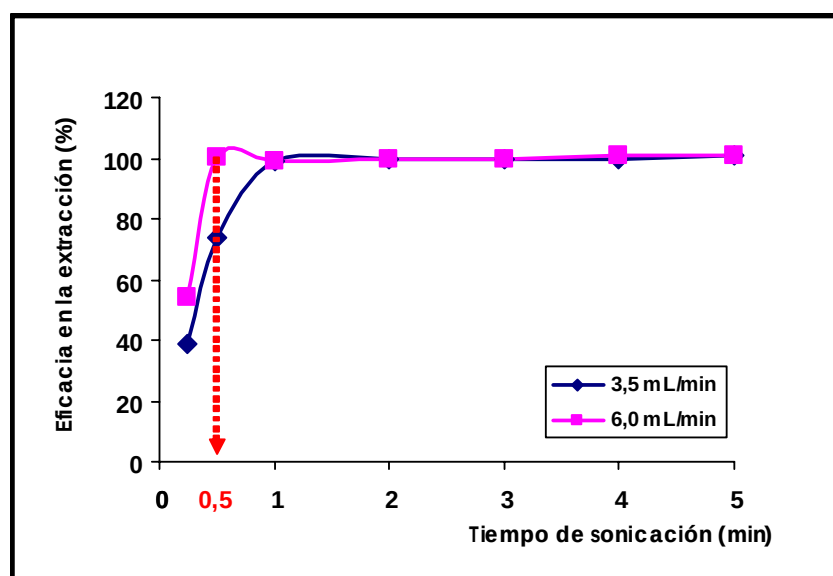


Figura 35. Experimentos realizados para la optimización del tiempo de sonicación a un caudal de extracción de 3,5 mL/min y 6,0 mL/min. $[\text{HNO}_3]=3\text{M}$; $[\text{HCl}]=3\text{M}$; Temperatura de extracción= 20°C ; Volumen de disolución extractante=1mL

Con respecto a las **concentraciones de los ácidos**, se estudió la posibilidad de utilizar sólo uno de ellos como disolución extractante y disminuir al máximo la concentración del mismo (Tablas 73 y 74). En este estudio se ha observado que una disolución 0,2 M de HNO_3 o de HCl es suficiente para extraer cuantitativamente el cinc de las muestras de legumbres, obteniéndose así la misma disolución extractante óptima que para el caso de las muestras de cereales y derivados. Al igual que en el último caso, se consideran como óptimas las dos disoluciones extractantes, pero se ha tomado arbitrariamente el HNO_3 0,2 M para continuar realizando los estudios en esta matriz.

Tabla 73. Experimentos realizados para la optimización de la concentración de HNO_3

$[\text{HNO}_3]$ (M) ^a	$[\text{Zn}]$ $\mu\text{g/g}^b$	(%)Eficacia en la extracción
3,0	$35,5 \pm 0,5$	101,2
1,5	$35,1 \pm 0,5$	99,9
0,75	$35,4 \pm 0,3$	100,8
0,4	$35,1 \pm 0,5$	99,9
0,2	$35,0 \pm 0,3$	99,4
0,1	$21,6 \pm 0,3$	61,4

a. $[\text{HCl}]=0\text{M}$; Tiempo de sonicación=0,5 min; Temperatura de extracción= 20°C; Caudal de extracción=6,0 mL/min; Volumen de disolución extractante=1mL

b. $[\text{Zn}]$ = Media $\pm$ desviación estándar (n=3)

Tabla 74. Experimentos realizados para la optimización de la concentración de HCl

$[\text{HCl}]$ (M) ^a	$[\text{Zn}]$ $\mu\text{g/g}^b$	(%) Eficacia en la extracción
3,0	$35,4 \pm 0,3$	100,8
1,5	$35,1 \pm 0,5$	99,9
0,75	$35,1 \pm 0,5$	99,9
0,4	$34,8 \pm 0,3$	99,0
0,2	$34,6 \pm 0,5$	98,5
0,1	$18,6 \pm 0,3$	52,8

a. $[\text{HNO}_3]=0\text{M}$; Tiempo de sonicación=0,5 min; Temperatura de extracción= 20°C; Caudal de extracción=6,0 mL/min; Volumen de disolución extractante=1mL

b. $[\text{Zn}]$ = Media $\pm$ desviación estándar (n=3)

Los valores óptimos para cada variable en la extracción de cinc en las muestras de legumbres se indican en la Tabla 75.

Tabla 75. Valores óptimos para cada una de las variables implicadas en el proceso de extracción de cinc de las muestras de legumbres

VARIABLE	VALORES ÓPTIMOS PARA CADA UNA DE LAS VARIABLES
$[\text{HNO}_3]$	0,2M / 0M
$[\text{HCl}]$	0 M / 0,2 M
Tiempo de sonicación	0,5 min
Temperatura de extracción	20 °C
Caudal de extracción	6,0 mL/min
Volumen de disolución extractante	1mL

- Experimentos realizados para la optimización de la extracción de cinc en las muestras de Verduras, Hortalizas y Frutas

El comportamiento de las variables que afectan a la extracción de cinc en muestras de verduras, hortalizas y frutas difiere un poco de los casos estudiados hasta el momento. En este caso sólo hay una variable significativa que es la concentración de HNO_3 . Las demás variables no son significativas, pero hay dos de ellas que presentan un efecto estimado bastante elevado: la concentración de HCl y el tiempo de extracción.

Comenzando por aquellas variables no significativas se comprueba que un **volumen de disolución extractante** de 1mL y una **temperatura de extracción** de 20°C pueden ser los valores óptimos para estas variables, ya que con ellos se obtienen eficacias en la extracción cuantitativas (experimentos 1 y 3 de la matriz de Plackett-Burman, Tabla 59).

En el estudio de las variables **tiempo de sonicación** y del **caudal de extracción** (Figura 36) se observa que, a pesar de que el tiempo de sonicación tiene un efecto estimado bastante elevado, son suficientes 0,5 min a un caudal de 6 mL/min para extraer cuantitativamente el cinc este tipo de muestras. Así, estos valores serán los óptimos para estas variables, ya que con ellos se alcanza la frecuencia de muestreo más elevada.

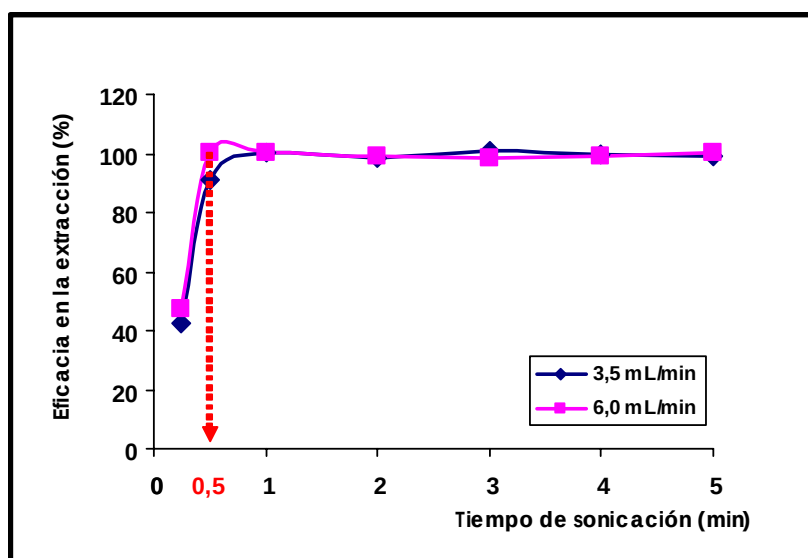


Figura 36. Experimentos realizados para la optimización del tiempo de sonicación a un caudal de extracción de 3,5 mL/min y 6,0 mL/min. $[\text{HNO}_3]=3\text{M}$; $[\text{HCl}]=3\text{M}$; Temperatura de extracción= 20°C; Volumen de disolución extractante=1mL

Con respecto a las **concentraciones de los ácidos**, se estudió la posibilidad de eliminar el HCl, ya que este ácido tiene un menor efecto estimado en el análisis de los resultados del diseño factorial. Los estudios realizados determinaron que si se elimina de la disolución extractante este ácido (utilizando una disolución extractante de HNO₃ 3M) se obtienen eficacias en la extracción cuantitativas (Tabla 76).

Tabla 76. Experimentos realizados para la optimización de la concentración de HCl

[HCl] (M) ^a	[Zn] µg/g ^b	(%) Eficacia en la extracción
3,0	26,4 ± 0,3	100,2
1,5	26,0 ± 0,5	99,0
0	25,9 ± 0,3	100,2

a. [HNO₃]=3M; Tiempo de sonicación=0,5 min; Temperatura de extracción= 20°C; Caudal de extracción=6,0 mL/min; Volumen de disolución extractante=1mL

b. [Zn] = Media ± desviación estándar (n=3)

Una vez eliminado el HCl de la disolución extractante, se ha estudiado la posibilidad de disminuir la concentración de HNO₃ al máximo. Como se observa en la Tabla 77, una disolución extractante de HNO₃ 0,1 M es suficiente para extraer cuantitativamente todo el cinc presente en las muestras de verduras, hortalizas y frutas, y, como el objetivo es disminuir al máximo la concentración ácida de la disolución extractante, este será el valor óptimo elegido para esta variable.

Tabla 77. Experimentos realizados para la optimización de la concentración de HNO₃

[HNO ₃] (M) ^a	[Zn] µg/g ^b	(%) Eficacia en la extracción
3,0	26,4 ± 0,3	100,2
1,5	26,0 ± 0,5	99,0
0,75	25,9 ± 0,3	98,4
0,4	26,0 ± 0,5	99,0
0,2	26,4 ± 0,3	100,2
0,1	26,0 ± 0,5	99,0
0,05	18,1 ± 0,3	68,7

a. [HCl]=0M; Tiempo de sonicación=0,5 min; Temperatura de extracción= 20°C; Caudal de extracción=6,0 mL/min; Volumen de disolución extractante=1mL

b. [Zn] = Media ± desviación estándar (n=3)

Los valores óptimos para cada variable implicada en la extracción de cinc en las muestras de verduras, hortalizas y frutas se indican en la Tabla 78.

Tabla 78. Valores óptimos para cada una de las variables implicadas en el proceso de extracción de cinc de las muestras de verduras, hortalizas y frutas

VARIABLE	VALORES ÓPTIMOS PARA CADA UNA DE LAS VARIABLES
[HNO ₃]	0,1M
[HCl]	0 M
Tiempo de sonicación	0,5 min
Temperatura de extracción	20 °C
Caudal de extracción	6,0 mL/min
Volumen de disolución extractante	1mL

En la Tabla 79 se muestra un resumen de los valores óptimos para cada una de las variables implicadas en el proceso de extracción de cinc en los diferentes tipos de muestras de alimentos.

Tabla 79. Valores óptimos para cada una de las variables implicadas en el proceso de extracción de cinc de los diferentes tipos de muestras alimenticias

Variables	VALORES ÓPTIMOS PARA CADA UNA DE LAS VARIABLES IMPLICADAS EN LA EXTRACCIÓN DE CINCO EN LOS DIFERENTES TIPOS DE MUESTRAS ALIMENTICIAS					
	Moluscos y pescados	Carnes	Cereales y derivados	Frutos secos	Legumbres	Verduras, hortalizas y frutas
A (M)	0,2	0,75 / 0	0,2 / 0	0,4	0,2 / 0	0,1
B (M)	0	0 / 0,75	0 / 0,2	0	0 / 0,2	0
C (min)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
D (°C)	20	20	20	20	20	20
E (mL/min)	3,5 / 6,0	3,5 / 6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
F (mL)	1	1	1	1	1	1

A, [HNO₃]; B, [HCl]; C, Tiempo sonicación; D, Temperatura de extracción; E, Caudal de extracción; F, Volumen de disolución extractante.

Teniendo en cuenta los valores óptimos obtenidos para la extracción de cinc de los diferentes tipos de muestras, se observa que este proceso no necesita concentraciones elevadas de ácidos para tener resultados

satisfactorios. Así, las concentraciones de ácido necesarias oscilan entre 0,2 y 0,75M. Se observa a su vez que en el caso de las muestras de carne, de cereales y derivados y de las legumbres que el poder extractante de los dos ácidos estudiados es el mismo, ya que la eficacia de la extracción es cuantitativa utilizando bien el HNO_3 o el HCl a los mismos niveles de concentración.

En cuanto al tiempo de extracción se observa que en todos los casos son sólo necesarios 0,5 min para obtener resultados satisfactorios a un caudal de 6 mL/min. En el caso de las muestras de moluscos y pescados y de carne se obtienen eficacias de extracción cuantitativas también si el caudal es de 3,5 mL/min. Además, para todos los tipos de muestras se lleva a cabo la extracción óptima a temperatura ambiente (20°C) y utilizando 1 mL de disolución extractante.

4.1.2.1 Estudio de la cantidad de muestra

Este estudio no se ha realizado con todos los tipos de muestras, ya que el cinc es un metal cuya detección por espectrofotometría de absorción atómica con llama es muy sensible, de hecho, su detección es lineal hasta $1\mu\text{g/mL}$. Por ello, en muchos casos, debido a esta alta sensibilidad y a las concentraciones presentes en las muestras, no se puede utilizar mayor cantidad de muestra que las propuestas en la optimización (Tabla 58) sin añadir un canal de dilución al dispositivo FIA. Los tipos de muestras que se encuentran en esta situación son los moluscos y pescados, las muestras de carne y las verduras, hortalizas y frutas.

En los casos de los cereales y derivados y los frutos secos, se han utilizado muestras cuya concentración de cinc es menor que la presente en los materiales de referencia utilizados en la optimización del proceso. Así se pudieron estudiar mayores cantidades de muestra manteniendo las señales de absorbancia dentro del intervalo lineal. En el caso de las muestras de cereales y derivados, se ha utilizado una muestra de cereales con cacao con una concentración de cinc de $19,9 \pm 0,3 \mu\text{g/g}$. En el caso de los frutos secos, la muestra utilizada es una muestra de castañas con una concentración de cinc de $22,4 \pm 0,7 \mu\text{g/g}$. En el caso de las legumbres se ha utilizado la misma muestra que en la optimización, una muestra de habas cuya concentración de cinc es

de $35,1 \pm 0,9 \mu\text{g/g}$, ya que la concentración de cinc presente en esta muestra permitía estudiar mayores cantidades en el análisis de la misma. Estas concentraciones, al igual que en todos los casos que no se utilizan material de referencia, han sido determinadas por triplicado utilizando el método de referencia descrito en la página 86.

Para las muestras de cereales y derivados, el estudio de la optimización se ha realizado con 0,0100 g de muestra, y se ha observado experimentalmente que se puede utilizar 0,0200 g y 0,0300 g de muestra (cuyas eficacias en la extracción son de 100,7% y 99,5% respectivamente) manteniendo los óptimos obtenidos inicialmente.

En el caso de los frutos secos, la optimización se ha realizado con 0,0100 g de muestra. Se ha estudiado para este tipo de muestras la posibilidad de utilizar 0,0200 g y 0,0300 g, y se ha observado que para poder utilizar estas cantidades de muestra es necesario un tiempo de extracción mayor que el propuesto en la optimización (0,5 min). De esta forma se ha comprobado que se necesitan 1 min y 1,5 min de tiempo de extracción para los 0,0200 g y 0,0300 g de muestra respectivamente. Las eficacias en la extracción obtenidas para estas dos cantidades de muestra son 100,4% y 100,3%.

En lo que respecta a las muestras de las legumbres se ha estudiado la posibilidad de utilizar 0,0200 g, y se ha observado que con los óptimos considerados para los 0,0100 g de muestra, la eficacia en la extracción es del 100%. No se han estudiado mayores cantidades de muestra porque las señales de absorbancia estaban fuera del intervalo lineal del cinc debido a la concentración del metal presente en este tipo de muestras.

4.1.2.2 Estudio de la influencia del tamaño de partícula de la muestra

Todos los estudios descritos anteriormente se han realizado con un diámetro de partícula menor de $30 \mu\text{m}$. Para ver la influencia del tamaño de partícula en la extracción del cinc se han tomado diferentes porciones de una misma muestra (para cada tipo de matriz) con diferentes tamaños de partícula: diámetro menor de $30 \mu\text{m}$ y de diámetro comprendido entre $30\text{-}100 \mu\text{m}$.

En este estudio no se han podido utilizar las muestras analizadas en los estudios de optimización, excepto en los casos de los frutos secos y las

legumbres (Tabla 58), porque las muestras utilizadas en dichas optimizaciones son materiales de referencia y, por tanto, es imposible realizar estudios de tamaño de partícula, ya que éste es uniforme. Las muestras analizadas en cada caso se indican en la Tabla 80.

Con las porciones de diferente diámetro de cada muestra se ha realizado por una parte el análisis siguiendo el método de referencia descrito previamente (pág. 86) y por otra el análisis de las mismas utilizando las metodologías propuestas, y se compararon los resultados obtenidos. Las eficacias en la extracción se indican en la Tabla 80. De los resultados obtenidos se deduce que el tamaño de partícula no influye en la extracción del cinc. Esto simplifica mucho el análisis, ya que no hay que someter la muestra a ningún tratamiento previo que garantice un cierto tamaño de partícula.

Tabla 80. Experimentos realizados en porciones de muestras con diferente tamaño de partícula para todos los tipos de muestras estudiados utilizando el método de referencia y las metodologías continuas propuestas. Se indica además la eficacia en la extracción del sistema FIA

Tipo de muestra	Muestra analizada	Tamaño de partícula	[Zn] obtenida mediante el método de referencia ($\mu\text{g/g}$)	[Zn] obtenida mediante los métodos continuos propuestos ($\mu\text{g/g}$)	(%)Eficacia en la extracción
Moluscos y pescados	Mejillón	<30 μm	188,9 $\pm$ 0,6	189,0 $\pm$ 0,6	100,1
		30-100 μm	205,6 $\pm$ 1,1	205,6 $\pm$ 0,6	100,0
Carnes	Hígado de conejo	<30 μm	163,6 $\pm$ 0,9	164,2 $\pm$ 0,6	100,4
		30-100 μm	160,1 $\pm$ 0,9	161,0 $\pm$ 1,0	100,6
Cereales y derivados	Cereales con cacao	<30 μm	19,2 $\pm$ 0,4	19,5 $\pm$ 0,3	101,4
		30-100 μm	19,7 $\pm$ 0,4	19,7 $\pm$ 0,3	100,0
Frutos secos	Avellanas	<30 μm	55,9 $\pm$ 0,7	56,3 $\pm$ 0,3	100,8
		30-100 μm	55,1 $\pm$ 0,7	55,8 $\pm$ 0,3	101,2
Legumbres	Habas	<30 μm	35,2 $\pm$ 0,9	35,3 $\pm$ 0,3	100,3
		30-100 μm	35,6 $\pm$ 0,9	35,8 $\pm$ 0,3	100,4
Verduras, hortalizas y frutas	Patata	<30 μm	21,4 $\pm$ 0,4	21,1 $\pm$ 0,3	98,6
		30-100 μm	21,6 $\pm$ 0,4	20,9 $\pm$ 0,3	98,5

4.1.3 Extracción de cobre

Este proceso se ha optimizado utilizando un diseño factorial de Plackett-Burman $2^6 \cdot 3/16$ de resolución tipo IV con 6 grados de libertad y un punto central. Las variables que afectan a la extracción de cobre, así como los valores máximos y mínimos, seleccionados en función de estudios previos, son los mismos que en el caso de la extracción de cinc (Tabla 57, pág. 141).

Una vez obtenida la matriz del diseño (Tabla 27), se realizaron los experimentos fijados por la misma (13 experimentos no randomizados). Para realizar estos experimentos sobre las diferentes matrices, se han utilizado materiales de referencia, en los casos en los que se certificaba la concentración de cobre y, en los otros casos, se han utilizado muestras en las que previamente se había determinado por triplicado su concentración de cobre utilizando el método de referencia descrito en la página 86 (Tabla 81). La cantidad de material de referencia o muestra utilizada para llevar a cabo la optimización del proceso se ha fijado en función de la concentración de cobre presente.

Tabla 81. Muestras y materiales de referencia utilizados en la optimización del procedimiento FIA, concentración de cobre presente en dichas muestras y cantidad utilizada en la optimización

Tipo de matriz	Muestra con la que se realiza la optimización	[Cu]($\mu\text{g/g}$)	Cantidad de muestra (g, peso seco)
Moluscos y pescados	NRCC-Tort 1 ^a	439 ± 22	0,0100
Carnes	Riñón de cerdo BCR-186 ^b	$31,9 \pm 0,4$	0,0300
Cereales y derivados	Harina integral BCR-189 ^b	$6,4 \pm 0,2$	0,0300
Frutos secos	Nueces	$22,2 \pm 0,7$	0,0300
Legumbres	Habas	$11,4 \pm 1,0$	0,0300
Verduras, hortalizas y frutas	Te NCS ^c DC 73351	$17,3 \pm 1,0$	0,0300

a. NRCC: National Research Council of Canada

b. BCR: Community Bureau of Reference

c. NCS: China National Analysis Center for Iron and Steel

La matriz del diseño de Plackett-Burman con los valores que toma cada variable en cada experimento y el %eficacia en la extracción obtenido en cada caso se muestran en la Tabla 82. Los experimentos se han realizado por duplicado, por lo que la eficacia de la extracción indicada es la media obtenida de los dos experimentos.

Una vez realizados los experimentos, se procedió al análisis de los datos proporcionados por el diseño. Es necesario conocer que variables son significativas y como afectan al proceso de extracción y, para ello, se recurre a las **Cartas Pareto estandarizadas** para cada tipo de muestra (Figura 37).

Tabla 82. Matriz del diseño de Plackett-Burman con los valores de cada variable en cada experimento, con el %eficacia en la extracción de cobre obtenidas en cada uno de ellos para cada tipo de muestra

						% Eficacia en la extracción					
A	B	C	D	E	F	Moluscos y pescados	Carnes	Cereales y derivados ^a	Frutos secos	Legumbres	Verduras, hortalizas y frutas
3	0	5	20	3,5	1	99,3	100,3	112,0	101,8	103,6	101,5
3	3	0,5	70	3,5	1	85,5	73,1	100,7	56,3	103,6	68,1
0	3	5	20	6	1	96,3	100,3	100,7	95,3	97,2	97,3
3	0	5	70	3,5	3	83,3	104,0	99,2	100,8	101,4	104,3
3	3	0,5	70	6	1	100,3	73,1	100,7	56,3	103,6	68,1
3	3	5	20	6	3	98,1	104,0	99,2	100,8	101,4	91,8
1,5	1,5	2,75	45	4,75	1,5	99,9	101,0	111,2	99,7	105,7	102,9
0	3	5	70	3,5	3	86,3	104,0	99,2	91,0	101,4	91,8
0	0	5	70	6	1	4,6	0,0	10,5	0,0	0,0	0,0
0	0	0,5	70	6	3	3,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
3	0	0,5	20	6	3	83,3	63,3	99,2	61,8	101,4	54,2
0	3	0,5	20	3,5	3	74,5	63,3	99,2	52,0	82,4	41,7
0	0	0,5	20	3,5	1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

A, [HNO₃]; B, [HCl]; C, Tiempo sonicación; D, Temperatura de extracción; E, Caudal de extracción; F, Volumen de disolución extractante.

a. Los análisis llevados a cabo para los cereales y derivados se han llevado a cabo con una adición de 1 µg/mL en el extracto debido a las bajas [Cu] presentes en este tipo de muestras

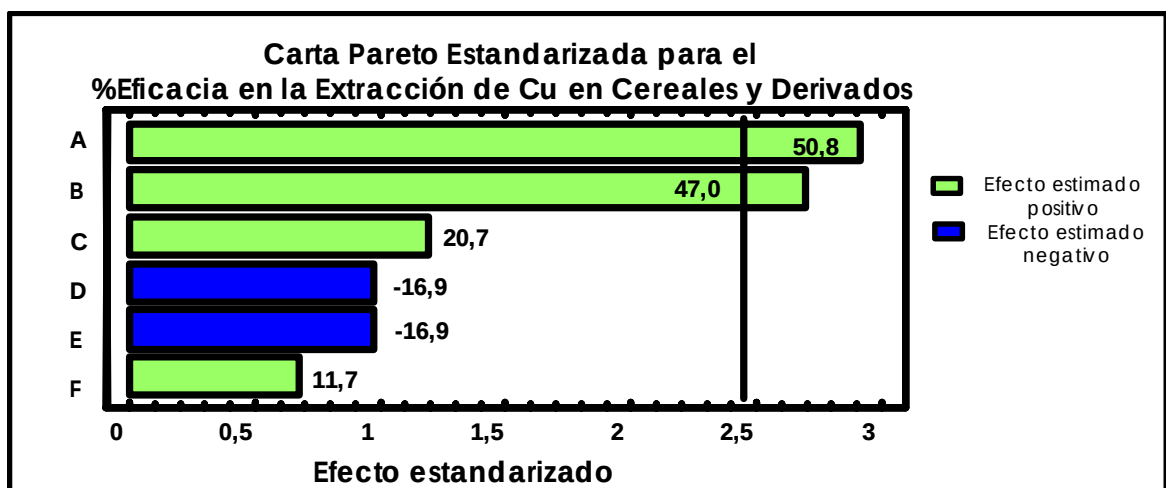
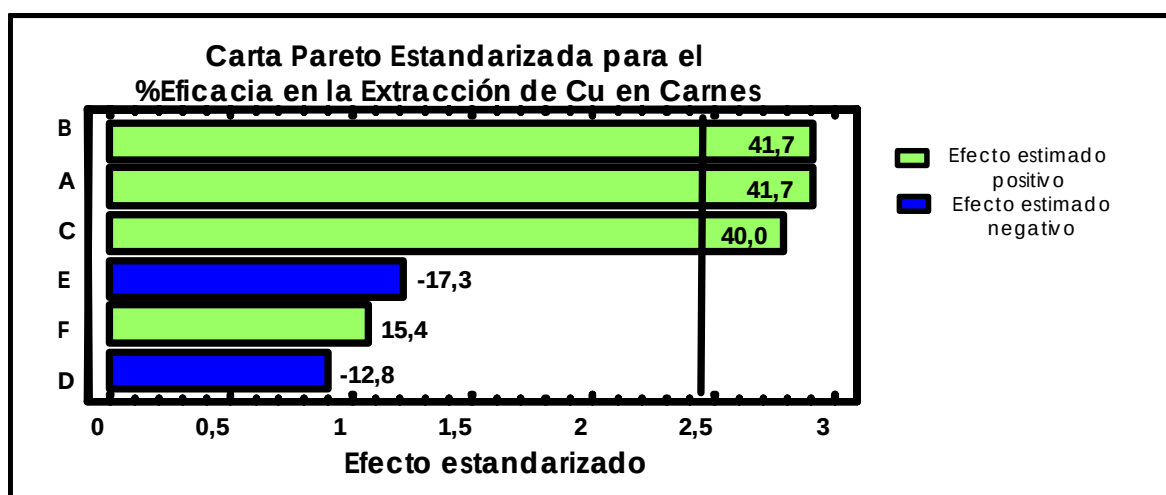
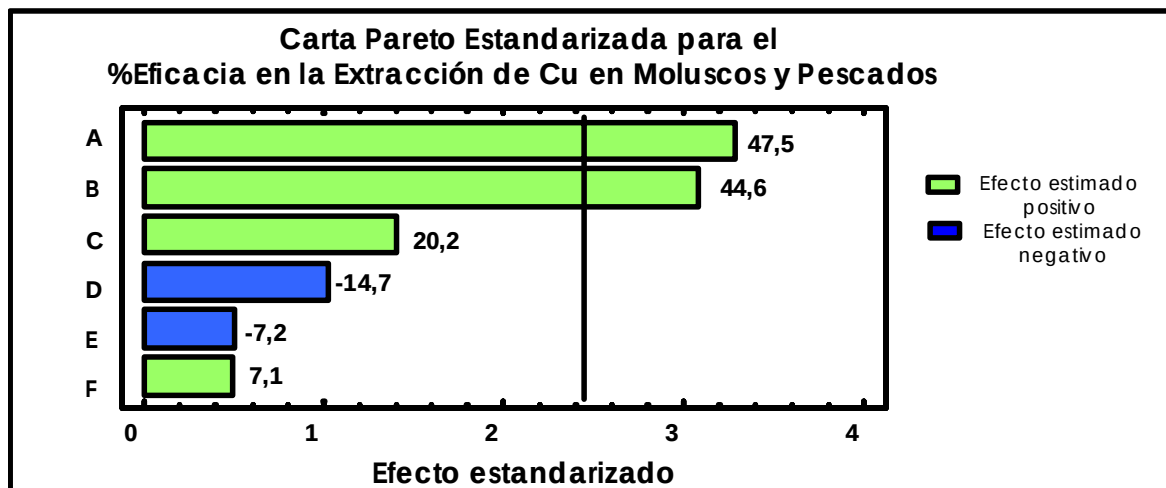


Figura 37. Carta Pareto estandarizada de los efectos principales estandarizados en el diseño factorial; la flecha vertical indica el límite de significación estadística para los efectos. A, $[\text{HNO}_3]$; B, $[\text{HCl}]$; C, Tiempo sonicación; D, Temperatura de extracción; E, Caudal de extracción; F, Volumen de disolución extractante.

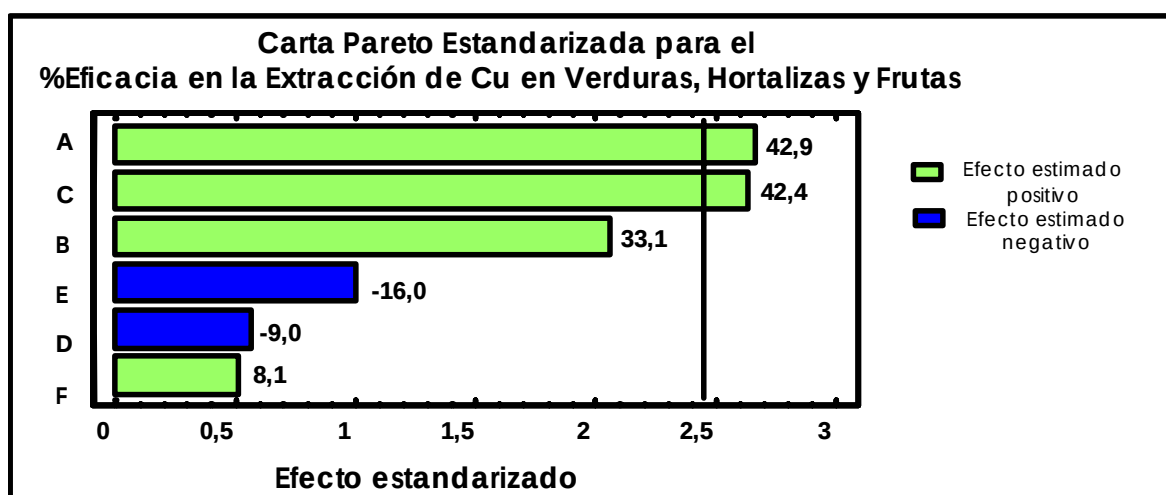
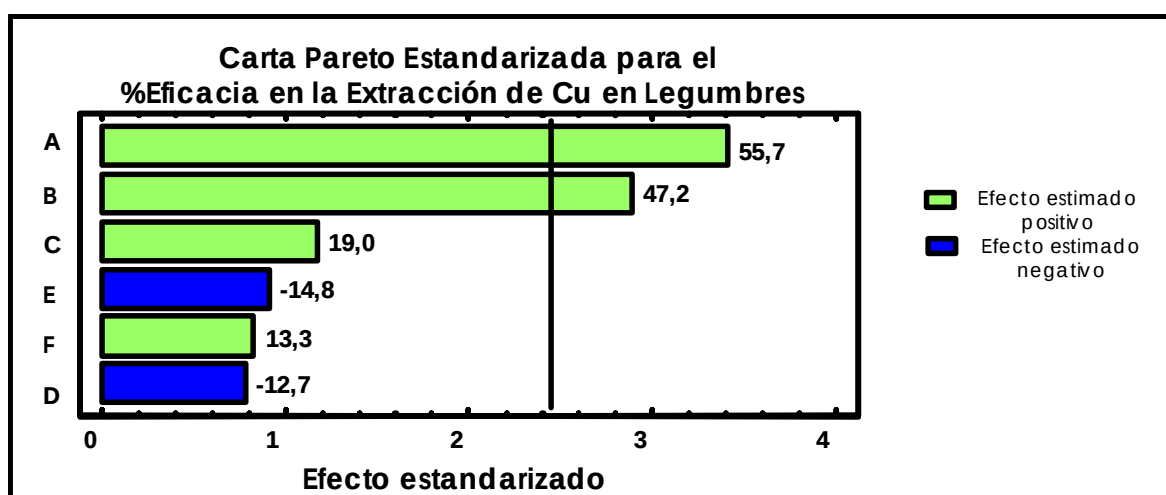
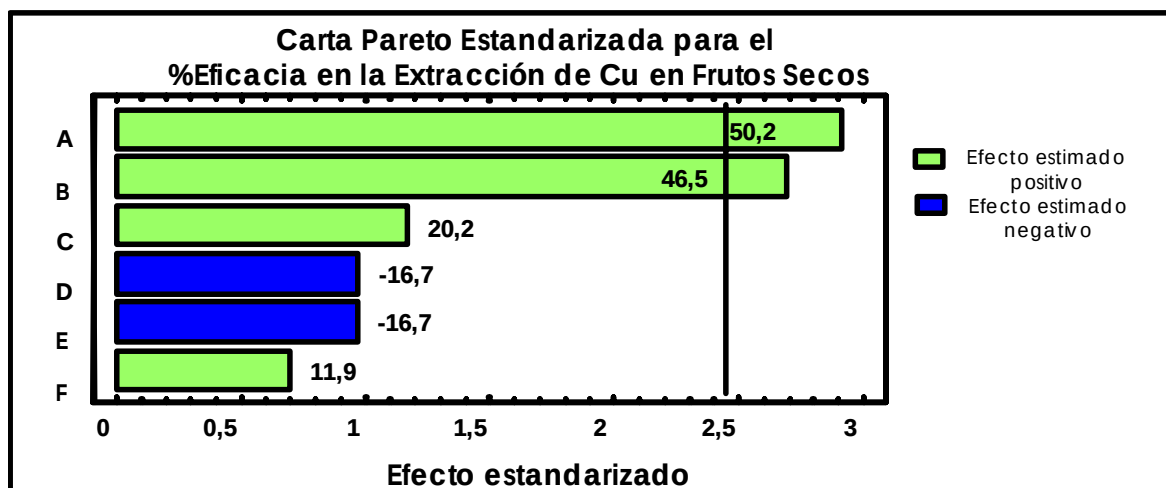


Figura 37 (continuación). Carta Pareto estandarizada de los efectos principales estandarizados en el diseño factorial; la flecha vertical indica el límite de significación estadística para los efectos. A, $[\text{HNO}_3]$; B, $[\text{HCl}]$; C, Tiempo sonicación; D, Temperatura de extracción; E, Caudal de extracción; F, Volumen de disolución extractante.

- **Análisis de los resultados obtenidos con el diseño factorial**

En los resultados obtenidos al aplicar el diseño de Plackett-Burman a la extracción de cobre en los diferentes tipos de muestras, se observa que hay un comportamiento de las variables bastante similar para los diferentes tipos de muestras. Sin considerar este último tipo de muestras, se observa que las variables de mayor importancia en el proceso son las concentraciones de los ácidos que constituyen la disolución extractante y el tiempo de sonicación. Estas variables presentan, en todos los casos, un efecto estimado positivo y elevado, por lo que se puede decir que estas variables afectan positivamente al proceso de extracción entre los valores estudiados en el diseño. Sin embargo, en función del tipo de matriz las variables que afectan significativamente al proceso son diferentes. En el caso de los moluscos y pescados, los cereales y derivados, los frutos secos y las legumbres se observa que las variables significativas son las concentraciones de los ácidos constituyentes de la disolución extractante. En el caso de las muestras de carne, además de estas dos variables, el tiempo de extracción también es una variable significativa. Por último, en el caso de las verduras, hortalizas y frutas, las variables significativas son la concentración de HNO_3 y el tiempo de extracción, no siendo la concentración de HCl una variable significativa, pero sí de elevada importancia en el proceso de extracción del metal dado su elevado efecto estimado (33,1). En la Figura 38 se muestran las superficies de respuesta para las variables significativas en cada caso, donde se observa el como varía el %eficacia de la extracción del cobre en función de los valores que toman estas variables (manteniendo las demás variables en el valor intermedio del intervalo de estudio propuesto para el diseño).

Las demás variables no superan el nivel de significación establecido por el método para un 95% de confianza (representado por la línea vertical). Dentro de estas variables no significativas, se observa un comportamiento bastante regular para las diferentes matrices. La temperatura y el caudal de extracción no son variables significativas y presentan un efecto estimado negativo, y por otra parte, el volumen de disolución extractante tiene un efecto positivo.

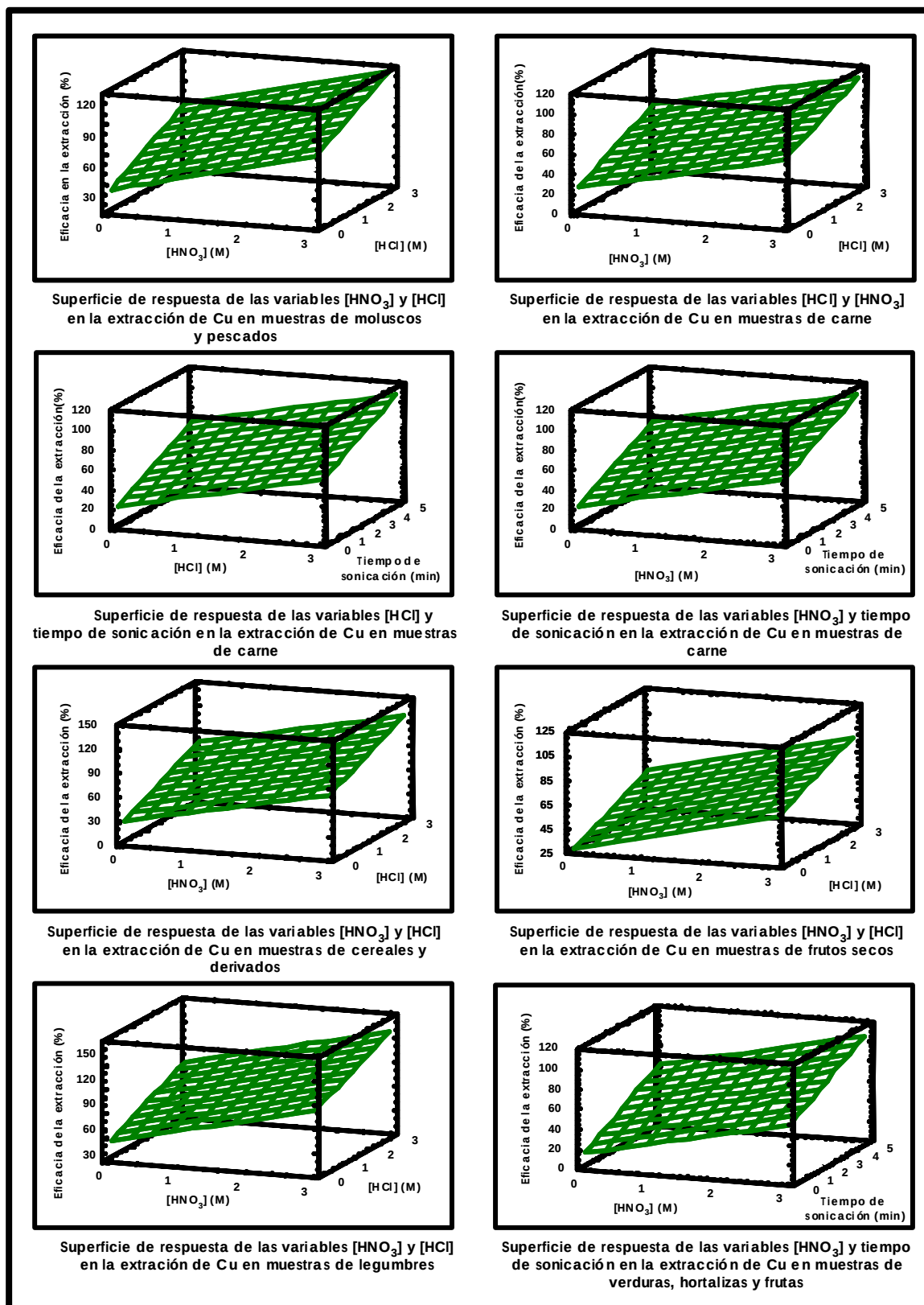


Figura 38. Superficies de respuesta proporcionadas por el diseño de Plackett-Burman para las variables significativas en la determinación de cobre en todos los tipos de muestra estudiados (las demás variables toman el valor medio del intervalo de estudio establecido en el diseño)

Una vez analizados los resultados obtenidos al aplicar el diseño de Plackett-Burman, los valores establecidos como óptimos según el diseño factorial de Screening para cada una de las variables son los que figuran en la Tabla 83.

Tabla 83. Valores óptimos para cada una de las variables implicadas en el proceso de extracción de cobre de los diferentes tipos de muestras según el diseño de Plackett-Burman

Variables	VALORES ÓPTIMOS PARA CADA UNA DE LAS VARIABLES SEGÚN EL DISEÑO DE PLACKETT-BURMAN					
	Moluscos y pescados	Carnes	Cereales y derivados	Frutos secos	Legumbres	Verduras, hortalizas y frutas
A (M)	3	3	3	3	3	3
B (M)	3	3	3	3	3	3
C (min)	5	5	5	5	5	5
D (°C)	20	20	20	20	20	20
E (mL/min)	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
F (mL)	3	3	3	3	3	3

A, [HNO₃]; B, [HCl]; C, Tiempo sonicación; D, Temperatura de extracción; E, Caudal de extracción; F, Volumen de disolución extractante

Como el diseño de Plackett-Burman proporciona las tendencias de cada una de ellas hacia el óptimo, y no el valor óptimo en sí mismo, se realizaron una serie de experimentos fuera del marco del diseño, de acuerdo con los resultados obtenidos por el mismo, para determinar los valores óptimos de cada una de las variables que afectan a la extracción de cobre en los diferentes tipos de muestras objeto de estudio.

- **Experimentos realizados fuera del marco del diseño**
- **Experimentos realizados para la optimización de la extracción de cobre en las muestras de Moluscos y Pescados**

Se estudiaron primero aquellas variables que parecían no tener tanta influencia en la extracción del cobre. Dentro de las variables no significativas con efecto positivo se encuentran el tiempo de sonicación (efecto estimado= 20,2) y el volumen de disolución extractante (efecto estimado= 7,1). En lo que respecta al **volumen de disolución extractante**, se ha estudiado la posibilidad

de disminuir al máximo este volumen, para obtener una mayor sensibilidad, y se ha observado que se obtienen % extracción cuantitativas con un volumen de disolución de 1 mL (experimentos 1, 3 y 5 de la matriz de Plackett-Burman, Tabla 82), por lo que este será el valor elegido como óptimo para esta variable en la extracción de cobre.

El **tiempo de sonicación** es la otra variable no significativa con efecto positivo en la extracción. Como en los anteriores casos esta variable se ha optimizado con el **caudal de extracción** debido a la relación existente entre estas variables (Figura 39). En los resultados obtenidos, se observa que el menor tiempo de extracción necesario para obtener una eficacia en la extracción cuantitativa es de 1 min a un caudal de 6 mL/min. Teniendo en cuenta que el objetivo es que el tiempo de análisis sea el mínimo, estos son los valores tomados como óptimos para estas dos variables.

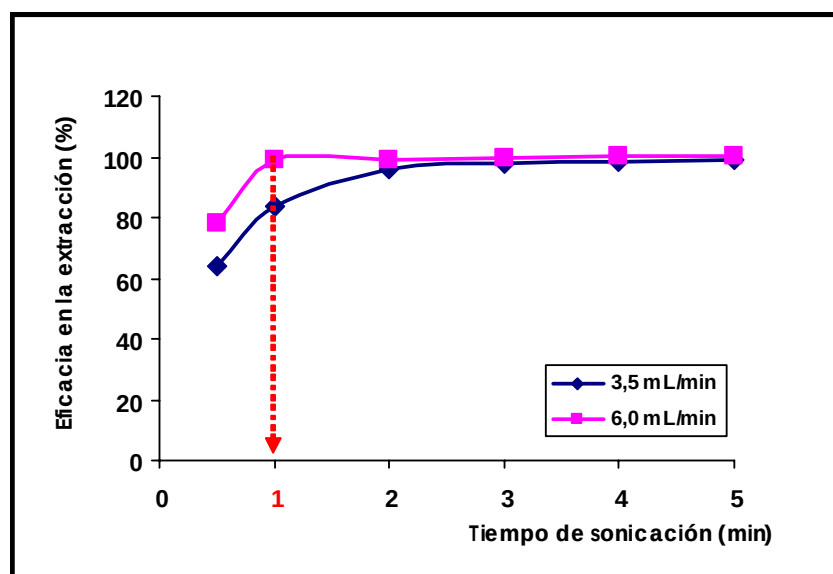


Figura 39. Experimentos realizados para la optimización del tiempo de sonicación a un caudal de extracción de 3,5 mL/min y 6,0 mL/min. $[\text{HNO}_3]=3\text{M}$; $[\text{HCl}]=3\text{M}$; Temperatura de extracción= 20°C ; Volumen de disolución extractante=1mL

La **temperatura de extracción** es una variable no significativa y, en este caso, tiene un efecto estimado negativo. Teniendo en cuenta el valor de este efecto estimado y las eficacias en la extracción cuantitativas obtenidas en la matriz de Plackett-Burman a temperatura ambiente (experimentos 1, 3 y 6, Tabla 82), se ha fijado el óptimo para esta variable en 20°C .

En lo que respecta a los componentes de la disolución extractante, variables significativas del proceso, se observa que las **concentraciones de ambos ácidos** tienen efectos estimados similares y bastante elevados. Como el objetivo es disminuir al máximo la concentración ácida necesaria obteniéndose % extracción cuantitativos, se ha estudiado la posibilidad de eliminar uno de los componentes de esta disolución ácida y, a su vez, disminuir al máximo la concentración (Tablas 84 y 85).

Tabla 84. Experimentos realizados para la optimización de la concentración de HNO_3

$[\text{HNO}_3]$ (M) ^a	$[\text{Cu}]$ $\mu\text{g/g}^b$	(%) Eficacia en la extracción
3,0	436 ± 0	99,3
1,5	323 ± 2	73,6

a. $[\text{HCl}]=0\text{M}$; Tiempo de sonicación=1,0 min; Temperatura de extracción= 20°C; Caudal de extracción=6,0 mL/min; Volumen de disolución extractante=1mL

b. $[\text{Cu}]$ = Media $\pm$ desviación estándar (n=3)

Tabla 85. Experimentos realizados para la optimización de la concentración de HCl

$[\text{HCl}]$ (M) ^a	$[\text{Cu}]$ $\mu\text{g/g}^b$	(%) Eficacia en la extracción
3	415 ± 1	94,5
1,5	301 ± 1	68,5

a. $[\text{HNO}_3]=0\text{M}$; Tiempo de sonicación=1,0 min; Temperatura de extracción= 20°C; Caudal de extracción=6,0 mL/min; Volumen de disolución extractante=1mL

b. $[\text{Cu}]$ = Media $\pm$ desviación estándar (n=3)

De los resultados obtenidos, se concluye que no es necesaria la presencia de ambos ácidos en la disolución extractante. Si se elimina de la disolución extractante el HCl , se observa que la mínima concentración necesaria para tener %extracción cuantitativos es de 3M. Por otra parte, si se elimina el HNO_3 , una concentración de HCl 3M proporciona un %eficacia en la extracción del 94,5%. Como el objetivo es utilizar la mínima concentración ácida, se ha eliminado el HCl de la disolución extractante y se ha considerado como disolución extractante óptima una disolución de HNO_3 3M.

Los valores óptimos para cada variable en la extracción de cobre en las muestras de moluscos y pescados se indican en la Tabla 86.

Tabla 86. Valores óptimos para cada una de las variables implicadas en el proceso de extracción de cobre de las muestras de moluscos y pescados

VARIABLE	VALORES ÓPTIMOS PARA CADA UNA DE LAS VARIABLES
[HNO ₃]	3 M
[HCl]	0 M
Tiempo de sonicación	1 min
Temperatura de extracción	20 °C
Caudal de extracción	6,0 mL/min
Volumen de disolución extractante	1mL

- **Experimentos realizados para la optimización de la extracción de cobre en muestras de Carne**

En este caso, el tiempo de sonicación y la concentración de los ácidos constituyentes de la disolución extractante son variables significativas.

Con respecto a las variables no significativas, el **volumen de disolución extractante** es la única variable no significativa de efecto positivo. Sin embargo, se ha observado que un volumen de 1 mL de disolución extractante es suficiente para extraer cuantitativamente el cobre de este tipo de muestras (experimentos 1 y 3 de la matriz de Plackett-Burman, Tabla 82), y como el objetivo es minimizar este volumen para obtener mayor sensibilidad analítica, este será el valor óptimo escogido para esta variable.

En el caso de la **temperatura de extracción**, esta presenta un efecto estimado negativo, y se ha observado que a temperatura ambiente se obtienen eficacias en la extracción cuantitativas (experimentos 1, 3 y 6 de la matriz de Plackett-Burman, Tabla 82), con lo que el valor considerado como óptimo para esta variable es de 20°C.

La otra variable no significativa es el **caudal de extracción**, y esta variable se ha estudiado con el **tiempo de sonicación** por estar estas dos variables relacionadas. Así, se estudió el tiempo de sonicación a los dos caudales fijados previamente en el diseño con el objetivo de encontrar la combinación de estas dos variables que proporcione la mejor frecuencia de muestreo. Como

se puede ver en los resultados obtenidos (Figura 40), estos valores son un tiempo de sonicación 3 min y un caudal de 3,5 mL/min.

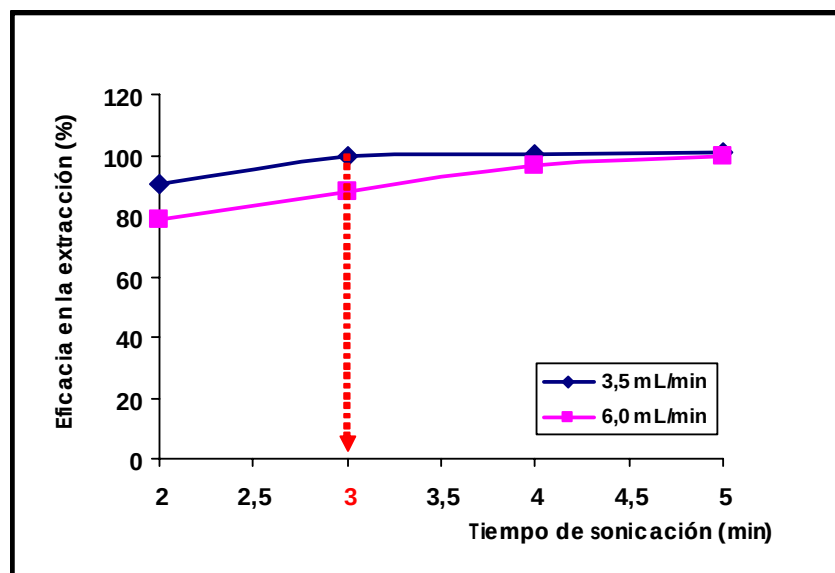


Figura 40. Experimentos realizados para la optimización del tiempo de sonicación a un caudal de extracción de 3,5 mL/min y 6,0 mL/min. $[\text{HNO}_3]=3\text{M}$; $[\text{HCl}]=3\text{M}$; Temperatura de extracción= 20°C ; Volumen de disolución extractante=1mL

En este caso se observa un comportamiento en el caudal de extracción que contrasta con los resultados obtenidos hasta el momento, ya que se obtienen mejores %eficacia en la extracción cuando el caudal es bajo. Esto se explica teniendo en cuenta los siguientes factores: el tipo de matriz de estas muestras, la mayor cantidad de muestra necesaria por la baja concentración de cobre existente (0,0300 g) y al hecho de que la extracción requiere mayor tiempo que en los casos anteriores para ser cuantitativa. Estos factores hacen que, si el caudal es elevado (6 mL/min), la muestra comience a compactarse dentro de la columna tras unos 2 minutos de sonicación. Esta situación hace que se necesite un tiempo mayor para extraer cuantitativamente el metal. Sin embargo, si el caudal es menor, no se genera un moviendo rápido de las partículas de la muestra, lo que hace que no se llegue a compactar en la minicolumna, y de esta manera, el tiempo necesario para que se produzca la extracción cuantitativa del cobre es menor.

Con respecto a las variables estadísticamente significativas, las **concentraciones de los ácidos de la disolución extractante**, éstas tienen

efectos estimados bastante elevados y similares. Sin embargo, con el objetivo es disminuir al máximo esta concentración se ha estudiado la posibilidad de eliminar uno de los componentes de la disolución ácida y/o de disminuir al máximo la concentración de los mismos (Tablas 87 y 88). De los resultados obtenidos se observa que una disolución 3M bien de HNO_3 o de HCl es suficiente para obtener resultados cuantitativos, no siendo necesarios ambos ácidos en la disolución extractante. En los posteriores estudios de la extracción de cobre en muestras de carne se utilizó una disolución de HNO_3 3M simplemente por tomar uno de los valores óptimos, pero no porque se obtengan mejores resultados con respecto al HCl 3M.

Tabla 87. Experimentos realizados para la optimización de la concentración de HNO_3

$[\text{HNO}_3]$ (M) ^a	$[\text{Cu}]$ $\mu\text{g/g}^b$	(%) Eficacia en la extracción
3,0	$31,8 \pm 0,4$	99,5
1,5	$25,3 \pm 0,4$	79,2

a. $[\text{HCl}]=0\text{M}$; Tiempo de sonicación=3 min; Temperatura de extracción= 20°C; Caudal de extracción=3,5 mL/min; Volumen de disolución extractante=1mL

b. $[\text{Cu}]$ = Media $\pm$ desviación estándar (n=3)

Tabla 88. Experimentos realizados para la optimización de la concentración de HCl

$[\text{HCl}]$ (M) ^a	$[\text{Cu}]$ $\mu\text{g/g}^b$	(%) Eficacia en la extracción
3,0	$32,0 \pm 0,7$	100,3
1,5	$25,0 \pm 0,4$	78,4

a. $[\text{HNO}_3]=0\text{M}$; Tiempo de sonicación=3 min; Temperatura de extracción= 20°C; Caudal de extracción=3,5 mL/min; Volumen de disolución extractante=1mL

b. $[\text{Cu}]$ = Media $\pm$ desviación estándar (n=3)

Los valores óptimos para cada variable implicada en la extracción de cobre en las muestras de carne se indican en la Tabla 89.

Tabla 89. Valores óptimos para cada una de las variables implicadas en el proceso de extracción de cobre de las muestras de carne

VARIABLE	VALORES ÓPTIMOS PARA CADA UNA DE LAS VARIABLES
[HNO ₃]	3 M / 0M
[HCl]	0 M / 3M
Tiempo de sonicación	3 min
Temperatura de extracción	20 °C
Caudal de extracción	3,5 mL/min
Volumen de disolución extractante	1mL

- **Experimentos realizados para la optimización de la extracción de cobre en las muestras de Cereales y Derivados**

La extracción de cobre en muestras de cereales y derivados presenta dos variables significativas, los dos componentes de la disolución extractante.

En lo que se refiere a las variables no significativas, el **volumen de disolución extractante** y **temperatura de extracción** se observa en los experimentos 1 y 3 de la matriz del diseño (Tabla 82) que tomando sus valores más bajos establecidos dentro del intervalo estudiado, 1mL y 20°C, respectivamente, los % eficacia en la extracción obtenidos son cuantitativos. Por tanto, éstos serán los valores considerados como óptimos para estas variables.

Las otras dos variables no significativas son el **tiempo de sonicación** y el **caudal de extracción**. Debido a la relación existente entre estas variables, se han estudiado fuera del marco del diseño de modo conjunto con el objetivo de disminuir al máximo el tiempo de análisis (Figura 41). En los resultados obtenidos se observa que con el menor tiempo de análisis (0,5 min) y un caudal de 6mL/min, se consiguen %eficacia en la extracción cuantitativos. Por ello, éstos son los valores establecidos como óptimos para estas dos variables.

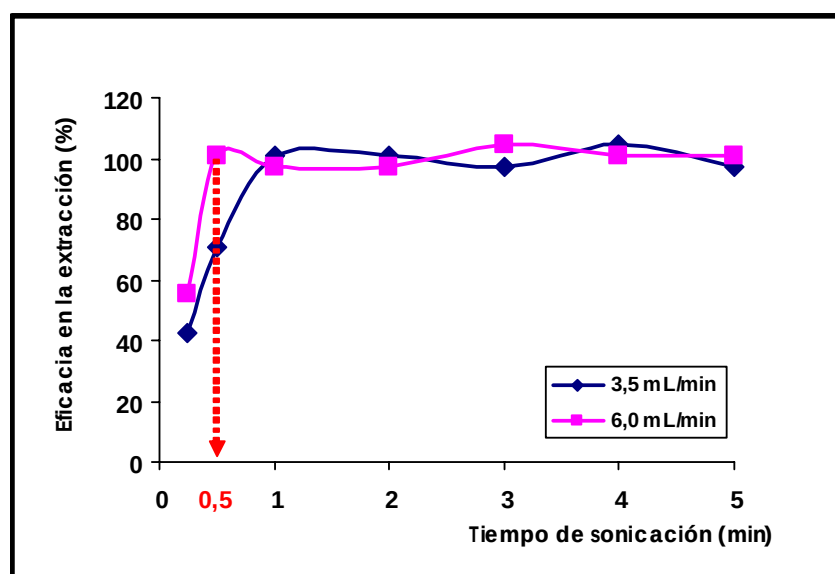


Figura 41. Experimentos realizados para la optimización del tiempo de sonicación a un caudal de extracción de 3,5 mL/min y 6,0 mL/min. $[\text{HNO}_3]=3\text{M}$; $[\text{HCl}]=3\text{M}$; Temperatura de extracción= 20°C ; Volumen de disolución extractante=1mL

Al igual que en los restantes casos, a pesar de que los componentes de la disolución extractante sean las variables significativas en el proceso, se ha estudiado también la posibilidad de eliminar de la misma alguno de los ácidos constituyentes y/o disminuir al máximo sus **concentraciones**. En los estudios realizados (Tablas 90 y 91) se ha observado que la disolución de menor concentración ácida que proporciona un %eficacia en la extracción cuantitativo es una disolución de HNO_3 3M. Menores concentraciones no proporcionan %eficacia en la extracción cuantitativos. Por lo tanto, será esta la disolución extractante considerada como óptima para el proceso.

Tabla 90. Experimentos realizados para la optimización de la concentración de HNO_3

$[\text{HNO}_3]$ (M) ^a	$[\text{Cu}]$ $\mu\text{g/g}$ ^b	(%) Eficacia en la extracción
3,0	$6,4 \pm 0,0$	100,7
1,5	$4,8 \pm 0,4$	74,4

a. $[\text{HCl}]=0\text{M}$; Tiempo de sonicación=0,5 min; Temperatura de extracción= 20°C ; Caudal de extracción=6,0 mL/min; Volumen de disolución extractante=1mL

b. $[\text{Cu}]$ = Media $\pm$ desviación estándar (n=3)

Tabla 91. Experimentos realizados para la optimización de la concentración de HCl

[HCl] (M) ^a	[Cu] µg/g ^b	(%) Eficacia en la extracción
3,0	6,2 ± 0,4	97,0
1,5	4,5 ± 0,4	70,6

a [HNO₃]=0M; Tiempo de sonicación=0,5 min; Temperatura de extracción= 20°C; Caudal de extracción=6,0 mL/min; Volumen de disolución extractante=1mL

b [Cu] = Media ± desviación estándar (n=3)

Los valores, los valores óptimos para cada variable en la extracción de cobre en las muestras de cereales y derivados se indican en la Tabla 92.

Tabla 92. Valores óptimos para cada una de las variables implicadas en el proceso de extracción de cobre de las muestras de cereales y derivados

VARIABLE	VALORES ÓPTIMOS PARA CADA UNA DE LAS VARIABLES
[HNO ₃]	3 M
[HCl]	0 M
Tiempo de sonicación	0,5 min
Temperatura de extracción	20 °C
Caudal de extracción	6,0 mL/min
Volumen de disolución extractante	1mL

- Experimentos realizados para la optimización de la extracción de cobre en las muestras de Frutos Secos**

Para las variables **volumen de disolución extractante** y **temperatura de extracción** (ambas variables no significativas) se observa que se obtienen %eficacia en la extracción cuantitativos cuando estas variables toman el valor mínimo dentro del intervalo de estudio establecido en el diseño como se puede ver en los experimentos 1 y 3 de la matriz de Plackett-Burman (Tabla 82). Así, los valores considerados como óptimos para estas variables son 1mL y 20°C, respectivamente.

En el estudio del **tiempo de sonicación** y del **caudal de extracción** (Figura 42) se observa que los valores óptimos para estas dos variables, ya que con ellos se consigue la frecuencia de muestreo más elevada con un %eficacia en

la extracción cuantitativo, son un tiempo de sonicación de 2 min y un caudal de extracción de 6 mL/min.

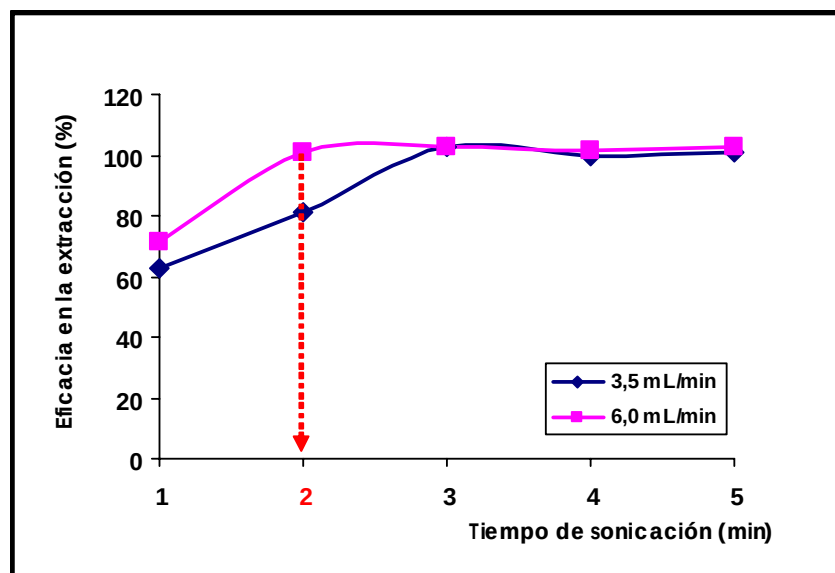


Figura 42. Experimentos realizados para la optimización del tiempo de sonicación a un caudal de extracción de 3,5 mL/min y 6,0 mL/min. $[\text{HNO}_3]=3\text{M}$; $[\text{HCl}]=3\text{M}$; Temperatura de extracción= 20°C ; Volumen de disolución extractante=1mL

Con respecto a las variables significativas, a pesar de su elevado efecto positivo se ha estudiado, como en los restantes casos, la posibilidad de eliminar alguno de los dos ácidos constituyentes de la disolución extractante, así como de disminuir al máximo la **concentración** de los mismos (Tablas 93 y 94). En los resultados obtenidos se observa que se puede eliminar el HCl de la disolución extractante, ya que una disolución de HNO_3 3M es suficiente para extraer cuantitativamente todo el cobre de este tipo de muestras. A su vez, se observa que concentraciones menores de este ácido no proporcionan %eficacia en la extracción cuantitativos, por lo que esta disolución será la considerada como óptima para este proceso.

Tabla 93. Experimentos realizados para la optimización de la concentración de HNO_3

$[\text{HNO}_3]$ (M) ^a	$[\text{Cu}]$ $\mu\text{g/g}$ ^b	(%) Eficacia en la extracción
3	$22,4 \pm 0,4$	100,8
1,5	$16,1 \pm 0,7$	72,6

a. $[\text{HCl}]=0\text{M}$; Tiempo de sonicación=2 min; Temperatura de extracción= 20°C ; Caudal de extracción=6,0 mL/min; Volumen de disolución extractante=1mL

b. $[\text{Cu}]$ = Media $\pm$ desviación estándar (n=3)

Tabla 94. Experimentos realizados para la optimización de la concentración de HCl

[HCl] (M) ^a	[Cu] µg/g ^b	(%) Eficacia en la extracción
3	22,1 ± 0,4	99,7
1,5	14,7 ± 0,7	66,1

a. [HNO₃]=0M; Tiempo de sonicación=2 min; Temperatura de extracción= 20°C; Caudal de extracción=6,0 mL/min; Volumen de disolución extractante=1mL

b. [Cu] = Media ± desviación estándar (S.D.) (n=3)

Los valores óptimos para cada variable en la extracción de cobre en las muestras de frutos secos se muestran en la Tabla 95.

Tabla 95. Valores óptimos para cada una de las variables implicadas en el proceso de extracción de cobre de las muestras de frutos secos

VARIABLE	VALORES ÓPTIMOS PARA CADA UNA DE LAS VARIABLES
[HNO ₃]	3 M
[HCl]	0 M
Tiempo de sonicación	2 min
Temperatura de extracción	20 °C
Caudal de extracción	6,0 mL/min
Volumen de disolución extractante	1mL

- Experimentos realizados para la optimización de la extracción de cobre en las muestras de Legumbres**

La extracción de cobre en muestras de legumbres presenta dos variables significativas: los dos componentes de la disolución extractante.

Los valores óptimos establecidos para las variables **volumen de disolución extractante** y **temperatura de extracción** son, 1mL y 20°C respectivamente, ya que se obtienen %extracción cuantitativos cuando estas dos variables toman el valor mínimo del intervalo establecido en el diseño (experimentos 1 y 3 de la matriz de Plackett-Burman, Tabla 82).

En el estudio de las variables **tiempo de sonicación** y del **caudal de extracción** (Figura 43) se observa que el menor tiempo de extracción para el que se obtiene un %eficacia en la extracción cuantitativo es de 0,5 min a un

caudal de 6mL/min. Como, de este modo, se obtiene la máxima frecuencia de muestreo, éstos son los valores considerados como óptimos para estas dos variables.

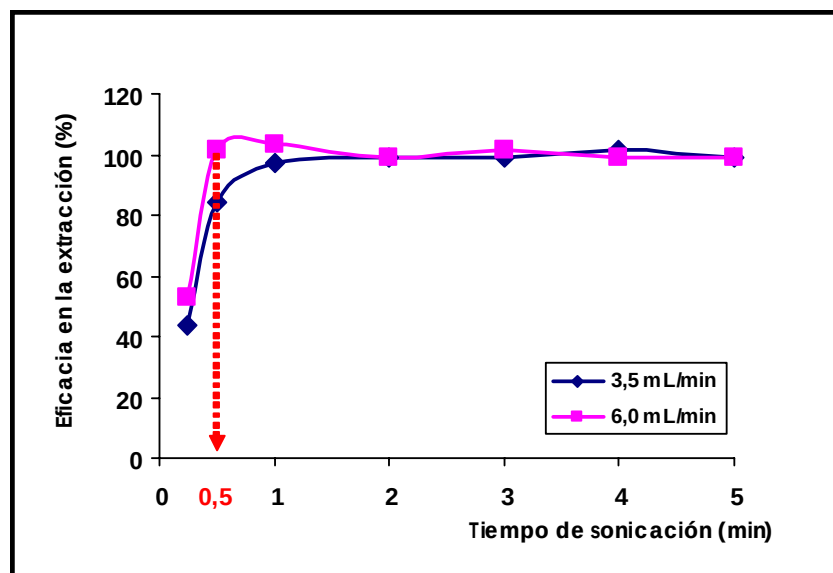


Figura 43. Experimentos realizados para la optimización del tiempo de sonicación a un caudal de extracción de 3,5 mL/min y 6,0 mL/min. $[\text{HNO}_3]=3\text{M}$; $[\text{HCl}]=3\text{M}$; Temperatura de extracción= 20°C ; Volumen de disolución extractante=1mL

Con respecto a las **concentraciones de los ácidos** se estudió, al igual que en los restantes casos, la posibilidad de utilizar sólo uno de los ácidos como disolución extractante y/o disminuir al máximo la concentración del mismo (Tablas 96 y 97). En los resultados obtenidos se observa que una disolución de HNO_3 3M es suficiente para extraer cuantitativamente el cobre de las muestras de legumbres, y por tanto, se puede eliminar el HCl de la disolución extractante. A su vez, se ha observado que concentraciones menores de HNO_3 3M no proporcionan %eficacia en la extracción cuantitativos. Así, la disolución considerada como óptima para la extracción de cobre en legumbres es una disolución de HNO_3 3M.

Tabla 96. Experimentos realizados para la optimización de la concentración de HNO_3

$[\text{HNO}_3]$ (M) ^a	$[\text{Cu}]$ $\mu\text{g/g}^b$	(%)Eficacia en la extracción
3	$11,5 \pm 0,4$	101,4
1,5	$9,1 \pm 0,4$	80,3

a. $[\text{HCl}]=0\text{M}$; Tiempo de sonicación=0,5 min; Temperatura de extracción= 20°C ; Caudal de extracción=6,0 mL/min; Volumen de disolución extractante=1mL

b. $[\text{Cu}]$ = Media $\pm$ desviación estándar (n=3)

Tabla 97. Experimentos realizados para la optimización de la concentración de HCl

$[\text{HCl}]$ (M) ^a	$[\text{Cu}]$ $\mu\text{g/g}^b$	(%) Eficacia en la extracción
3	$10,6 \pm 0,4$	93,0
1,5	$8,2 \pm 0,7$	71,9

a. $[\text{HNO}_3]=0\text{M}$; Tiempo de sonicación=0,5 min; Temperatura de extracción= 20°C ; Caudal de extracción=6,0 mL/min; Volumen de disolución extractante=1mL

b. $[\text{Cu}]$ = Media $\pm$ desviación estándar (n=3)

Los valores óptimos para cada variable implicada en la extracción de cobre en las muestras de legumbres se indican en la Tabla 98.

Tabla 98. Valores óptimos para cada una de las variables implicadas en el proceso de extracción de cobre de las muestras de legumbres

VARIABLE	VALORES ÓPTIMOS PARA CADA UNA DE LAS VARIABLES
$[\text{HNO}_3]$	3M
$[\text{HCl}]$	0 M
Tiempo de sonicación	0,5 min
Temperatura de extracción	20°C
Caudal de extracción	6,0 mL/min
Volumen de disolución extractante	1mL

- Experimentos realizados para la optimización de la extracción de cobre en las muestras de Verduras, Hortalizas y Frutas**

La extracción de cobre en las muestras de verduras, hortalizas y frutas está afectada significativamente por la concentración de HNO_3 y el tiempo de sonicación. En este caso la concentración de HCl no llega a ser una variable

significativa, como ha ocurrido en las demás extracciones de cobre estudiadas, pero sí presenta un efecto estimado elevado y positivo.

Comenzando el estudio por las variables que parecían no tener tanta influencia en la extracción se observa que un **volumen de disolución extractante** de 1 mL y una **temperatura de extracción** de 20°C, proporcionan %eficacia en la extracción cuantitativos (experimentos 1 y 3 de la matriz de Plackett-Burman, Tabla 82). Debido a esto, y a que minimizando los valores de estas dos variables se mejoran las características del sistema, son estos dos los valores considerados como óptimos para estas dos variables.

El **caudal de extracción** es otra variable no significativa, pero esta variable se ha estudiado, como se ha venido haciendo hasta el momento, con el **tiempo de sonicación**, debido a la relación existente entre ambas. A pesar de que esta última variable sea significativa, los experimentos realizados demuestran que 1 min a un caudal de 6mL/min, es tiempo suficiente para extraer cuantitativamente el cobre de este tipo de muestras (Figura 44). Por tanto, como el objetivo es que el tiempo de análisis sea el menor posible, éstos serán los valores considerados como óptimos para estas dos variables.

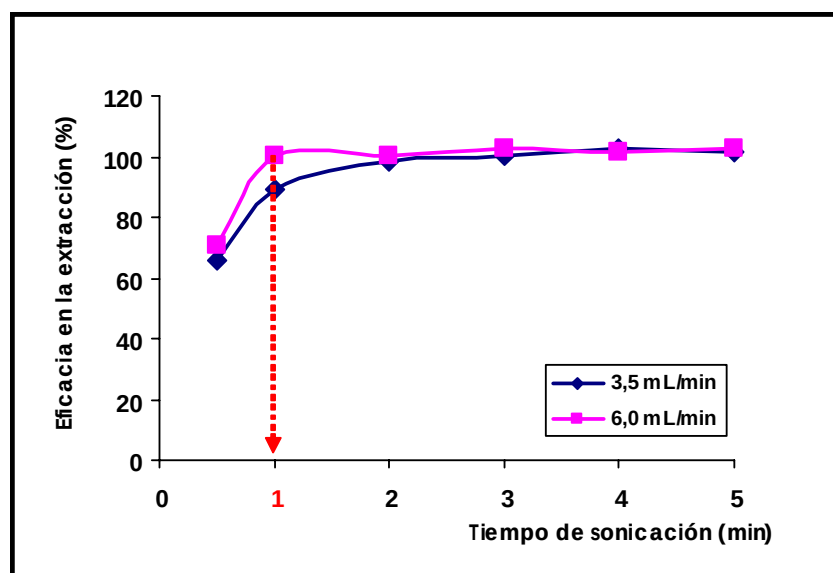


Figura 44. Experimentos realizados para la optimización del tiempo de sonicación a un caudal de extracción de 3,5 mL/min y 6,0 mL/min. $[\text{HNO}_3]=3\text{M}$; $[\text{HCl}]=3\text{M}$; Temperatura de extracción= 20°C; Volumen de disolución extractante=1mL

Con respecto a las concentraciones de los **ácidos constituyentes de la disolución extractante**, debido a que el HCl no es una variable significativa se estudió la posibilidad de eliminarlo de la disolución extractante, ya que el objetivo es minimizar al máximo la concentración ácida de la misma. Se observa que si se elimina de la disolución extractante este ácido (utilizando como disolución extractante HNO₃ 3M) se obtienen eficacias en la extracción cuantitativas (Tabla 99).

Tabla 99. Experimentos realizados para la optimización de la concentración de HCl

[HCl] (M) ^a	[Cu] µg/g ^b	(%) Eficacia en la extracción
3,0	17,3 ± 0,4	100,1
1,5	17,6 ± 0,7	101,5
0	17,3 ± 0,4	100,1

a. [HNO₃]=3M; Tiempo de sonicación=1min; Temperatura de extracción= 20°C; Caudal de extracción=6,0 mL/min; Volumen de disolución extractante=1mL

b. [Cu] = Media ± desviación estándar (n=3)

Una vez eliminado el HCl de la disolución extractante, se ha estudiado la posibilidad de disminuir la concentración de HNO₃. Como se observa en la Tabla 100 una concentración de HNO₃ menor de 3M no proporciona %eficacia en la extracción cuantitativos, con lo que éste será el valor considerado como óptimo para esta variable.

Tabla 100. Experimentos realizados para la optimización de la concentración de HNO₃

[HNO ₃] (M) ^a	[Cu] µg/g ^b	(%) Eficacia en la extracción
3	17,3 ± 0,4	100,1
1,5	12,5 ± 0,7	72,3

a. [HCl]=0M; Tiempo de sonicación=1 min; Temperatura de extracción= 20°C; Caudal de extracción=6,0 mL/min; Volumen de disolución extractante=1mL

b. [Cu] = Media ± desviación estándar (n=3)

Los valores óptimos para cada variable en la extracción de cobre en las muestras de verduras, hortalizas y frutas se indican en la Tabla 101.

Tabla 101. Valores óptimos para cada una de las variables implicadas en el proceso de extracción de cobre de las muestras de verduras, hortalizas y frutas

VARIABLE	VALORES ÓPTIMOS PARA CADA UNA DE LAS VARIABLES
[HNO ₃]	3M
[HCl]	0 M
Tiempo de sonicación	1 min
Temperatura de extracción	20 °C
Caudal de extracción	6,0 mL/min
Volumen de disolución extractante	1mL

En la Tabla 102 se muestra un resumen de los valores óptimos para cada una de las variables implicadas en el proceso de extracción de cobre en los diferentes tipos de muestras de alimentos.

Tabla 102. Valores óptimos para cada una de las variables implicadas en el proceso de extracción de cobre de los diferentes tipos de muestras alimenticias

Variables	VALORES ÓPTIMOS PARA CADA UNA DE LAS VARIABLES IMPLICADAS EN LA EXTRACCIÓN DE COBRE EN LOS DIFERENTES TIPOS DE MUESTRAS ALIMENTICIAS					
	Moluscos y pescados	Carnes	Cereales y derivados	Frutos secos	Legumbres	Verduras, hortalizas y frutas
A (M)	3	3 / 0	3	3	3	3
B (M)	0	0/ 3	0	0	0	0
C (min)	1	3	0,5	2	0,5	1
D (°C)	20	20	20	20	20	20
E (mL/min)	6,0	3,5	6,0	6,0	6,0	6,0
F (mL)	1	1	1	1	1	1

A, [HNO₃]; B, [HCl]; C, Tiempo sonicación; D, Temperatura de extracción; E, Caudal de extracción; F, Volumen de disolución extractante.

Teniendo en cuenta los valores óptimos obtenidos para la extracción de cobre de los diferentes tipos de muestras, se observa que en este proceso se puede eliminar de la disolución extractante el HCl, y es necesaria una concentración 3M de HNO₃ para obtener %eficacia en la extracción cuantitativos. En el caso de las muestras de carne, ambos ácidos poseen el mismo poder extractante, y, por tanto, la disolución extractante óptima puede

ser HNO_3 3M, pero también se obtienen %eficacia en la extracción cuantitativos si esta disolución extractante es HCl 3M.

En cuanto al tiempo de extracción se observa que las muestras que necesitan mayor tiempo de extracción son las muestras de carne y de frutos secos, ya que necesitan 3 y 2 min, respectivamente. Los moluscos y pescados y verduras, hortalizas y frutas necesitan 1 min para este proceso. En los demás casos 0,5 min son suficientes para obtener eficacias en la extracción cuantitativas. En la comparación de tiempos de extracción hay que tener en cuenta los caudales óptimos y se observa que en todos los casos los caudales óptimos son de 6 mL/min, excepto en el caso de las muestras de carne. Como ya se ha indicado antes, esto se explica teniendo en cuenta el tipo de matriz de las muestras de carne, la cantidad de muestra necesaria debido a la baja concentración de cobre existente (0,0300 g) y al hecho de que la extracción requiere mayor tiempo que en los casos anteriores. Estos factores hacen que, si el caudal es elevado (6 mL/min), la muestra comience a compactarse dentro de la columna tras unos 2 minutos de sonicación y necesite mayor tiempo para extraer cuantitativamente el metal. Sin embargo, si el caudal es menor, no se genera el moviendo rápido de las partículas de la muestra en la minicolumna, por lo que la muestra no llega a compactarse, y por tanto, los resultados en la extracción son mejores en menor tiempo. Sin embargo, si se compara esta matriz con los frutos secos, ya que es la matriz más similar debido a que tiene bastante grasa, también se necesitan 0,0300 g de muestra debido a la baja concentración de cobre existente y necesita mayor tiempo de sonicación para obtener resultados satisfactorios, no se observa este comportamiento, ya que la muestra no se compacta dentro de la columna a caudales elevados. Así, para este último caso se obtienen %eficacia en la extracción cuantitativos a un caudal de 6 mL/min y a tiempos menores.

Con respecto a la temperatura y al volumen de disolución se observa que para todos los tipos de muestras se lleva a cabo la extracción óptima a temperatura ambiente y utilizando 1 mL de disolución extractante.

4.1.3.1 Estudio de la cantidad de muestra

En las optimizaciones realizadas se han utilizado 0,0300 g de muestra para todos los tipos de muestras, debido a las bajas concentraciones de cobre presentes en las mismas, excepto en el caso de los moluscos y pescados donde se han utilizado 0,0100 g, ya que la concentración de cobre presente en el material de referencia utilizado es muy superior. Así, sólo se ha podido realizar el estudio de la cantidad de muestra para este tipo de matrices. En el caso de las matrices restantes, no se han podido estudiar mayores cantidades de muestra ya que cantidades de muestra mayores que 0,0300 g provocan presiones elevadas en el sistema FIA que hacen inviables los análisis. Estudiar menores cantidades de muestra no implica ninguna mejoría en la determinación porque se obtendrían resultados de menor sensibilidad analítica y para poderlos cuantificar, sería necesario realizar adiciones del metal en el extracto de la muestra. De hecho, en la optimización de las variables para las muestras de cereales y derivados, en las que se utilizaron 0,0300 g, ya se tuvieron que realizar adiciones de $1\mu\text{g/mL}$ para poder cuantificar el cobre existente en las muestras.

Para estudiar la cantidad de muestra en los moluscos y derivados se ha tenido que utilizar una muestra con menor concentración en cobre que la presente en el material de referencia, pues si se utilizase este material no se podrían analizar mayores cantidades de muestra, ya que las señales saldrían del intervalo lineal para este metal ($0,1\text{-}5,5\ \mu\text{g/mL}$). En este estudio se ha realizado una muestra de mejillón cuya concentración en cobre es de $13,6 \pm 0,7\ \mu\text{g/g}$ (determinada por triplicado utilizando el método de referencia, pág. 86). Se ha estudiado la posibilidad de utilizar 0,0200 y 0,0300 g de muestra, y se ha observado que, manteniendo los valores óptimos establecidos para cada una de las variables, se obtienen %eficacia en la extracción cuantitativos, 103,5 % y 100,9 % respectivamente. Así, para los moluscos y pescados se pueden utilizar desde 0,0100 hasta 0,0300 g de muestra en función de la concentración de cobre presente en las mismas.

4.1.3.2 Estudio de la influencia del tamaño de partícula de la muestra

Todos los estudios descritos anteriormente se han realizado con un diámetro de partícula menor de 30 μm . Para ver la influencia del tamaño de partícula en la extracción del cobre se han tomado diferentes porciones de una misma muestra (para cada tipo de matriz) con diferentes tamaños de partícula: diámetro menor de 30 μm y de diámetro comprendido entre 30-100 μm .

Para llevar a cabo este estudio no se han podido utilizar las muestras utilizadas en la optimización, excepto en los casos de los frutos secos y las legumbres (Tabla 81), porque las muestras utilizadas en dichas optimizaciones son materiales de referencia y, por tanto, es imposible realizar estudios de tamaño de partícula ya que éste es uniforme. Las muestras analizadas en cada caso se indican en la Tabla 103.

Con las porciones de diferente diámetro de cada muestra se ha realizado por una parte el análisis siguiendo el método de referencia descrito previamente (pág. 86) y por otra el análisis continuo de las mismas utilizando las metodologías propuestas, y se compararon los resultados obtenidos. Las eficacias en la extracción se indican en la Tabla 103. De los resultados obtenidos se deduce que el tamaño de partícula no influye en la determinación de cobre con el sistema propuesto. Esto simplifica mucho el análisis, ya que no hay que someter la muestra a ningún tratamiento previo que garantice un cierto tamaño de partícula.

Tabla 103. Experimentos realizados en porciones de muestras con diferente tamaño de partícula para todos los tipos de muestras estudiados utilizando el método de referencia y las metodologías continuas propuestas. Se indica además la eficacia en la extracción del sistema FIA

Tipo de muestra	Muestra analizada	Tamaño de partícula	[Cu] obtenida mediante el método de referencia (µg/g)	[Cu] obtenida mediante los métodos continuos propuestos (µg/g)	(%)Eficacia en la extracción
Moluscos y pescados	Mejillón	<30µm	13,6 ± 0,7	14,0 ± 0,0	102,6
		30-100 µm	11,6 ± 0,7	11,6 ± 0,4	99,5
Carnes	Riñones de cordero	<30µm	14,5 ± 0,4	14,7 ± 0,0	101,4
		30-100 µm	14,9 ± 0,7	14,9 ± 0,4	100,0
Cereales y derivados	Cereales con cacao	<30µm	11,6 ± 1,0	11,7 ± 0,4	101,3
		30-100 µm	11,8 ± 1,3	12,0 ± 0,4	101,4
Frutos secos	Nueces	<30µm	22,2 ± 0,7	22,1 ± 0,4	99,7
		30-100 µm	22,6 ± 1,0	22,8 ± 0,4	100,9
Legumbres	Habas	<30µm	11,4 ± 1,0	11,6 ± 0,4	101,4
		30-100 µm	11,4 ± 1,0	11,3 ± 0,4	99,3
Verduras, hortalizas y frutas	Lechuga	<30µm	10,9 ± 0,7	11,3 ± 0,4	103,3
		30-100 µm	11,2 ± 0,8	11,3 ± 0,4	101,3

4.1.4 Extracción de hierro

Para optimizar el proceso se ha utilizado un diseño factorial de Plackett-Burman $2^6 \cdot 3/16$ de resolución tipo IV con 6 grados de libertad y un punto central. Las variables que afectan a la extracción de hierro, así como los valores máximos y mínimos, no difieren de los casos anteriores, ya que el objetivo es conocer el comportamiento de las mismas en los mismos intervalos de estudio (Tabla 57, pág. 141).

Una vez obtenida la matriz del diseño (Tabla 27), se realizaron los experimentos fijados por la misma. Para realizar estos experimentos sobre las diferentes matrices, se han utilizado materiales de referencia, en los casos en los que se certificaba la concentración de hierro y, en los otros casos, se han utilizado muestras en las previamente se había determinado por triplicado su concentración de hierro utilizando el método de referencia descrito en la página 86 (Tabla 104). La cantidad de material de referencia o muestra utilizada para llevar a cabo la optimización del proceso se ha fijado en función de la concentración de hierro presente.

Tabla 104. Muestras y materiales de referencia utilizados en la optimización del procedimiento FIA, concentración de hierro presente en dichas muestras y cantidad utilizada en la optimización

Tipo de matriz	Muestra con la que se realiza la optimización	[Fe]($\mu\text{g/g}$)	Cantidad de muestra (g, peso seco)
Moluscos y pescados	NRCC-Tort 1 ^a	186 ± 11	0,0100
Carnes	Riñón de cerdo BCR-186 ^b	299 ± 10	0,0100
Cereales y derivados	Harina integral BCR-189 ^b	$68,3 \pm 1,9$	0,0300
Frutos secos	Pistachos	$41,7 \pm 1,2$	0,0300
Legumbres	Habas	$51,8 \pm 2,1$	0,0300
Verduras, hortalizas y frutas	Te NCS ^c DC 73351	264 ± 10	0,0100

a. NRCC: Nacional Research Council of Canada

b. BCR: Community Bureau of Reference

c. NCS: China National Analysis Center for Iron and Steel

La matriz del diseño de Plackett-Burman con los valores que toma cada variable en cada experimento y el %eficacia en la extracción obtenido en

cada caso se muestran en la Tabla 105. Los experimentos se han realizado por duplicado, por lo que la eficacia de la extracción indicada es la media obtenida de los dos experimentos.

Una vez realizados los experimentos, se procedió al análisis de los datos proporcionados por el diseño. Es necesario conocer que variables son significativas y como afectan al proceso de extracción y, para ello, se recurre a las **Cartas Pareto estandarizadas** para cada tipo de muestra (Figura 45).

Tabla 105. Matriz del diseño de Plackett-Burman con los valores de cada variable en cada experimento, con el %eficacia en la extracción de hierro obtenidas en cada uno de ellos para cada tipo de muestra

						% Eficacia en la extracción					
A	B	C	D	E	F	Moluscos y pescados	Carnes	Cereales y derivados	Frutos secos	Legumbres	Verduras, hortalizas y frutas
3	0	5	20	3,5	1	96,1	74,3	101,5	100,2	100,0	99,3
3	3	0,5	70	3,5	1	69,2	66,5	72,2	78,9	44,1	71,5
0	3	5	20	6	1	88,9	73,2	99,1	100,2	93,5	98,1
3	0	5	70	3,5	3	83,6	78,8	99,2	100,3	100,1	100,7
3	3	0,5	70	6	1	65,6	63,1	69,7	76,2	44,1	70,2
3	3	5	20	6	3	99,8	102,3	99,2	92,3	100,1	96,9
1,5	1,5	2,75	45	4,75	1,5	84,5	81,6	100,4	104,3	101,1	100,0
0	3	5	70	3,5	3	83,6	75,5	91,9	92,3	93,6	89,3
0	0	5	70	6	1	13,5	9,5	0,0	0,0	0,0	0,0
0	0	0,5	70	6	3	8,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
3	0	0,5	20	6	3	67,5	58,7	47,8	76,3	48,5	47,5
0	3	0,5	20	3,5	3	62,1	55,4	33,2	68,3	42,1	32,3
0	0	0,5	20	3,5	1	6,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

A, [HNO₃]; B, [HCl]; C, Tiempo sonicación; D, Temperatura de extracción; E, Caudal de extracción; F, Volumen de disolución extractante.

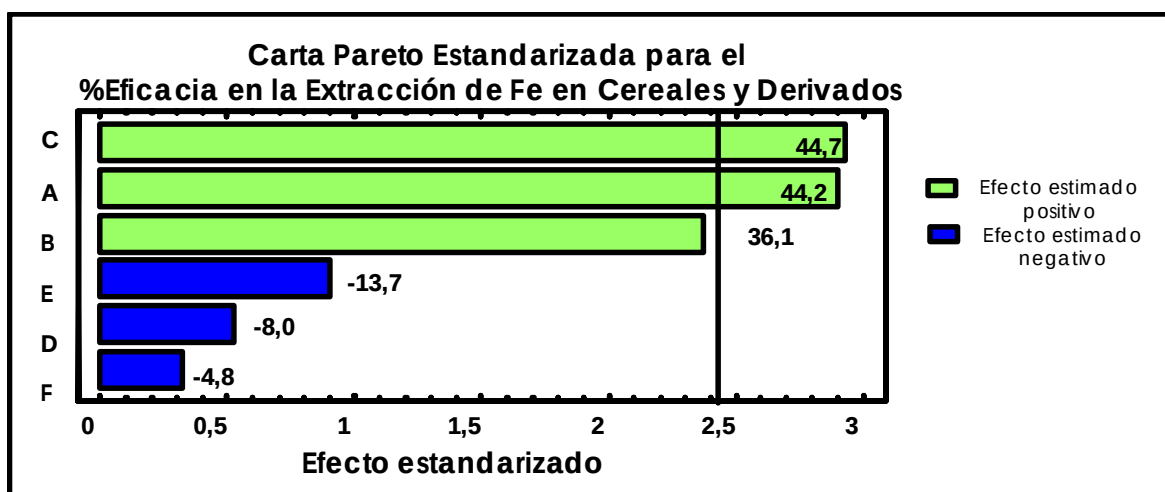
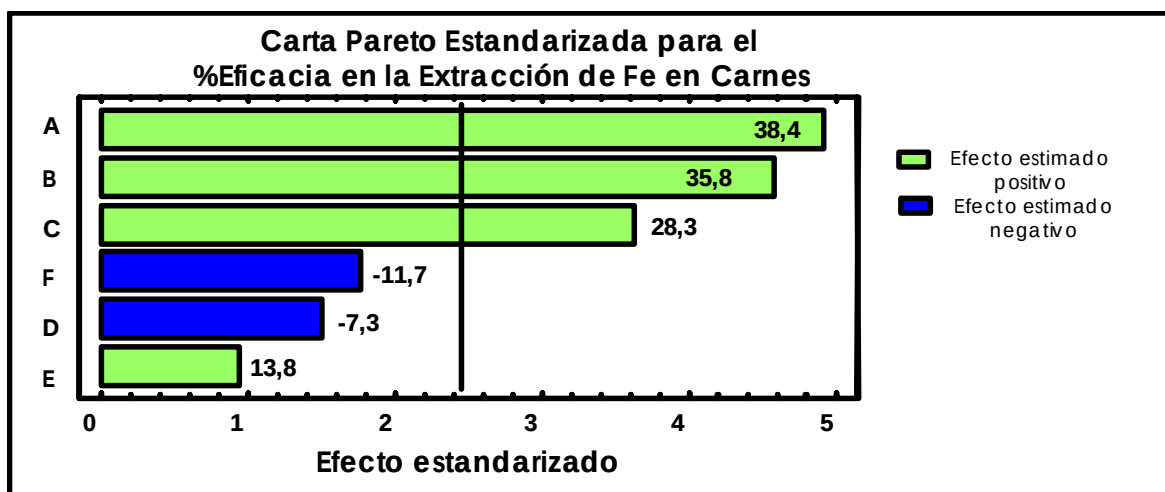
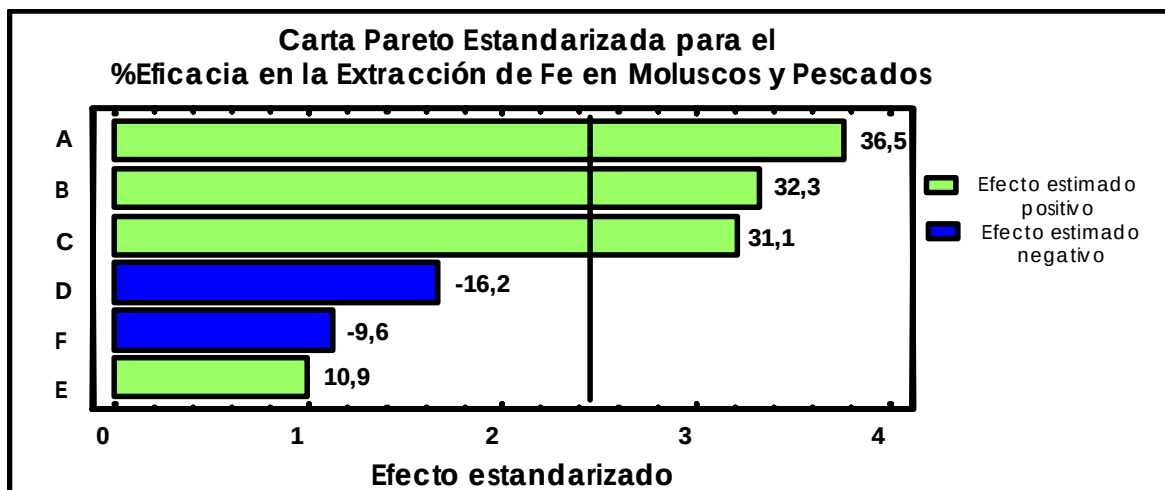


Figura 45. Carta Pareto estandarizada de los efectos principales estandarizados en el diseño factorial; la flecha vertical indica el límite de significación estadística para los efectos. A, $[HNO_3]$; B, $[HCl]$; C, Tiempo sonicación; D, Temperatura de extracción; E, Caudal de extracción; F, Volumen de disolución extractante.

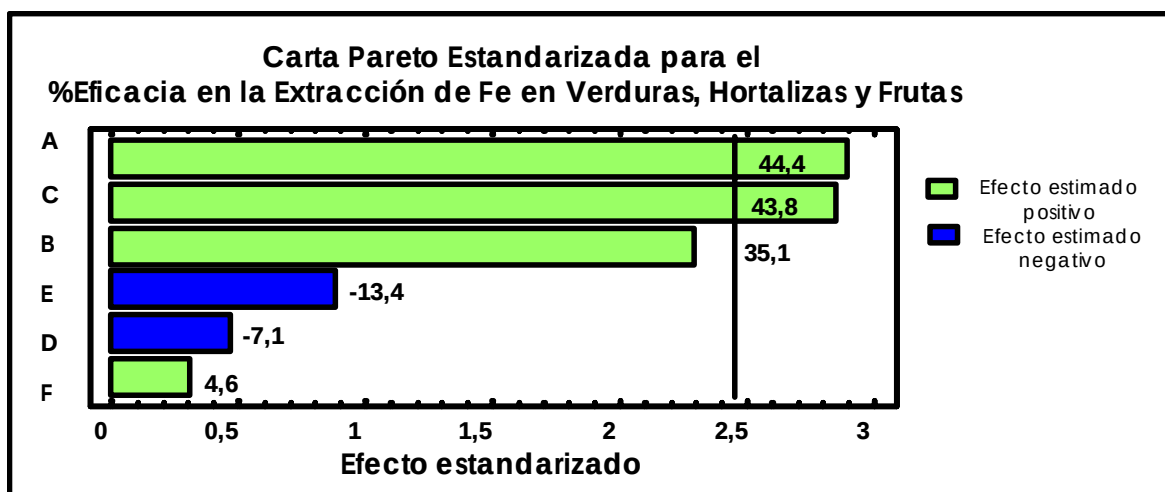
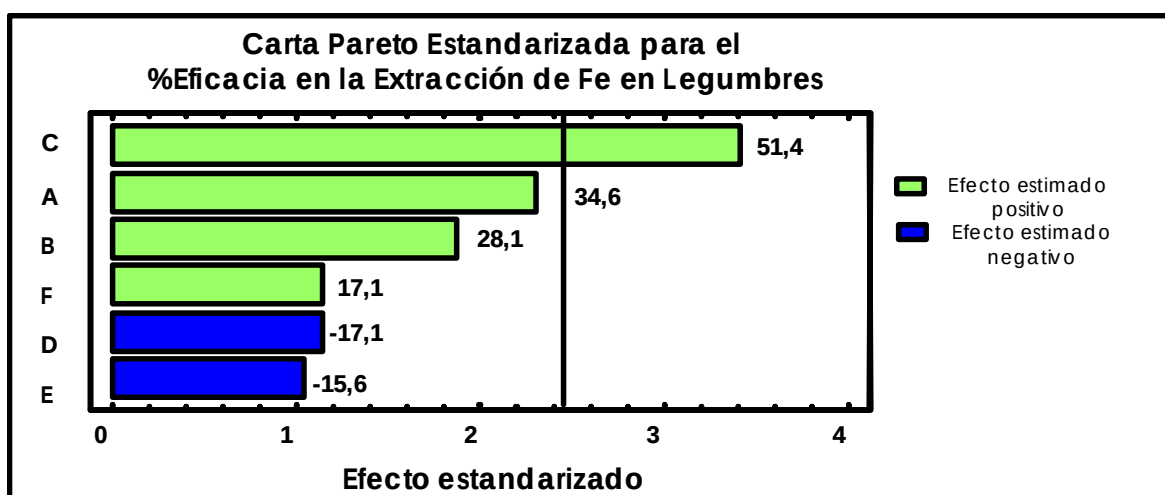
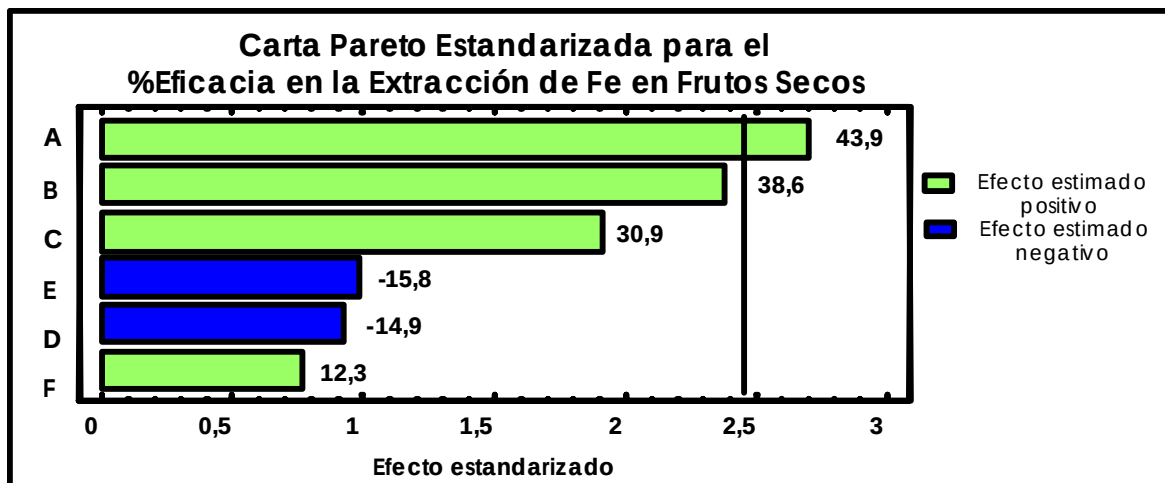


Figura 45 (continuación). Carta Pareto estandarizada de los efectos principales estandarizados en el diseño factorial; la flecha vertical indica el límite de significación estadística para los efectos. A, $[\text{HNO}_3]$; B, $[\text{HCl}]$; C, Tiempo sonicación; D, Temperatura de extracción; E, Caudal de extracción; F, Volumen de disolución extractante.

- **Análisis de los resultados obtenidos con el diseño factorial**

En los resultados obtenidos al aplicar el diseño de Plackett-Burman a la extracción de hierro en los diferentes tipos de muestras, se observa que las variables de mayor influencia en el proceso son las concentraciones de los ácidos constituyentes de la disolución extractante y el tiempo de sonicación. Aunque, como se observa en las Cartas Pareto proporcionadas por el diseño (Figura 45), estas tres variables no son significativas en todos los casos. En el caso de las muestras de moluscos y pescados y las muestras de carnes, las variables estadísticamente significativas son las concentraciones de estos ácidos y el tiempo de sonicación, mientras que para los cereales y derivados y las verduras, hortalizas y frutas estas variables son la concentración de HNO_3 y el tiempo de sonicación. En los casos de las muestras de frutos secos y legumbres sólo es significativa una de estas variables en cada caso, que son la concentración de HNO_3 y el tiempo de sonicación, respectivamente. En la Figura 46 se muestran las superficies de respuesta para las variables de mayor influencia estadística en cada caso, donde se observa como varía el %eficacia en la extracción del hierro en función de los valores que toman estas variables (manteniendo las demás variables en el valor intermedio del intervalo de estudio propuesto para el diseño).

Las demás variables no superan el nivel de significación establecido por el método para un 95% de confianza (representado por la línea vertical). Dentro de estas variables no significativas, se observa que la temperatura tiene un efecto estimado negativo en todos los casos. El caudal de extracción presenta un efecto estimado positivo en el caso de las muestras de moluscos y pescados y de carne, y, en el caso de los cereales y derivados, las legumbres y las verduras, hortalizas y frutas este efecto estimado es de signo negativo. Con respecto al volumen de disolución extractante, esta variable presenta un efecto negativo en el caso de los moluscos y pescados, carnes y de cereales y derivados. En las muestras de legumbres y verduras, hortalizas y frutas esta variable presenta un efecto positivo en la extracción.

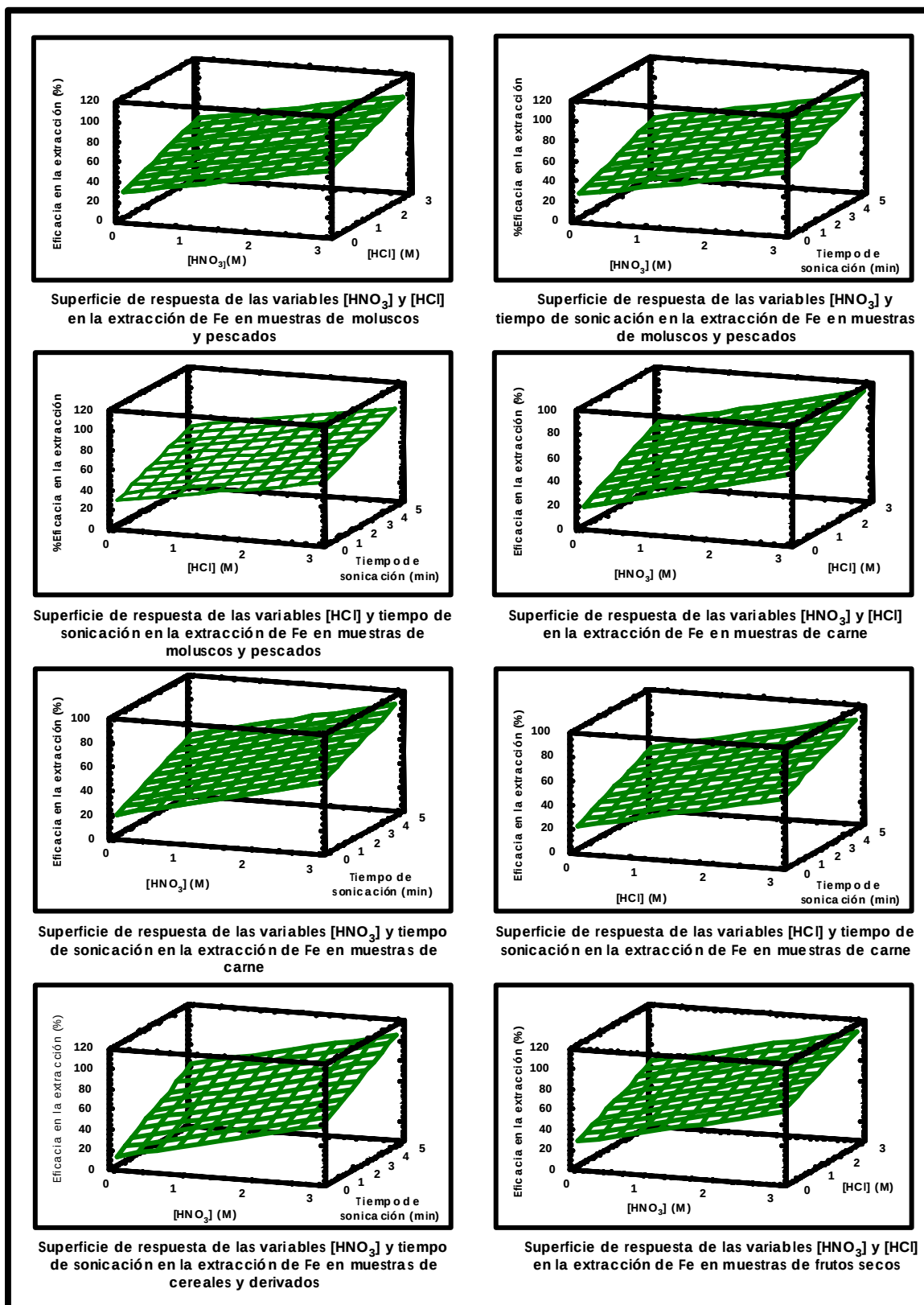


Figura 46. Superficies de respuesta proporcionadas por el diseño de Plackett-Burman para las variables de mayor peso estadístico en la determinación de hierro en todos los tipos de muestra estudiados (las demás variables toman el valor medio del intervalo de estudio establecido en el diseño)

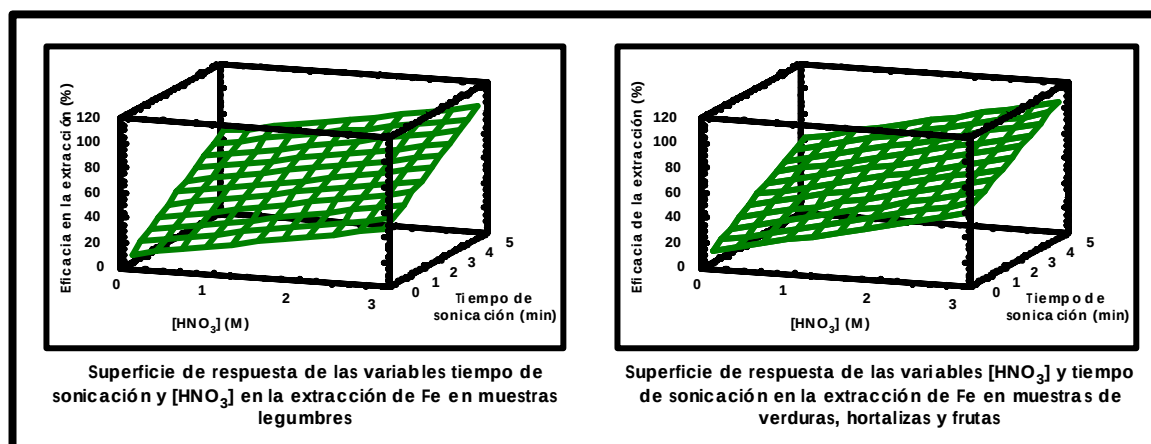


Figura 46 (continuación). Superficies de respuesta proporcionadas por el diseño de Plackett-Burman para las variables de mayor peso estadístico en la determinación de hierro en todos los tipos de muestra estudiados (las demás variables toman el valor medio del intervalo de estudio establecido en el diseño)

Una vez analizados los resultados obtenidos al aplicar el diseño de Plackett-Burman, los valores establecidos como óptimo según el diseño factorial de Screening para cada una de las variables son los recogidos en la Tabla 106.

Tabla 106. Valores óptimos para cada una de las variables implicadas en el proceso de extracción de hierro de los diferentes tipos de muestras según el diseño de Plackett-Burman

Variables	VALORES ÓPTIMOS PARA CADA UNA DE LAS VARIABLES SEGÚN EL DISEÑO DE PLACKETT-BURMAN					
	Moluscos y pescados	Carnes	Cereales y derivados	Frutos secos	Legumbres	Verduras, hortalizas y frutas
A (M)	3	3	3	3	3	3
B (M)	3	3	3	3	3	3
C (min)	5	5	5	5	5	5
D (°C)	20	20	20	20	20	20
E (mL/min)	6,0	6,0	3,5	3,5	3,5	3,5
F (mL)	1	1	1	3	3	3

A, $[HNO_3]$; B, $[HCl]$; C, Tiempo sonicación; D, Temperatura de extracción; E, Caudal de extracción; F, Volumen de disolución extractante

Como el diseño de Plackett-Burman proporciona las tendencias de cada una de ellas hacia el óptimo, y no el valor óptimo en sí mismo, se realizaron una serie de experimentos fuera del marco del diseño, de acuerdo con los resultados obtenidos por el mismo, para determinar los valores óptimos de cada una de las variables que afectan a la extracción de hierro en los diferentes tipos de muestras objeto de estudio.

- **Experimentos realizados fuera del marco del diseño**

- **Experimentos realizados para la optimización de la extracción de hierro en las muestras de Moluscos y Pescados**

En el estudio de las Cartas Pareto (Figura 45), se ha observado que la extracción de hierro en muestras de moluscos y pescados está afectada significativamente por las concentraciones de los ácidos que forman la disolución extractante y por el tiempo de sonicación.

En este estudio se optimizaron primero aquellas variables parecían afectar en menor grado al proceso de extracción. Dentro de estas no significativas se encuentran la **temperatura de la extracción** y el **volumen de la disolución extractante** con un efecto estimado negativo. El valor óptimo considerado para estas variables es el más bajo del intervalo de estudio establecido en el diseño, ya que en el experimentos 1 de la matriz de Plackett-Burman (Tabla 105) se observa que a una temperatura de 20°C y que con un volumen de disolución extractante de 1 mL se obtienen %eficacias en la extracción cuantitativos (96,1%). Además, al considerar estos valores como óptimos se obtiene una sensibilidad mayor y se elimina la utilización de ácidos a elevada temperatura.

El **caudal de extracción** es la otra variable no significativa del proceso, pero ésta presenta un efecto positivo en la extracción. Esta variable se ha optimizado con al **tiempo de sonicación**, variable significativa en este caso, debido a la relación existente entre las mismas (Figura 47). En los resultados obtenidos, se observa que el menor tiempo de extracción necesario para obtener %eficacia en la extracción cuantitativos es de 3 min a un caudal de 6

mL/min. Dado que el objetivo es que el tiempo de análisis sea el mínimo, estos son los valores considerados como óptimos para estas dos variables.

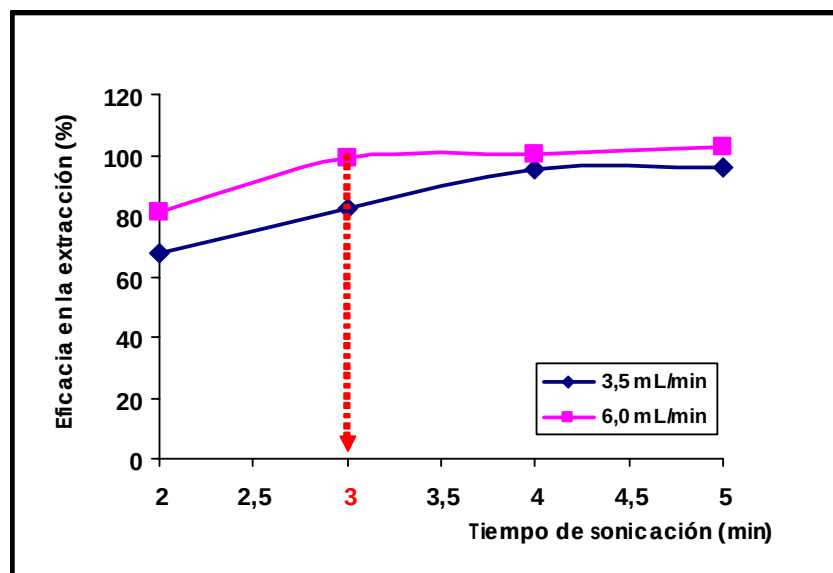


Figura 47. Experimentos realizados para la optimización del tiempo de sonicación a un caudal de extracción de 3,5 mL/min y 6,0 mL/min. $[\text{HNO}_3]=3\text{M}$; $[\text{HCl}]=3\text{M}$; Temperatura de extracción= 20°C ; Volumen de disolución extractante=1mL

En lo que respecta a los componentes de la disolución extractante, variables significativas del proceso, se observa que las **concentraciones de ambos ácidos** tienen efectos estimados similares y elevados. Como el objetivo es disminuir al máximo la concentración ácida necesaria para obtener % extracción cuantitativos, se ha estudiado la posibilidad de eliminar uno de los componentes de la disolución ácida y/o disminuir al máximo estas concentraciones (Tablas 107 y 108). De los resultados obtenidos, se concluye que no es necesaria la presencia de ambos ácidos en la disolución extractante. Si se elimina de la disolución extractante el HCl, se ha comprobado que la mínima concentración de HNO_3 necesaria para tener %extracción cuantitativos es de 3M. Por otra parte, si se elimina el HNO_3 , una concentración de HCl 3M proporciona un %eficacia en la extracción del 91,3%. Como el objetivo es utilizar la mínima concentración ácida, se ha eliminado el HCl de la disolución extractante y se ha considerado como disolución extractante óptima una disolución de HNO_3 3M.

Tabla 107. Experimentos realizados para la optimización de la concentración de HNO_3

$[\text{HNO}_3]$ (M) ^a	$[\text{Fe}]$ $\mu\text{g/g}^b$	(%) Eficacia en la extracción
3,0	184 ± 2	99,1
1,5	129 ± 3	69,2

a. $[\text{HCl}]=0\text{M}$; Tiempo de sonicación=3,0 min; Temperatura de extracción= 20°C; Caudal de extracción=6,0 mL/min; Volumen de disolución extractante=1mL

b. $[\text{Fe}]$ = Media $\pm$ desviación estándar (n=3)

Tabla 108. Experimentos realizados para la optimización de la concentración de HCl

$[\text{HCl}]$ (M) ^a	$[\text{Fe}]$ $\mu\text{g/g}^b$	(%) Eficacia en la extracción
3	170 ± 2	91,3
1,5	113 ± 2	60,8

a. $[\text{HNO}_3]=0\text{M}$; Tiempo de sonicación=3,0 min; Temperatura de extracción= 20°C; Caudal de extracción=6,0 mL/min; Volumen de disolución extractante=1mL

b. $[\text{Fe}]$ = Media $\pm$ desviación estándar (n=3)

Los valores óptimos para cada variable implicada en la extracción de hierro en las muestras de moluscos y pescados se indican en la Tabla 109.

Tabla 109. Valores óptimos para cada una de las variables implicadas en el proceso de extracción de hierro de las muestras de moluscos y pescados

VARIABLE	VALORES ÓPTIMOS PARA CADA UNA DE LAS VARIABLES
$[\text{HNO}_3]$	3 M
$[\text{HCl}]$	0 M
Tiempo de sonicación	3 min
Temperatura de extracción	20 °C
Caudal de extracción	6,0 mL/min
Volumen de disolución extractante	1mL

- Experimentos realizados para la optimización de la extracción de hierro en muestras de Carne**

Las variables significativas en la extracción de hierro en muestras de carne son la concentración de los ácidos constituyentes de la disolución extractante y el tiempo de sonicación.

Con respecto a las variables no significativas, el **volumen de disolución extractante** y la **temperatura de extracción** presentan un efecto estimado negativo. En este caso, para completar el estudio de estas variables no se pueden tener en cuenta los experimentos 1 y 3 la matriz de Plackett-Burman (Tabla 105), ya que los % eficacia en la extracción no son cuantitativos, y esto se debe, tal y como se verá más adelante, a que la concentración ácida que se propone en dichos experimentos no es suficiente para extraer cuantitativamente el hierro de este tipo de muestras. Así, se han realizado diferentes experimentos (Tabla 110) para estudiar el %eficacia en la extracción en los valores extremos del intervalo de estudio establecido en el diseño. En los resultados obtenidos se observa que una temperatura de 20°C y un volumen de disolución extractante de 1 mL son suficientes para obtener %eficacia en la extracción cuantitativos, y, como el objetivo es disminuir al máximo los valores de estas variables, ya que con ello se mejoran las características del proceso, estos serán los valores considerados como óptimos para estas dos variables.

Tabla 110. Experimentos realizados para la optimización de la temperatura de extracción y el volumen de disolución extractante

Temperatura de extracción (°C) ^a	Volumen de disolución extractante (mL) ^a	[Fe] $\mu\text{g/g}^b$	(%)Eficacia en la extracción
20	3 mL	299 $\pm$ 6	100,0
70		303 $\pm$ 6	101,2
20	1 mL	293 $\pm$ 2	98,1
70		300 $\pm$ 2	100,4

a. $[\text{HNO}_3]=3\text{M}$; $[\text{HCl}]=3\text{M}$; Tiempo de sonicación=5 min; Caudal de extracción =6,0 mL/min;

b. [Fe] = Media $\pm$ desviación estándar (n=3)

La otra variable no significativa es el **caudal de extracción**, y esta variable se ha estudiado con el **tiempo de sonicación**, variable significativa de elevado efecto estimado, ya que estas dos variables están relacionadas. Así, se estudió el tiempo de sonicación a los dos caudales fijados previamente en el diseño, con el objetivo de encontrar la combinación de estas dos variables que proporcione la mejor frecuencia de muestreo. En este caso, tal y como se observa en los resultados (Figura 48), el tiempo de sonicación necesario para obtener %eficacia en la extracción cuantitativos es de 5 min independientemente del caudal de extracción utilizado. A pesar de que a

ambos caudales con 5 min de tiempo de extracción se obtienen resultados satisfactorios, se observa que los % eficacia en la extracción son más elevados a caudales más bajos, fenómeno que difiere del comportamiento general en las extracciones estudiadas, excepto en el caso de la extracción de cobre en este mismo tipo de matriz. Esto se debe, no tanto a la cantidad de muestra utilizada (0,0100 g), como ha ocurrido en el caso del cobre, sino al tipo de matriz de la muestra y al tiempo necesario para extraer el metal, mayor que en los demás casos estudiados. Así se observa que, tras aproximadamente unos 2 minutos de sonicación a un caudal elevado, la muestra se compacta dentro de la columna, y por ello se necesita más tiempo para extraer cuantitativamente el hierro. En consecuencia se obtienen %extracción más elevados a caudales más bajos, que en este caso es de 3,5 mL/min.

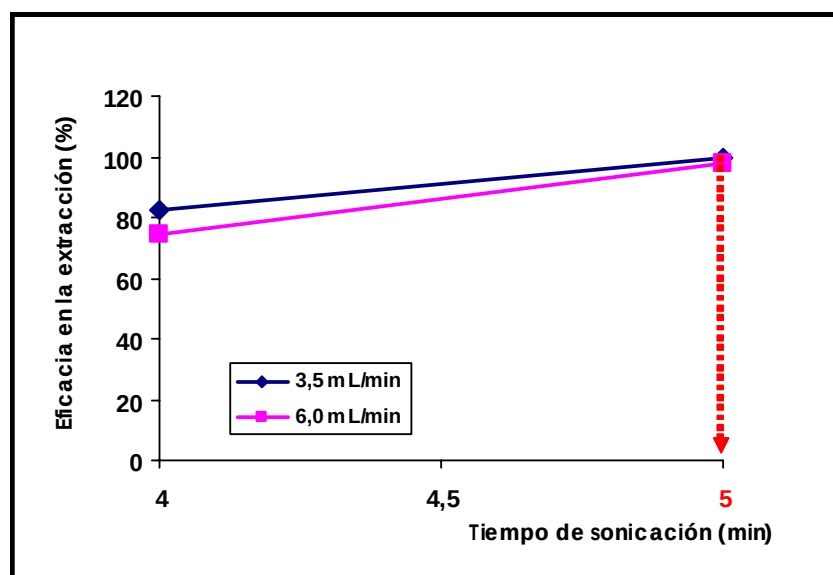


Figura 48. Experimentos realizados para la optimización del tiempo de sonicación a un caudal de extracción de 3,5 mL/min y 6,0 mL/min. $[\text{HNO}_3]=3\text{M}$; $[\text{HCl}]=3\text{M}$; Temperatura de extracción= 20°C ; Volumen de disolución extractante=1mL

Con respecto a las **concentraciones de los ácidos de la disolución extractante**, éstas tienen efectos estimados similares y bastante elevados. Sin embargo, con el objetivo es disminuir al máximo esta concentración se ha estudiado la posibilidad de eliminar uno de los componentes de la disolución ácida y/o disminuir al máximo la concentración de los mismos. En los experimentos realizados se ha comprobado que utilizando bien sólo HNO_3 3M o HCl 3M los %eficacia en la extracción no son cuantitativos (75,0% y 68,3%,

respectivamente). Una vez obtenidos estos resultados, se ha estudiado también la posibilidad de utilizar como disolución extractante la mezcla de ambos ácidos pero en menor concentración. Así, se ha observado que es necesaria una disolución extractante $\text{HNO}_3\text{-HCl}$ 3M-3M para obtener un %eficacia en la extracción cuantitativo (99,6%, con una disolución $\text{HNO}_3\text{-HCl}$ 2M-2M el %eficacia en la extracción obtenido es de un 85,1%).

Los valores óptimos para cada variable implicada en la extracción de hierro en las muestras de carne se indican en la Tabla 111.

Tabla 111. Valores óptimos para cada una de las variables implicadas en el proceso de extracción de hierro de las muestras de carne

VARIABLE	VALORES ÓPTIMOS PARA CADA UNA DE LAS VARIABLES
[HNO_3]	3 M
[HCl]	3M
Tiempo de sonicación	5 min
Temperatura de extracción	20 °C
Caudal de extracción	3,5 mL/min
Volumen de disolución extractante	1mL

- **Experimentos realizados para la optimización de la extracción de hierro en las muestras de Cereales y Derivados**

En la extracción hierro en muestras de cereales y derivados las variables de mayor influencia estadística son las concentraciones de los ácidos constituyentes de la disolución extractante y el tiempo de sonicación. Sin embargo, sólo las variables tiempo de sonicación y concentración de HNO_3 con efectos estimados de 44,7 y 44,2, respectivamente, llegan a ser significativas en el proceso. La concentración de HCl no es significativa, pero sí presenta un elevado efecto estimado positivo (36,1).

Con respecto a las variables no significativas, el **volumen de disolución extractante y temperatura de extracción** se observa en los experimentos 1 y 3 de la matriz del diseño (Tabla 105) que tomando sus valores más bajos

establecidos dentro del intervalo estudiado, 1mL y 20°C, respectivamente, los %eficacia en la extracción obtenidos son cuantitativos (101,5% y 99,1%, respectivamente). Por lo que éstos serán los valores considerados como óptimos para estas variables, ya que mejoran las características del proceso.

El **caudal de extracción** se ha estudiado con el **tiempo de sonicación**, dado que estas variables están relacionadas, con el objetivo de disminuir al máximo el tiempo de análisis (Figura 49). Los resultados indican que el menor tiempo de extracción para el que se obtiene un %eficacia en la extracción cuantitativo es de 2 min a un caudal de 6mL/min. Como de este modo se obtiene la máxima frecuencia de muestreo, son éstos los valores considerados como óptimos para estas dos variables.

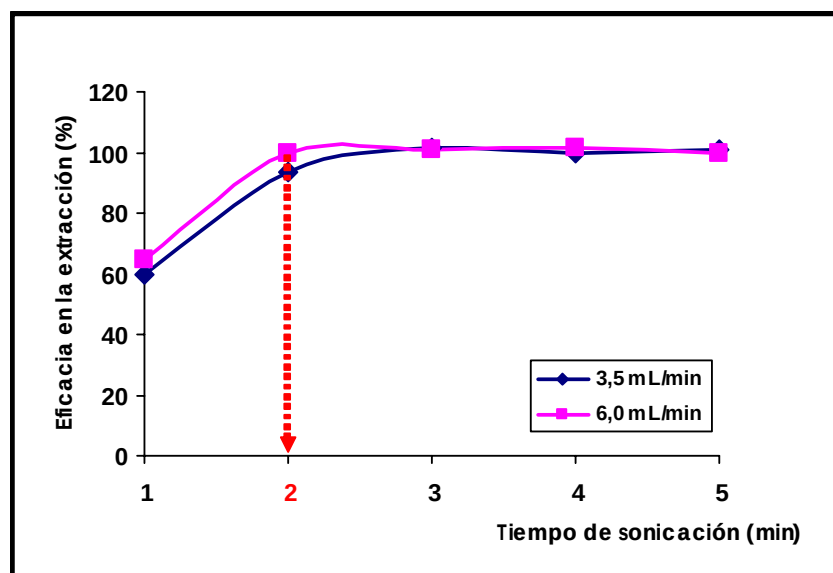


Figura 49. Experimentos realizados para la optimización del tiempo de sonicación a un caudal de extracción de 3,5 mL/min y 6,0 mL/min. $[\text{HNO}_3]=3\text{M}$; $[\text{HCl}]=3\text{M}$; Temperatura de extracción= 20°C; Volumen de disolución extractante=1mL

Con respecto a las **concentraciones de los ácidos** se estudió la posibilidad de eliminar el HCl de la disolución extractante, ya que este ácido no llega a ser significativo en el proceso de extracción, como ya se ha visto en los resultados obtenidos en el diseño factorial. Se ha comprobado que si se elimina de la disolución extractante este ácido, utilizando una disolución de HNO_3 3M, se obtienen eficacias en la extracción cuantitativas (Tabla 112).

Tabla 112. Experimentos realizados para la optimización de la concentración de HCl

[HCl] (M) ^a	[Fe] µg/g ^b	(%) Eficacia en la extracción
3,0	26,4 ± 0,3	100,2
1,5	26,0 ± 0,5	99,0
0	25,9 ± 0,3	100,2

a. [HNO₃]=3M; Tiempo de sonicación=2 min; Temperatura de extracción= 20°C; Caudal de extracción=6,0 mL/min; Volumen de disolución extractante=1mL

b. [Fe] = Media ± desviación estándar (n=3)

Una vez eliminado el HCl de la disolución extractante, se ha estudiado la posibilidad de disminuir la concentración de HNO₃. En los experimentos realizados se ha comprobado que concentraciones inferiores a 3M de HNO₃ no proporcionan %eficacia en la extracción cuantitativos (con una disolución HNO₃ 1,5M el %eficacia en la extracción obtenido es de 70,6%). Por tanto, la disolución extractante considerada como óptima es una disolución de HNO₃ 3M.

Los valores óptimos para cada variable implicada en la extracción de hierro en las muestras de cereales y derivados se indican en la Tabla 113.

Tabla 113. Valores óptimos para cada una de las variables implicadas en el proceso de extracción de hierro de las muestras de cereales y derivados

VARIABLE	VALORES ÓPTIMOS PARA CADA UNA DE LAS VARIABLES
[HNO ₃]	3 M
[HCl]	0 M
Tiempo de sonicación	2 min
Temperatura de extracción	20 °C
Caudal de extracción	6,0 mL/min
Volumen de disolución extractante	1mL

- Experimentos realizados para la optimización de la extracción de hierro en las muestras de Frutos Secos**

En la determinación de hierro en frutos sólo una variable es significativa en el proceso, la concentración de HNO₃. Sin embargo, se observa que otras dos

variables presentan un elevado efecto positivo en la extracción: la concentración de HCl y el tiempo de sonicación.

En el estudio de las variables no significativas **volumen de disolución extractante** y **temperatura de extracción**, se observa que se obtienen %eficacia en la extracción cuantitativos cuando estas dos variables toman valor mínimo dentro del intervalo de estudio establecido en el diseño (experimentos 1 y 3 de la matriz del mismo, Tabla 105). Así, debido a que el objetivo es minimizar estos valores para mejorar las características del proceso, 1mL y 20°C serán respectivamente los valores considerados como óptimos para estas dos variables.

Con respecto al estudio del **tiempo de sonicación** y el **caudal de extracción** (Figura 50) se ha comprobado experimentalmente que los valores óptimos para estas dos variables, ya que con ellos se consigue la frecuencia de muestreo más elevada, son un tiempo de sonicación de 2 min y un caudal de extracción de 6 mL/min.

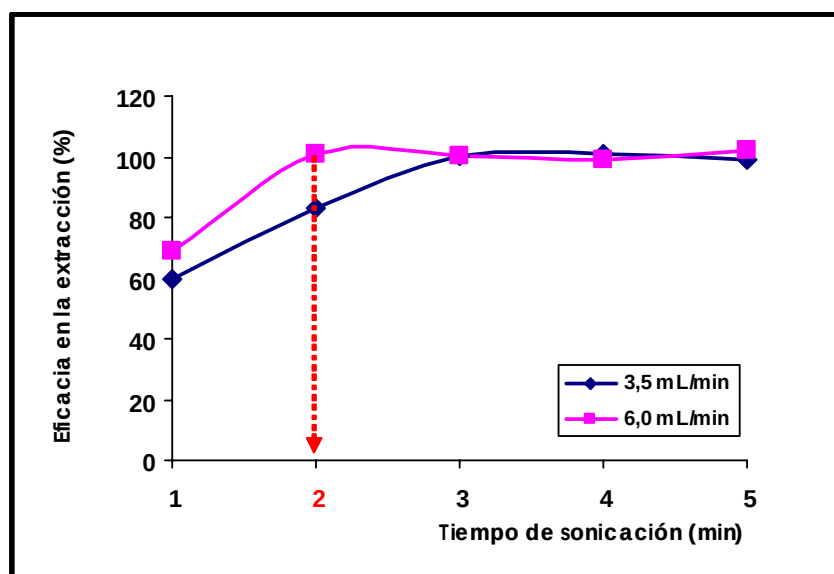


Figura 50. Experimentos realizados para la optimización del tiempo de sonicación a un caudal de extracción de 3,5 mL/min y 6,0 mL/min. $[\text{HNO}_3]=3\text{M}$; $[\text{HCl}]=3\text{M}$; Temperatura de extracción= 20°C; Volumen de disolución extractante=1mL

En el estudio de las **concentraciones de los ácidos** constituyentes de la disolución extractante, donde la concentración de HNO_3 es una variable significativa mientras que la concentración de HCl no lo es, se ha comprobado

experimentalmente (Tabla 114) que se obtienen %eficacias en la extracción de hierro cuantitativos cuando se elimina el HCl de la disolución extractante, manteniendo una concentración 3M en HNO_3 .

Tabla 114. Experimentos realizados para la optimización de la concentración de HCl

[HCl] (M) ^a	[Fe] $\mu\text{g/g}^b$	(%) Eficacia en la extracción
3,0	41,4 $\pm$ 0,6	99,3
1,5	41,8 $\pm$ 1,1	100,2
0	42,1 $\pm$ 0,6	101,1

a. [HNO_3]=3M; Tiempo de sonicación=2 min; Temperatura de extracción= 20°C; Caudal de extracción=6,0 mL/min; Volumen de disolución extractante=1mL

b. [Fe] = Media $\pm$ desviación estándar (n=3)

Una vez eliminado el HCl de la disolución extractante, se ha estudiado la posibilidad de disminuir la concentración de HNO_3 , y se ha observado que la disolución extractante de menor concentración que proporciona %eficacia en la extracción cuantitativos, y por tanto, la disolución extractante considerada como óptima es una disolución de HNO_3 1,5M (Tabla 115).

Tabla 115. Experimentos realizados para la optimización de la concentración de HNO_3

[HNO_3] (M) ^a	[Fe] $\mu\text{g/g}^b$	(%) Eficacia en la extracción
3	42,1 $\pm$ 0,6	101,1
1,5	41,4 $\pm$ 0,6	99,3
0,75	31,8 $\pm$ 1,1	76,2

a. [HCl]=0M; Tiempo de sonicación=2 min; Temperatura de extracción= 20°C; Caudal de extracción=6,0 mL/min; Volumen de disolución extractante=1mL

b. [Fe] = Media $\pm$ desviación estándar (n=3)

Los valores óptimos para cada variable implicada en la extracción de hierro en las muestras de frutos secos se indican en la Tabla 116.

Tabla 116. Valores óptimos para cada una de las variables implicadas en el proceso de extracción de hierro de las muestras de frutos secos

VARIABLE	VALORES ÓPTIMOS PARA CADA UNA DE LAS VARIABLES
[HNO ₃]	1,5 M
[HCl]	0 M
Tiempo de sonicación	2 min
Temperatura de extracción	20 °C
Caudal de extracción	6,0 mL/min
Volumen de disolución extractante	1mL

- Experimentos realizados para la optimización de la extracción de hierro en las muestras de Legumbres

La extracción de hierro en las muestras de legumbres está afectada significativamente sólo por el tiempo de sonicación. Sin embargo, las concentraciones de los ácidos a pesar de no ser variables significativas tienen un importante efecto positivo en el proceso.

Los valores óptimos establecidos para las variables **volumen de disolución extractante** y **temperatura de extracción** son 1mL y 20°C, respectivamente, ya que se obtienen %eficacia en la extracción cuantitativos cuando estas dos variables toman el valor mínimo del intervalo establecido en el diseño (experimento 1 de la matriz de Plackett-Burman, Tabla 105), además de que mejoran las características del proceso.

El estudio del **caudal de extracción**, se ha llevado a cabo con la variable **tiempo de sonicación**, que a pesar de ser la variable significativa con mayor efecto positivo, se ha optimizado con el objetivo de obtener la frecuencia de muestreo más elevada (Figura 51). En los resultados obtenidos se observa que la mejor frecuencia de muestreo donde la extracción de hierro es cuantitativa, se alcanza a un caudal de 6,0 mL/min con un tiempo de sonicación de 3 min, siendo por tanto, éstos los valores considerados como óptimos para estas dos variables.

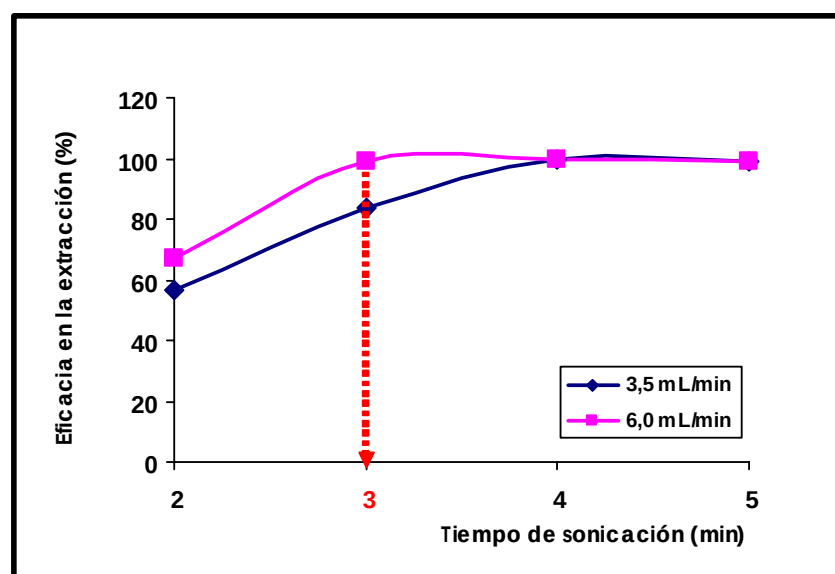


Figura 51. Experimentos realizados para la optimización del tiempo de sonicación a un caudal de extracción de 3,5 mL/min y 6,0 mL/min. $[\text{HNO}_3]=3\text{M}$; $[\text{HCl}]=3\text{M}$; Temperatura de extracción= 20°C ; Volumen de disolución extractante=1mL

Además, se estudió la posibilidad de utilizar sólo uno de los **ácidos** como disolución extractante y/o disminuir al máximo la concentración de los mismos (Tablas 117 y 118). En los resultados obtenidos experimentalmente se ha observado que una disolución de HNO_3 3M es suficiente para extraer cuantitativamente todo el hierro de las muestras de legumbres, y por tanto, se puede eliminar el HCl de la disolución extractante. A su vez, se ha observado que concentraciones menores de HNO_3 no proporcionan %eficacia en la extracción cuantitativos, por lo que la disolución considerada como óptima para la extracción de hierro en legumbres es una disolución 3M de este ácido.

Tabla 117. Experimentos realizados para la optimización de la concentración de HNO_3

$[\text{HNO}_3]$ (M) ^a	$[\text{Fe}]$ $\mu\text{g/g}^b$	(%)Eficacia en la extracción
3	$51,4 \pm 0,6$	99,3
1,5	$35,1 \pm 1,1$	67,7

a. $[\text{HCl}]=0\text{M}$; Tiempo de sonicación=3 min; Temperatura de extracción= 20°C ; Caudal de extracción=6,0 mL/min; Volumen de disolución extractante=1mL

b. $[\text{Fe}]$ = Media $\pm$ desviación estándar (n=3)

Tabla 118. Experimentos realizados para la optimización de la concentración de HCl

[HCl] (M) ^a	[Fe] µg/g ^b	(%) Eficacia en la extracción
3	47,0 ± 0,6	90,7
1,5	32,9 ± 1,1	63,4

a. [HNO₃]=0M; Tiempo de sonicación=3 min; Temperatura de extracción= 20°C; Caudal de extracción=6,0 mL/min; Volumen de disolución extractante=1mL

b. [Fe] = Media ± desviación estándar (n=3)

Los valores óptimos para cada variable implicada en la extracción de hierro en las muestras de legumbres se indican en la Tabla 119.

Tabla 119. Valores óptimos para cada una de las variables implicadas en el proceso de extracción de hierro de las muestras de legumbres

VARIABLE	VALORES ÓPTIMOS PARA CADA UNA DE LAS VARIABLES
[HNO ₃]	3M
[HCl]	0 M
Tiempo de sonicación	3 min
Temperatura de extracción	20 °C
Caudal de extracción	6,0 mL/min
Volumen de disolución extractante	1mL

- Experimentos realizados para la optimización de la extracción de hierro en las muestras de Verduras, Hortalizas y Frutas**

Las variables significativas en la extracción de hierro en muestras de verduras, hortalizas y frutas son la concentración de HNO₃ y el tiempo de sonicación. Sin embargo, también tiene gran importancia la concentración de HCl, pues presenta un elevado efecto positivo en el proceso.

Comenzando el estudio por las variables **volumen de disolución extractante** y **temperatura de extracción**, se observa que, al igual que en todos los casos estudiados previamente, 1mL y 20°C son los valores considerados como óptimos para estas variables respectivamente, ya que con ellos se obtienen %eficacias en la extracción cuantitativos (experimentos 1 y 3 de la matriz de Plackett-Burman, Tabla 105) y se mejoran las características del sistema.

El **caudal de extracción** es otra variable no significativa, que como se ha venido haciendo hasta el momento, se ha estudiado con el **tiempo de sonicación** debido a que estas dos variables están relacionadas (Figura 52). En los resultados obtenidos experimentalmente se ha comprobado que, a pesar del elevado efecto estimado del tiempo de sonicación, 1 min a un caudal de 6mL/min es tiempo suficiente para extraer cuantitativamente el hierro de este tipo de muestras. Por tanto, como el objetivo es que el tiempo de análisis sea el menor posible, éstos serán los valores considerados como óptimos para estas dos variables.

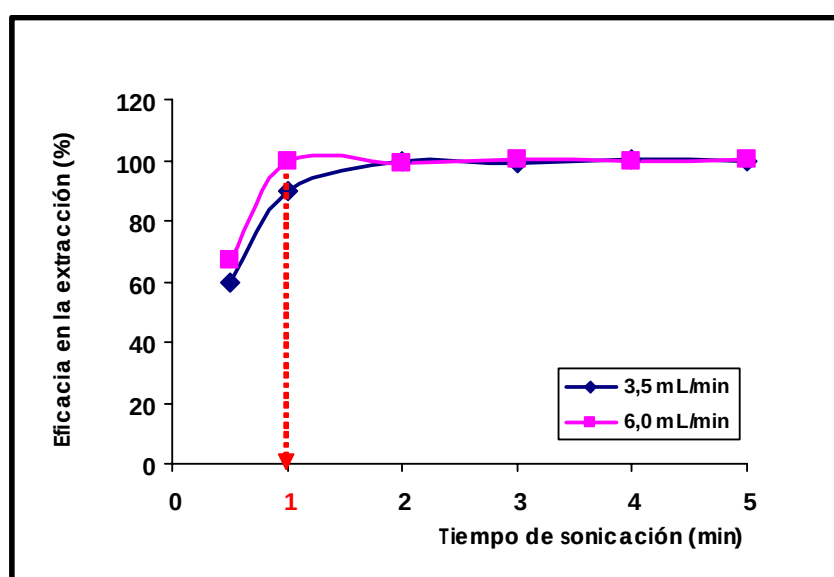


Figura 52. Experimentos realizados para la optimización del tiempo de sonicación a un caudal de extracción de 3,5 mL/min y 6,0 mL/min. $[\text{HNO}_3]=3\text{M}$; $[\text{HCl}]=3\text{M}$; Temperatura de extracción= 20°C ; Volumen de disolución extractante=1mL

Con respecto a las concentraciones de los **ácidos constituyentes de la disolución extractante**, debido a que el HCl no es una variable significativa mientras que el HNO_3 sí lo es, se estudió la posibilidad de eliminar el HCl de la disolución extractante, ya que el objetivo es minimizar al máximo la concentración ácida de la misma. Se ha observado que si se elimina de la disolución extractante este ácido (siendo la disolución extractante HNO_3 3M) se obtienen %eficacia en la extracción cuantitativos (Tabla 120).

Tabla 120. Experimentos realizados para la optimización de la concentración de HCl

[HCl] (M) ^a	[Fe] µg/g ^b	(%) Eficacia en la extracción
3,0	264 ± 2	100,2
1,5	262 ± 3	99,3
0	263 ± 2	99,8

a. [HNO₃]=3M; Tiempo de sonicación=1min; Temperatura de extracción= 20°C; Caudal de extracción=6,0 mL/min; Volumen de disolución extractante=1mL

b. [Fe] = Media ± desviación estándar (n=3)

Una vez eliminado el HCl de la disolución extractante, se ha estudiado la posibilidad de disminuir la concentración de HNO₃. Como se observa en la Tabla 121, una concentración de HNO₃ menor de 3M no proporciona %eficacia en la extracción cuantitativos, con lo que éste será el valor óptimo considerado para esta variable.

Tabla 121. Experimentos realizados para la optimización de la concentración de HNO₃

[HNO ₃] (M) ^a	[Fe] µg/g ^b	(%) Eficacia en la extracción
3	263 ± 2	99,8
1,5	190 ± 2	71,9

a. [HCl]=0M; Tiempo de sonicación=1 min; Temperatura de extracción= 20°C; Caudal de extracción=6,0 mL/min; Volumen de disolución extractante=1mL

b. [Fe] = Media ± desviación estándar (n=3)

Los valores óptimos para cada variable implicada en la extracción de hierro en las muestras de verduras, hortalizas y frutas se indican en la Tabla 122.

Tabla 122. Valores óptimos para cada una de las variables implicadas en el proceso de extracción de hierro de las muestras de verduras, hortalizas y frutas

VARIABLE	VALORES ÓPTIMOS PARA CADA UNA DE LAS VARIABLES
[HNO ₃]	3M
[HCl]	0 M
Tiempo de sonicación	1 min
Temperatura de extracción	20 °C
Caudal de extracción	6,0 mL/min
Volumen de disolución extractante	1mL

En la Tabla 123 se muestra un resumen de los valores óptimos para cada una de las variables implicadas en el proceso de extracción de hierro en los diferentes tipos de muestras de alimentos.

Tabla 123. Valores óptimos para cada una de las variables implicadas en el proceso de extracción de hierro de los diferentes tipos de muestras alimenticias

Variables	VALORES ÓPTIMOS PARA CADA UNA DE LAS VARIABLES IMPLICADAS EN LA EXTRACCIÓN DE HIERRO EN LOS DIFERENTES TIPOS DE MUESTRAS ALIMENTICIAS					
	Moluscos y pescados	Carnes	Cereales y derivados	Frutos secos	Legumbres	Verduras, hortalizas y frutas
A (M)	3	3	3	1,5	3	3
B (M)	0	3	0	0	0	0
C (min)	3	5	2	2	3	1
D (°C)	20	20	20	20	20	20
E (mL/min)	6,0	3,5	6,0	6,0	6,0	6,0
F (mL)	1	1	1	1	1	1

A, [HNO₃]; B, [HCl]; C, Tiempo sonicación; D, Temperatura de extracción; E, Caudal de extracción; F, Volumen de disolución extractante

En los valores óptimos obtenidos para la extracción de hierro de los diferentes tipos de muestras, se observa que en este proceso se puede eliminar de la disolución extractante el HCl en todos los casos, excepto en el caso de las muestras de carne, donde es necesaria la presencia de ambos ácidos para obtener %extracción cuantitativos. En cuanto a la concentración de HNO₃, se observa que en todos los casos es necesaria una concentración 3M, excepto en el caso de los frutos secos donde una concentración 1,5 M del mismo es suficiente para obtener resultados satisfactorios.

En lo que respecta al tiempo de extracción, se observa que las muestras que necesitan mayor tiempo de extracción son las muestras de carne (5 min), seguidas de las muestras de moluscos y pescados, y las muestras de legumbres (3 min). En el caso de los cereales y derivados y las muestras de frutos secos el tiempo necesario es de 2 min, y para las muestras de verduras, hortalizas y frutas es necesario 1 min. El caudal óptimo para estas extracciones es de 6mL/min en todos los casos, excepto en el caso de las muestras de carne. Como ya se ha indicado antes, esto se explica teniendo en cuenta el tipo de matriz de estas muestras, y al hecho de que la extracción requiere mayor

tiempo que en los casos anteriores (5 min). Estos factores hacen que, si el caudal es elevado (6 mL/min), la muestra comience a compactarse dentro de la columna tras unos 2 min de sonicación, y por tanto, necesite mayor tiempo para extraer cuantitativamente el metal.

Los valores óptimos de la temperatura y el volumen de disolución extractante son los mismos en todos los casos, 20°C y 1 mL, respectivamente.

4.1.4.1 Estudio de la cantidad de muestra

En las extracciones de hierro realizadas en los estudios previos las cantidades de muestra utilizadas son 0,0100 para los moluscos y pescados, las carnes y las verduras, hortalizas y frutas, y 0,0300 g en los casos de los cereales y derivados, los frutos secos y legumbres (Tabla 104).

Para las muestras en las que se ha utilizado 0,0300 g de las mismas, se podría utilizar una cantidad de muestra menor que la propuesta (0,0100 ó 0,0200 g) obteniendo %eficacias en la extracción cuantitativos. Sin embargo, los resultados obtenidos con estas menores cantidades de muestra no implicarían ninguna mejora en las características analíticas de la determinación, sino que por el contrario, las señales analíticas obtenidas serían menores, ya que la concentración de hierro presente en este tipo de muestras no es elevada. Por otra parte, no se han podido estudiar mayores cantidades de muestra, ya que cantidades de muestra mayores que 0,0300 g provocan presiones elevadas en el sistema FIA que hacen inviables los análisis.

Para las muestras restantes, moluscos y pescados, carnes y verduras, hortalizas y frutas, sí se puede realizar un estudio más profundo de la cantidad de muestra. Así, se estudió la posibilidad de utilizar mayores cantidades de las mismas, para poder mejorar las características analíticas del proceso y poder analizar muestras de los tipos correspondientes que presenten concentraciones de hierro menores. En estos estudios no se utilizaron los materiales de referencia propuestos en la optimización, sino que se utilizaron muestras de cada tipo cuya concentración en hierro ha sido determinada por triplicado utilizando el método de referencia (pág. 86).

En el caso de los moluscos y pescados, este estudio se llevó a cabo utilizando una muestra de mejillón cuya concentración de hierro es de $217,3 \pm$

1,1 $\mu\text{g/g}$, y se estudió la posibilidad de utilizar 0,0200 g de la misma (0,0300 g no se ha podido estudiar debido a que las señales de absorbancia salen del intervalo lineal de detección del hierro). Los experimentos realizados indican que utilizando 0,0200 g de muestra se obtiene un %eficacia en la extracción cuantitativo (100,1%), manteniendo los valores óptimos de las variables obtenidos para 0,0100 g.

En el caso de las muestras de carne se llevó a cabo el mismo estudio utilizando una muestra de riñones de cordero cuya concentración de hierro es de $129,4 \pm 1,0 \mu\text{g/g}$. En este caso los resultados también indican que se pueden utilizar 0,0200 y 0,0300 g de muestra obteniendo unos %eficacia en la extracción de 100,5 y 99,7 %, respectivamente, manteniendo los valores óptimos para las variables propuestos para 0,0100 g de la misma.

La cantidad de muestra que se puede utilizar en el análisis de las muestras de verduras, hortalizas y frutas, se estudió utilizando una muestra de lechuga cuya concentración es de $71,7 \pm 2,02 \mu\text{g/g}$. En este caso se observa que se pueden utilizar 0,0200 y 0,0300 g de la misma obteniendo los %eficacia extracción de 100,6 y 99,7%, respectivamente. Aunque en este caso, al utilizar mayor cantidad de muestra el proceso de extracción requiere tiempos de sonicación mayores, (las demás variables se mantienen en los valores óptimos obtenidos para 0,0100 g). Así, cuando se utilizan 0,0200 g el proceso necesita 1,5 min de sonicación, y en el caso de utilizar 0,0300 g, el tiempo necesario es de 2 min.

4.1.4.2 Estudio de la influencia del tamaño de partícula de la muestra

Todos los estudios descritos anteriormente se han realizado con un diámetro de partícula menor de 30 μm . Para ver la influencia del tamaño de partícula en la extracción del hierro se han tomado diferentes porciones de una misma muestra (para cada tipo de matriz) con diferentes tamaños de partícula: diámetro menor de 30 μm y de diámetro comprendido entre 30-100 μm .

Para llevar a cabo este estudio no se han podido utilizar las muestras utilizadas en la optimización, excepto en los casos de los frutos secos y las legumbres (Tabla 104), porque las muestras utilizadas en dichas optimizaciones son materiales de referencia y, por tanto, es imposible realizar estudios de

tamaño de partícula ya que éste es uniforme. Las muestras analizadas en cada caso se indican en la Tabla 124.

Con las porciones de diferente diámetro de cada muestra se ha realizado por una parte el análisis utilizando el método de referencia descrito previamente (pág. 86) y por otra el análisis de las mismas con las metodologías propuestas. En las metodologías propuestas se han utilizado las mayores cantidades de muestra posibles (0,0300g), para obtener una mayor sensibilidad en los resultados debido a las bajas concentraciones de hierro presentes en las muestras, excepto en el caso de los moluscos y pescados, donde se han utilizado 0,0200 g, porque si no las señales saldrían del intervalo de detección lineal del metal. Se han comparado los resultados obtenidos por ambas metodologías y se han calculado las eficacias en la extracción (Tabla 124). De los resultados obtenidos se deduce que el tamaño de partícula no influye en la determinación de hierro con el sistema propuesto. Esto simplifica mucho el análisis, ya que no hay que someter la muestra a ningún tratamiento previo que garantice un cierto tamaño de partícula.

Tabla 124. Experimentos realizados en porciones de muestras con diferente tamaño de partícula para todos los tipos de muestras estudiados utilizando el método de referencia y las metodologías continuas propuestas. Se indica además la eficacia en la extracción del sistema FIA

Tipo de muestra	Muestra analizada	Tamaño de partícula	[Fe] obtenida mediante el método de referencia ($\mu\text{g/g}$)	[Fe] obtenida mediante los métodos continuos propuestos ($\mu\text{g/g}$)	(%) Eficacia en la extracción
Moluscos y pescados	Mejillón	<30 μm	217,3 $\pm$ 1,1	217,4 $\pm$ 1,0	100,3
		30-100 μm	217,9 $\pm$ 1,9	218,5 $\pm$ 1,0	99,8
Carnes	Riñones de cordero	<30 μm	129,4 $\pm$ 1,0	125,7 $\pm$ 0,6	100,2
		30-100 μm	125,3 $\pm$ 1,0	129,0 $\pm$ 0,6	99,7
Cereales y derivados	Cereales con cacao	<30 μm	67,0 $\pm$ 2,6	61,7 $\pm$ 0,6	101,2
		30-100 μm	61,6 $\pm$ 2,0	61,1 $\pm$ 0,6	99,2
Frutos secos	Nueces	<30 μm	41,7 $\pm$ 1,2	41,0 $\pm$ 0,6	100,9
		30-100 μm	40,7 $\pm$ 1,6	41,4 $\pm$ 0,6	99,3
Legumbres	Habas	<30 μm	51,8 $\pm$ 2,1	52,9 $\pm$ 1,1	102,1
		30-100 μm	52,1 $\pm$ 2,1	51,8 $\pm$ 1,1	99,3
Verduras, hortalizas y frutas	Lechuga	<30 μm	71,7 $\pm$ 2,02	71,8 $\pm$ 1,1	100,2
		30-100 μm	71,7 $\pm$ 2,02	71,8 $\pm$ 1,1	100,2

4.1.5 Extracción de magnesio

La optimización de este proceso se ha realizado utilizando el dispositivo FIA indicado en la Figura 12 (pág. 76) en el que se incluye el canal de dilución con La, por una parte, diluir las elevadas concentraciones de magnesio presentes en las muestras de alimentos y, por otra, eliminar las interferencias químicas que sufre este metal en la celda de atomización. Las diluciones llevadas a cabo dependen de las concentraciones de magnesio presentes en las muestras. Así, en función de la concentración de magnesio presente en las muestras se proponen 3 sistemas:

- un sistema que realiza una dilución con lantano 1:10 para las muestras de carnes y cereales y derivados
- un sistema que realiza una dilución con lantano 1:25 para las muestras de moluscos y pescados, frutos secos, verduras, hortalizas y frutas
- un sistema que realiza una dilución con lantano 1:15 para las muestras de legumbres

El proceso de extracción se ha optimizado mediante la aplicación de un diseño de Plackett-Burman $2^{7 \times 3/32}$ de resolución tipo III con 5 grados de libertad con un punto central, ya que las variables que afectan al proceso son siete, pues hay que incluir en estas variables la concentración de La, aunque como ya se ha explicado no es una variable que afecte directamente al proceso de extracción. Los valores máximos y mínimos establecidos para cada variable no difieren de los considerados en el caso del calcio, ya que el objetivo es conocer el comportamiento de las mismas en los mismos intervalos de estudio (Tabla 29, página 107).

Una vez obtenida la matriz del diseño (Tabla 28, pág. 104), se realizaron los 13 experimentos fijados en la misma. Estos experimentos sobre las diferentes matrices, se han realizado utilizando materiales de referencia, en los casos en los que se certificaba la concentración de magnesio y, en los otros casos, se han utilizado muestras en las que se había determinado previamente y por

triplicado su concentración de magnesio utilizando el método de referencia descrito en la página 86 (Tabla 125). La cantidad de material de referencia o muestra utilizada para llevar a cabo la optimización del proceso se ha fijado en función de la concentración de magnesio presente y de la dilución propuesta para cada tipo de matriz.

Tabla 125. Muestras y materiales de referencia utilizados en la optimización del procedimiento FIA, concentración de magnesio presente en dichas muestras y cantidad utilizada en la optimización

Tipo de matriz	Muestra con la que se realiza la optimización	[Mg]($\mu\text{g/g}$)	Cantidad de muestra (g, peso seco)
Moluscos y pescados	Mejillón	$4839,7 \pm 35,6$	0,0050
Carnes	Músculo de pollo	$772,5 \pm 7,1$	0,0050
Cereales y derivados	Harina trigo	$288,9 \pm 2,7$	0,0100
Frutos secos	Nueces	$1444,4 \pm 13,6$	0,0050
Legumbres	Garbanzos	$1186,2 \pm 13,6$	0,0050
Verduras, hortalizas y frutas	Te NCS ^a DC 73351	1700 ± 100	0,0050

a. NCS:China National Analysis Center for Iron and Steel

La matriz del diseño de Plackett-Burman con los valores que toma cada variable en cada experimento y el %eficacia en la extracción obtenido en cada caso se indican en la Tabla 126. Los experimentos se han realizado por duplicado, por lo que la eficacia de la extracción indicada es la media obtenida en los dos experimentos.

Una vez realizados los experimentos, se procede al análisis de los datos proporcionados por el diseño. Para ello se comenzará de nuevo estudiando las **Cartas Pareto estandarizadas** (Figura 53) para conocer que variables son significativas y como afectan al proceso de extracción.

Tabla 126. Matriz del diseño de Plackett-Burman con los valores de cada variable en cada experimento, con el %eficacia en la extracción de magnesio obtenidas en cada uno de ellos para cada tipo de muestra

							%Eficacia en la extracción					
A	B	C	D	E	F	G	Moluscos y pescados ^a	Carnes	Cereales y derivados	Frutos secos	Legumbres	Verduras, hortalizas y frutas
3	0	5	20	3,5	1	5	101,9	101,4	100,2	100,9	99,9	100,4
3	3	0,5	70	3,5	1	0	38,9	53,1	50,0	58,1	58,8	52,0
0	3	5	20	6	1	0	50,3	46,0	46,6	49,7	49,4	47,2
3	0	5	70	3,5	5	0	52,3	42,1	49,8	47,2	48,6	51,0
3	3	0,5	70	6	1	5	87,3	100,3	100,2	84,3	100,4	99,9
3	3	5	20	6	5	0	63,7	61,9	66,7	72,8	75,3	67,3
1,5	1,5	2,75	45	4,75	3	2,5	102,7	100,2	101,1	101,2	99,7	99,1
0	3	5	70	3,5	5	5	94,3	83,3	83,7	92,0	81,3	94,5
0	0	5	70	6	1	5	3,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
0	0	0,5	70	6	5	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
3	0	0,5	20	6	5	5	86,6	95,4	93,9	82,4	96,1	94,5
0	3	0,5	20	3,5	5	5	84,7	92,4	87,1	76,0	81,3	89,0
0	0	0,5	20	3,5	1	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

A, [HNO₃]; B, [HCl]; C, Tiempo sonicación; D, Temperatura de extracción; E, Caudal de extracción; F, Volumen de disolución extractante; G, [La].

a. En el caso de las muestras de moluscos y pescados el volumen de disolución extractante se ha estudiado entre 2-5mL. Por lo tanto, en los experimentos de la matriz de Plackett-Burman que esta variable toma el valor de 1mL, para las muestras de moluscos y pescados el volumen es de 2 mL, y en el experimento 7, donde el volumen de extracción toma su valor intermedio, esta variable toma un valor de 1,5 mL.

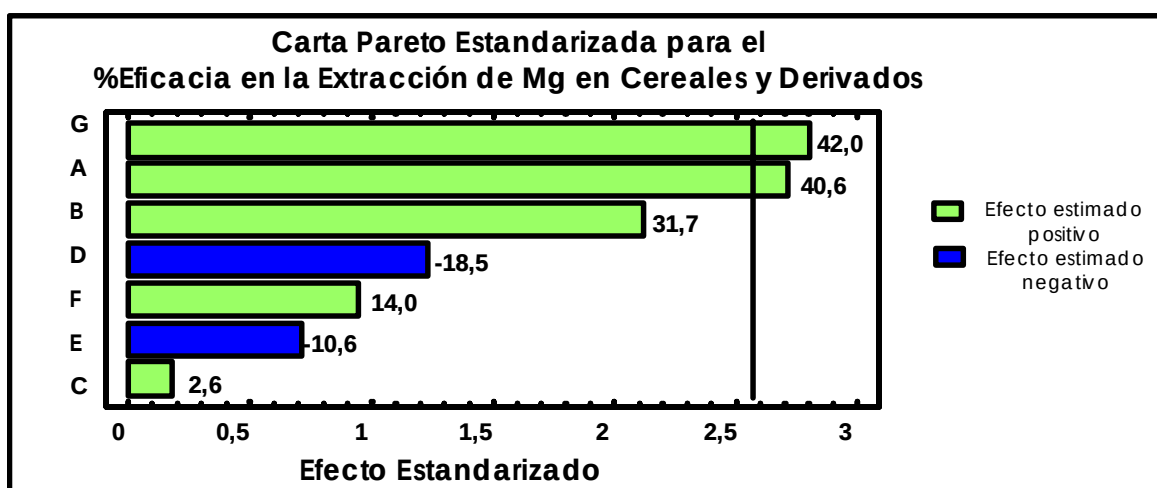
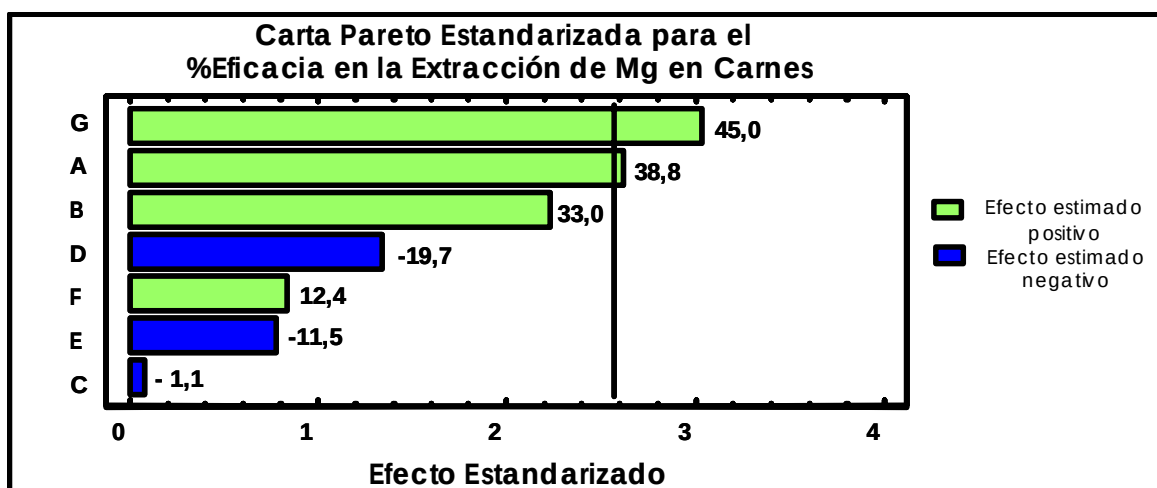
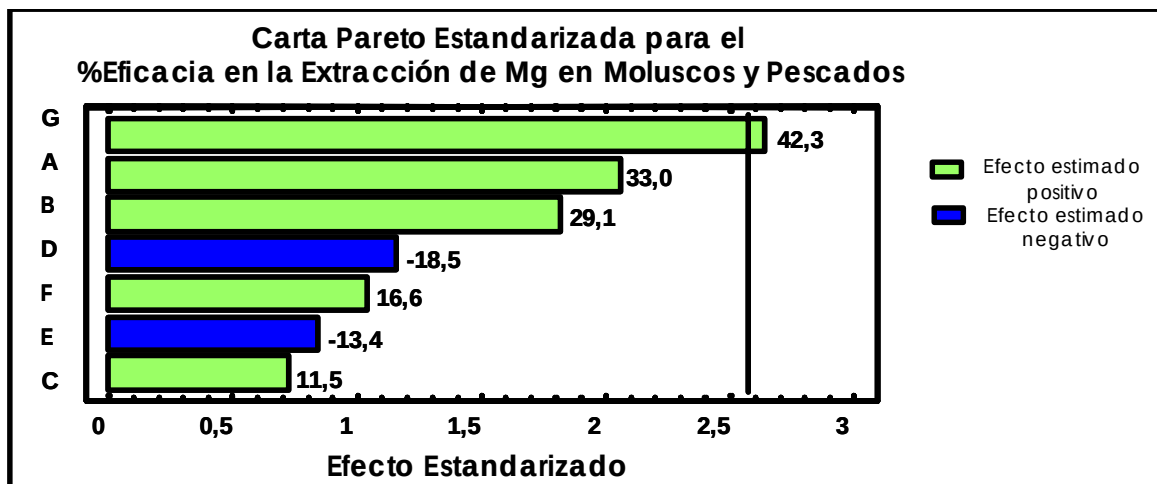


Figura 53. Carta Pareto estandarizada de los efectos principales estandarizados en el diseño factorial; la flecha vertical indica el límite de significación estadística para los efectos. A, $[\text{HNO}_3]$; B, $[\text{HCl}]$; C, Tiempo sonicación; D, Temperatura de extracción; E, Caudal de extracción; F, Volumen de disolución extractante; G, $[\text{La}]$.

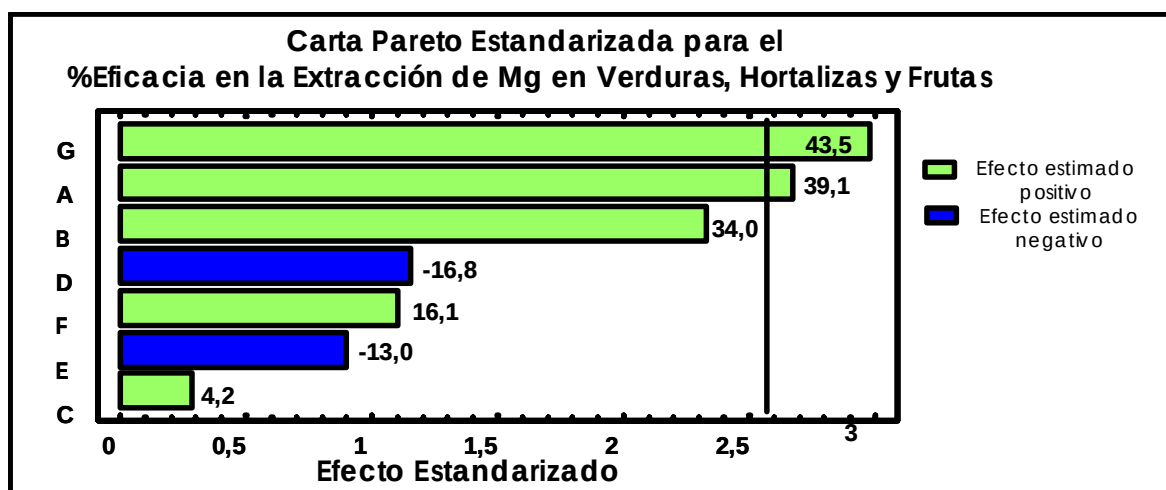
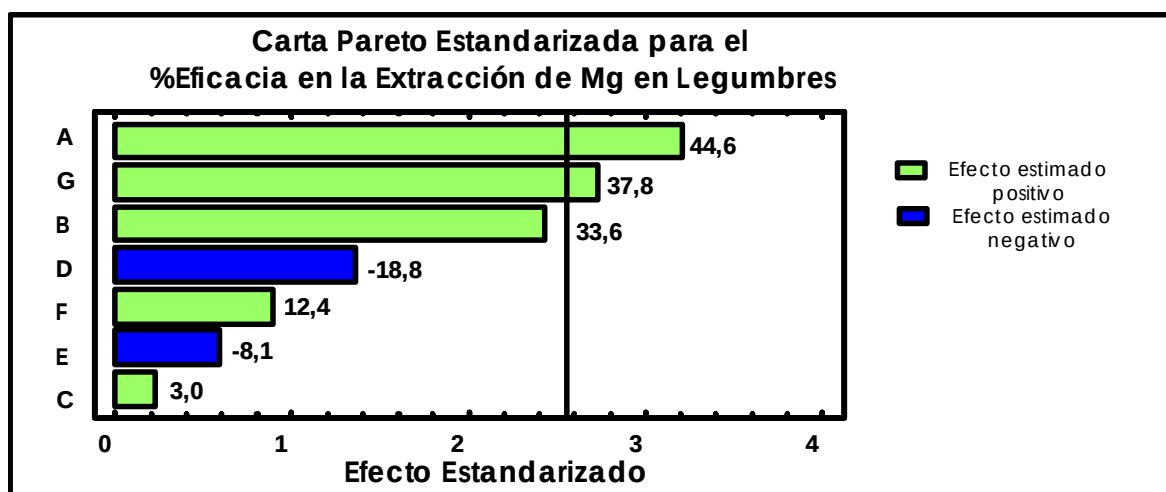
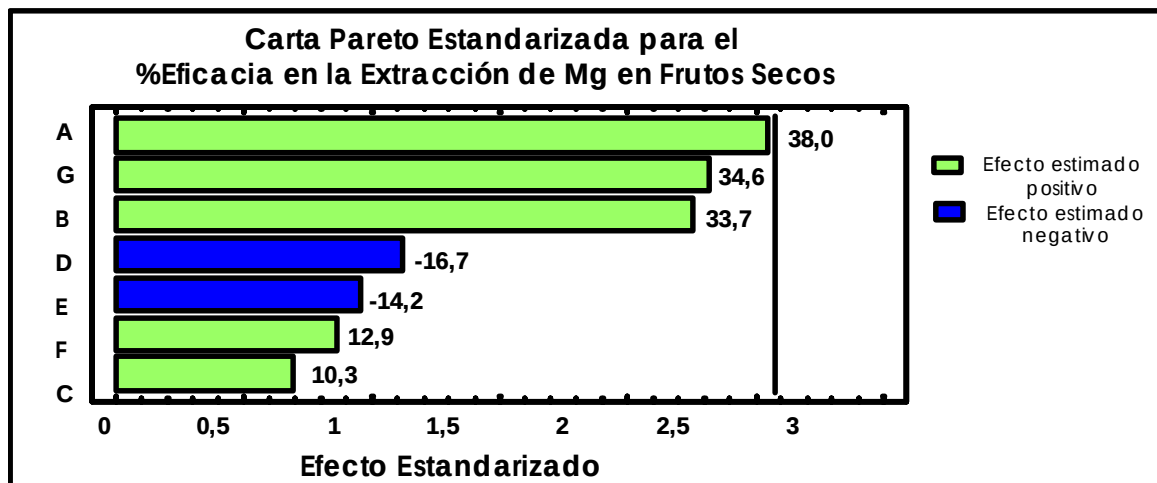


Figura 53 (continuación). Carta Pareto estandarizada de los efectos principales estandarizados en el diseño factorial; la flecha vertical indica el límite de significación estadística para los efectos. A, $[\text{HNO}_3]$; B, $[\text{HCl}]$; C, Tiempo sonicación; D, Temperatura de extracción; E, Caudal de extracción; F, Volumen de disolución extractante; G, $[\text{La}]$.

- **Análisis de los resultados obtenidos con el diseño factorial**

En los resultados obtenidos al aplicar el diseño de Screening a la extracción de magnesio, se observa que para la mayoría de los tipos de muestras las variables estadísticamente significativas son la concentración de lantano y de ácido nítrico, excepto para el caso de los moluscos y pescados en donde sólo es significativa la concentración de lantano, y las muestras de frutos secos donde ninguna variable llega a ser significativa. Sin embargo, a pesar de que no para todos los tipos de muestras son significativas las mismas variables, sí se observa que estas dos variables tienen un efecto positivo elevado en todos los casos, con lo que al aumentar el valor de estas variables se incrementa el %eficacia en la extracción, tal y como se observa en las correspondientes superficies de respuesta proporcionadas por el diseño (Figura 54).

Las demás variables tienen una mayor o menor influencia sobre la extracción en el intervalo estudiado, pero como se observa en los gráficos obtenidos, no superan el nivel de significación establecido por el método para un 95% de confianza (representado por la línea vertical). En lo que respecta al ácido clorhídrico se observa que no llega a ser en ningún caso una variable estadísticamente significativa, pero su efecto estimado es bastante elevado y positivo en todos los casos.

La temperatura de extracción y el caudal de sonicación tienen un efecto bajo y negativo en todos los casos. Con respecto al tiempo de sonicación y al volumen de disolución extractante, estas dos variables tienen efectos estimados bajos de valor positivo, excepto en el caso de las muestras de carne donde la variable tiempo de sonicación toma un valor negativo (-1,1) muy cercano al cero en valor absoluto, por lo que su significancia es casi nula en la extracción.

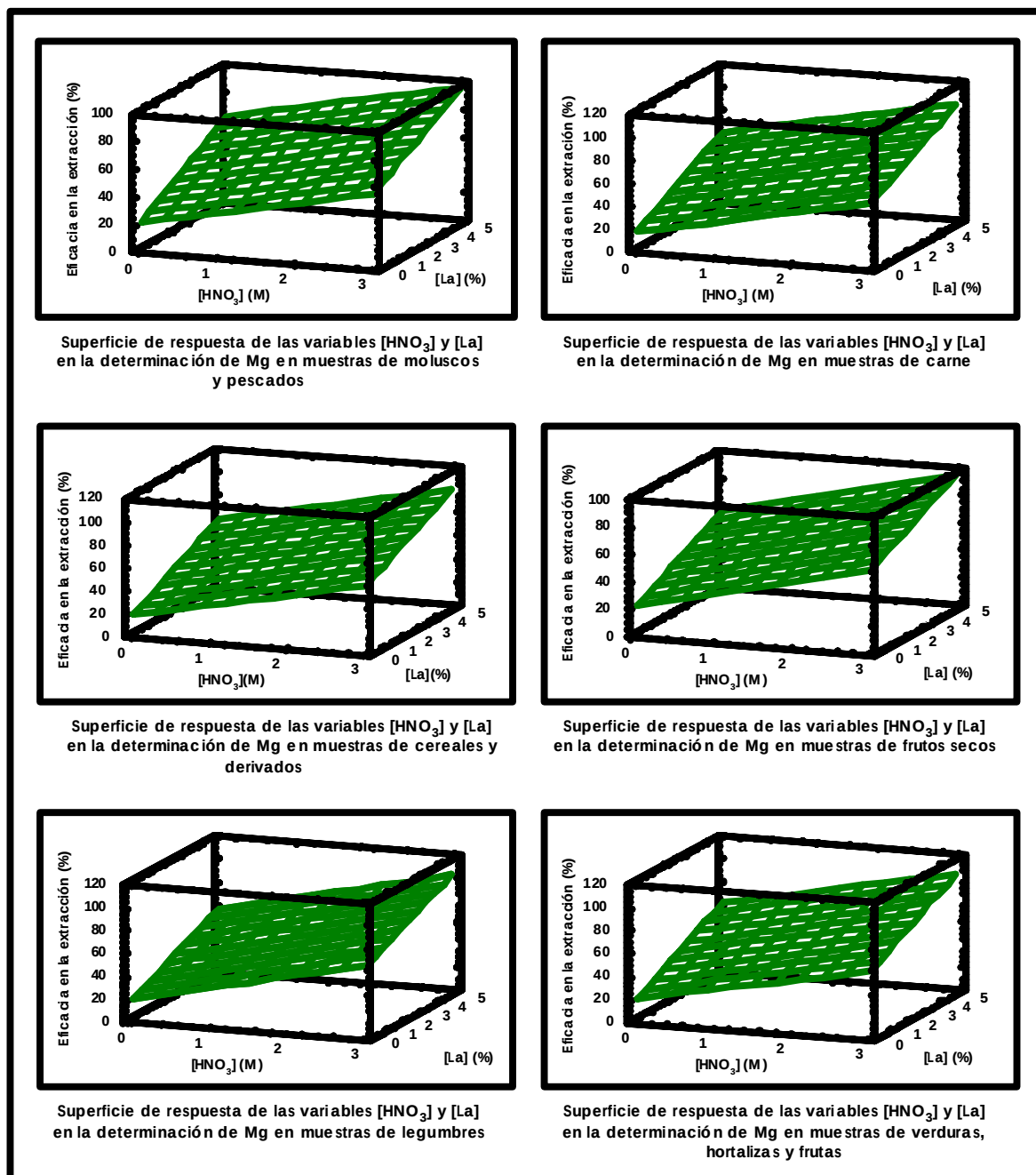


Figura 54. Superficies de respuesta proporcionadas por el diseño de Plackett-Burman para las variables de mayor peso estadístico en la determinación de magnesio en todos los tipos de muestra estudiados (las demás variables toman el valor medio del intervalo de estudio establecido)

Si se comparan los resultados obtenidos por el diseño de Plackett-Burman para la extracción de magnesio con la extracción de calcio en los mismos tipos de muestras, debido a la similitud de ambos procesos, se observa que las Cartas Pareto obtenidas para las muestras de carne, cereales y derivados y legumbres son prácticamente idénticas.

Una vez analizados los resultados obtenidos al aplicar el diseño de Plackett-Burman, los valores óptimos según el diseño de Screening para cada una de las variables son los recogidos en la Tabla 127.

Tabla 127. Valores óptimos para cada una de las variables implicadas en el proceso de extracción de magnesio de los diferentes tipos de muestras según el diseño de Plackett-Burman

Variables	VALORES ÓPTIMOS PARA CADA UNA DE LAS VARIABLES SEGÚN EL DISEÑO DE PLACKETT-BURMAN					
	Moluscos y pescados ^a	Carnes	Cereales y derivados	Frutos secos	Legumbres	Verduras, hortalizas y frutas
A (M)	3	3	3	3	3	3
B (M)	3	3	3	3	3	3
C (min)	5	0,5	5	5	5	5
D (°C)	20	20	20	20	20	20
E (mL/min)	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
F (mL)	5	5	5	5	5	5
G (%)	5	5	5	5	5	5

A, [HNO₃]; B, [HCl]; C, Tiempo sonicación; D, Temperatura de extracción; E, Caudal de extracción; F, Volumen de disolución extractante; G, [La].

a. En el caso de las muestras de moluscos y pescados el volumen de disolución extractante se ha estudiado entre 2-5mL dado que las [Mg] encontradas en este tipo de muestras son muy elevadas

Como el diseño de Plackett-Burman proporciona las tendencias las variables hacia el óptimo, y no el valor óptimo en sí mismo, se realizaron una serie de experimentos fuera del marco del diseño, de acuerdo con los resultados obtenidos por el mismo, para determinar los valores óptimos de cada una de las variables que afectan a la extracción de magnesio en los diferentes tipos de muestras objeto de estudio.

- **Experimentos realizados fuera del marco del diseño**
- **Experimentos realizados para la optimización de la extracción de magnesio en las muestras de Moluscos y Pescados**

La extracción de magnesio en muestras de moluscos y pescados, como ha indicado el diseño factorial aplicado (Figura 53), está afectada

significativamente sólo por la concentración de lantano, pero tienen efectos positivos muy importantes las concentraciones de los ácidos constituyentes de la disolución extractante.

Empezando el estudio fuera del marco del diseño por aquellas variables que afectan en menor grado al proceso de extracción, se ha observado que a una **temperatura de la extracción** de 20 °C y utilizando un **volumen de la disolución extractante** de 2mL (límite inferior establecido para estas muestras debido a las elevadas concentraciones de magnesio que presentan) se pueden obtener %eficacia en la extracción cuantitativos (101,9%, experimento 1 de la matriz del diseño, Tabla 126). Como al minimizar los valores de estas dos variables, se simplifica el proceso y se incrementa la sensibilidad de los resultados, serán estos dos los valores considerados como óptimos para las mismas.

El **caudal de extracción** es la otra variable no significativa del proceso, y como en los anteriores casos esta variable se ha optimizado con al **tiempo de sonicación**, debido a la relación existente entre las mismas (Figura 55). En los resultados obtenidos, se observa que el menor tiempo de extracción necesario para obtener %eficacias en la extracción cuantitativos es de 2,0 min a un caudal de 6 mL/min. Debido a que el objetivo es conseguir que el tiempo de análisis sea el mínimo, estos son los valores considerados óptimos para estas dos variables.

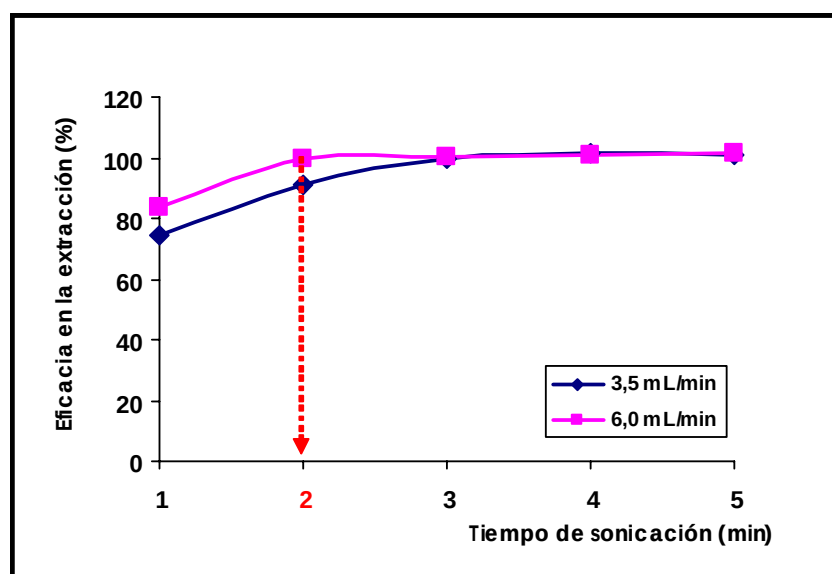


Figura 55. Experimentos realizados para la optimización del tiempo de sonicación a un caudal de extracción de 3,5 mL/min y 6,0 mL/min. $[\text{HNO}_3]=3\text{M}$; $[\text{HCl}]=3\text{M}$; Temperatura de extracción= 20°C ; Volumen de disolución extractante=2mL; $[\text{La}]=5\%$

Los **componentes de la disolución extractante**, no son variables significativas del proceso, pero tienen efectos bastante elevados y son similares entre sí. Como el objetivo es disminuir al máximo la concentración ácida necesaria para obtener %eficacia en la extracción cuantitativos, se ha estudiado la posibilidad de eliminar uno de los componentes de la disolución ácida y/o de disminuir al máximo su concentración (Tablas 128 y 129). De los resultados obtenidos, se concluye que no es necesaria la presencia de ambos ácidos en la disolución extractante, y que la mínima concentración de ambos necesaria para poder extraer cuantitativamente el metal es de 3M, bien sea de HNO_3 o de HCl . Por tanto, serán estas las dos disoluciones extractantes consideradas como óptimas para este proceso. En los posteriores estudios de la extracción de magnesio en muestras de moluscos y pescados se utilizará una disolución de HNO_3 3M simplemente por tomar uno de los valores óptimos, pero no porque se obtengan mejores resultados que con el HCl 3M.

Tabla 128. Experimentos realizados para la optimización de la concentración de HNO_3

[HNO_3] (M) ^a	[Mg] $\mu\text{g/g}^b$	(%) Eficacia en la extracción
3,0	4917,1 $\pm$ 10,7	101,6
1,5	4522,9 $\pm$ 0,0	93,5

a. [HCl]=0M; Tiempo de sonicación=2,0 min; Temperatura de extracción= 20°C; Caudal de extracción=6,0 mL/min; Volumen de disolución extractante=2mL; [La]=5%.

b. [Mg] = Media $\pm$ desviación estándar (n=3)

Tabla 129. Experimentos realizados para la optimización de la concentración de HCl

[HCl] (M) ^a	[Mg] $\mu\text{g/g}^b$	(%) Eficacia en la extracción
3	4855,5 $\pm$ 18,5	100,3
1,5	4855,5 $\pm$ 10,7	91,0

a. [HNO_3]=0M; Tiempo de sonicación=2,0 min; Temperatura de extracción= 20°C; Caudal de extracción=6,0 mL/min; Volumen de disolución extractante=2mL; [La]=5%.

b. [Mg] = Media $\pm$ desviación estándar (n=3)

Además, se ha estudiado la posibilidad de disminuir la concentración de lantano, a pesar de que es la variable significativa del proceso, ya que en el diseño se ha estudiado entre un 0% y un 5%, y se vió factible la posibilidad de disminuir su concentración (Tabla 130). De hecho, en el estudio realizado ha comprobado que una concentración de un 2% es suficiente para eliminar las interferencias químicas del metal.

Tabla 130. Experimentos realizados para la optimización de la concentración de lantano

[La] (%) ^a	[Mg] $\mu\text{g/g}^b$	(%)Eficacia en la extracción
5	4898,7 $\pm$ 10,7	101,2
4	4874,0 $\pm$ 18,5	100,7
3	4855,5 $\pm$ 18,5	100,3
2	4886,3 $\pm$ 10,7	101,0
1	3882,3 $\pm$ 10,7	80,2

a. [HNO_3]=3M; [HCl]=0M; Tiempo de sonicación= 2 min; Temperatura de extracción= 20°C; Caudal de extracción=6,0 mL/min; Volumen de disolución extractante=2mL

b. [Mg] = * Media $\pm$ desviación estándar (S.D.) (n=3)

Los valores óptimos para cada variable implicada en la extracción de magnesio en las muestras de moluscos y pescados se indican en la Tabla 131.

Tabla 131. Valores óptimos para cada una de las variables implicadas en el proceso de extracción de magnesio de las muestras de moluscos y pescados

VARIABLE	VALORES ÓPTIMOS PARA CADA UNA DE LAS VARIABLES
[HNO ₃]	3 M/ 0M
[HCl]	0 M/3M
Tiempo de sonicación	2 min
Temperatura de extracción	20 °C
Caudal de extracción	6,0 mL/min
Volumen de disolución extractante	2mL
[La]	2 %

- **Experimentos realizados para la optimización de la extracción de magnesio en muestras de Carne**

Las variables que afectan a la extracción de magnesio tienen un comportamiento diferente al de las muestras de moluscos y pescados. En este caso, hay dos variables que afectan significativamente al proceso, la concentración de La y la concentración de HNO₃. La concentración de HCl es una variable de elevado efecto positivo, pero en este caso no llega a ser significativa.

Con respecto a las variables no significativas, la **temperatura de extracción** y el **volumen de disolución extractante**, se ha observado que se pueden obtener %eficacia en la extracción cuantitativos cuando estas variables se fijan en 20°C y 1mL (experimento 1, Tabla 126). Debido que al minimizar estos valores se mejoran las características del proceso, éstos serán los valores considerados como óptimos para estas dos variables.

La variable **tiempo de sonicación** se ha estudiado conjuntamente con el **caudal de extracción**, debido a que estas dos variables están relacionadas, con el objetivo de minimizar el tiempo de análisis (Figura 56). En los estudios realizados se observa que sólo son necesarios 0,5 min a un caudal de 6,0 mL/min para obtener %eficacia en la extracción cuantitativos, y debido a que proporcionan la frecuencia de muestreo más elevada, éstos dos son los valores considerados como óptimos para estas dos variables.

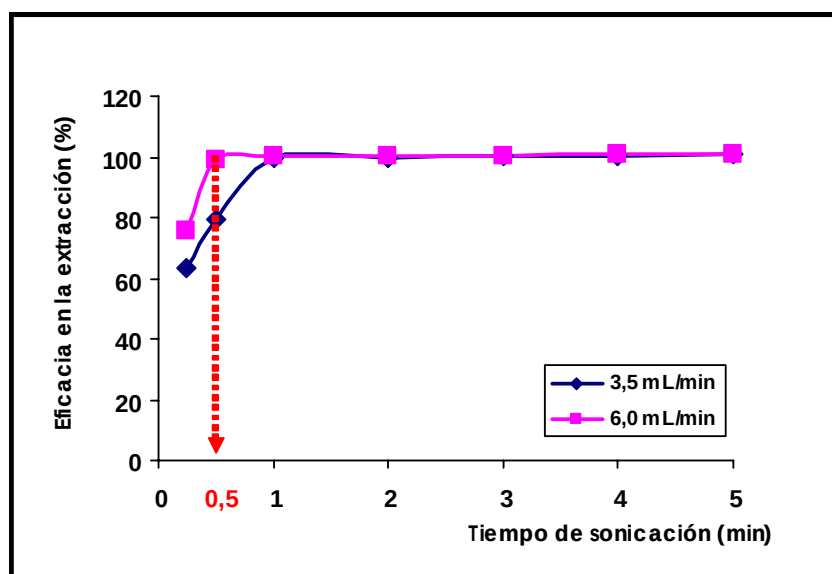


Figura 56. Experimentos realizados para la optimización del tiempo de sonicación a un caudal de extracción de 3,5 mL/min y 6,0 mL/min. $[\text{HNO}_3]=3\text{M}$; $[\text{HCl}]=3\text{M}$; Temperatura de extracción= 20°C ; Volumen de disolución extractante=1mL; $[\text{La}]=5\%$

Con respecto a las **concentraciones de los ácidos de la disolución extractante**, el objetivo es disminuir estas concentraciones al máximo. Por ello, como la concentración de HNO_3 es significativa, y la concentración de HCl no lo es, se ha estudiado, por una parte la posibilidad de eliminar el HCl de la disolución extractante (Tabla 132), y por otra, la posibilidad de disminuir al máximo la concentración de HNO_3 presente en esta disolución (Tabla 133). Se ha observado que se pueden obtener %eficacia en la extracción cuantitativos eliminando el HCl de la disolución extractante, manteniendo una concentración de HNO_3 3M. Además, en el estudio de la disminución de la concentración de HNO_3 se ha demostrado experimentalmente que una concentración 1,5 M proporciona %eficacia en la extracción cuantitativos (100,7%), y por ello esta será la disolución considerada como óptima para la extracción de magnesio en este tipo de muestras.

Tabla 132. Experimentos realizados para la optimización de la concentración de HCl

[HCl] (M) ^a	[Mg] µg/g ^b	(%) Eficacia en la extracción
3,0	779,1 ± 3,9	100,8
1,5	781,7 ± 2,3	101,2
0,0	780,4 ± 2,3	101,0

a. [HNO₃]=3M; Tiempo de sonicación=0,5 min; Temperatura de extracción= 20°C; Caudal de extracción=6,0 mL/min; Volumen de disolución extractante=1mL; [La]=5%.

b. [Mg] = Media ± desviación estándar (n=3)

Tabla 133. Experimentos realizados para la optimización de la concentración de HNO₃

[HNO ₃] (M) ^a	[Mg] µg/g ^b	(%) Eficacia en la extracción
3	780,4 ± 2,3	101,0
1,5	777,8 ± 2,3	100,7
0,75	661,4 ± 3,9	85,6

a. [HCl]=0M; Tiempo de sonicación=0,5 min; Temperatura de extracción= 20°C; Caudal de extracción=6,0 mL/min; Volumen de disolución extractante=1mL; [La]=5%.

b. [Mg] = Media ± desviación estándar n=3)

La concentración de lantano es la otra variable significativa del proceso y tiene un efecto estimado positivo, pero a pesar de ello, como se ha venido haciendo en todos los casos, se ha estudiado la posibilidad de disminuir la concentración de este reactivo, y se ha observado que una disolución de La 2% es suficiente para eliminar las interferencias químicas del metal (Tabla 134).

Tabla 134. Experimentos realizados para la optimización de la concentración de lantano

[La] (%) ^a	[Mg] µg/g ^b	(%)Eficacia en la extracción
5	780,4 ± 2,3	101,0
4	775,2 ± 3,9	100,3
3	776,5 ± 2,3	100,5
2	772,5 ± 2,3	100,0
1	634,0 ± 3,9	82,1

a. [HNO₃]=1,5M; [HCl]=0M; Tiempo de sonicación= 0,5 min; Temperatura de extracción= 20°C; Caudal de extracción=6,0 mL/min; Volumen de disolución extractante=1mL

b. [Mg] = * Media ± desviación estándar (n=3)

Los valores óptimos para cada variable implicada en la extracción de magnesio en las muestras de carne se indican en la Tabla 135.

Tabla 135. Valores óptimos para cada una de las variables implicadas en el proceso de extracción de magnesio de las muestras de carne

VARIABLE	VALORES ÓPTIMOS PARA CADA UNA DE LAS VARIABLES
[HNO ₃]	1,5 M
[HCl]	0M
Tiempo de sonicación	0,5 min
Temperatura de extracción	20 °C
Caudal de extracción	6,0 mL/min
Volumen de disolución extractante	1mL
La	2%

- **Experimentos realizados para la optimización de la extracción de magnesio en las muestras de Cereales y Derivados**

En la extracción magnesio en muestras de cereales y derivados las variables significativas son las concentraciones de La y HNO₃. La concentración de HCl tiene un efecto estimado positivo elevado pero no llega a ser una variable significativa.

Con respecto a las variables no significativas **temperatura de extracción** y el **volumen de disolución extractante**, se observa en el experimento 1 de la matriz del diseño (Tabla 126) que tomando sus valores más bajos establecidos dentro del intervalo estudiado, 1mL y 20°C, respectivamente, el %eficacia en la extracción obtenido es cuantitativo (100,2%), por lo que éstos serán los valores óptimos considerados para estas variables.

El **caudal de extracción** se ha estudiado con el **tiempo de sonicación**, dado que estas variables están relacionadas, con el objetivo de disminuir al máximo el tiempo de análisis (Figura 57). En los resultados obtenidos se observa comprueba que el menor tiempo de sonicación es 0,5 min a un caudal de 6mL/min, y por ello, éstos son los valores considerados como óptimos para estas dos variables.

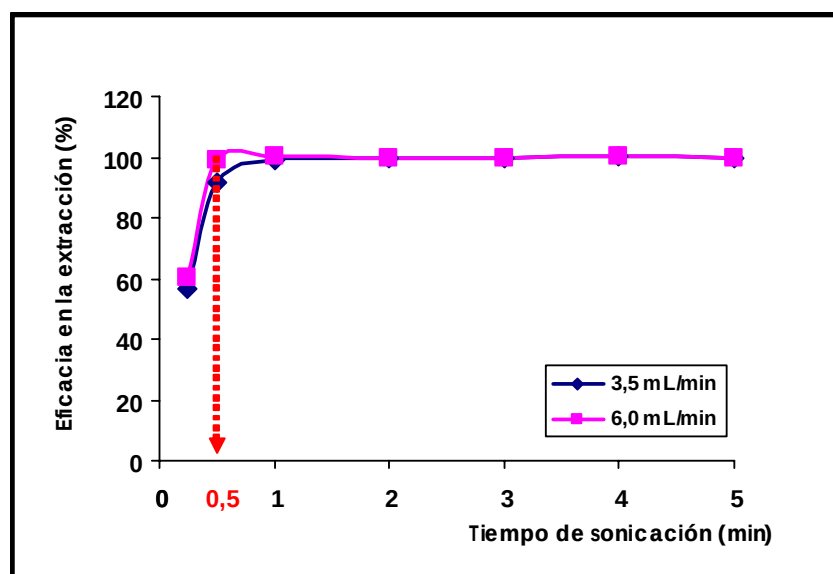


Figura 57. Experimentos realizados para la optimización del tiempo de sonicación a un caudal de extracción de 3,5 mL/min y 6,0 mL/min. $[\text{HNO}_3]=3\text{M}$; $[\text{HCl}]=3\text{M}$; Temperatura de extracción= 20°C ; Volumen de disolución extractante=1mL; $[\text{La}]=5\%$

Con respecto a las **concentraciones de los ácidos** se estudió la posibilidad de eliminar el HCl, ya que este ácido no llega a ser una variable significativa en el proceso, caso contrario de lo que ocurre con el HNO_3 . Se observa que si se elimina de la disolución extractante este ácido, es decir, si se utiliza sólo una disolución de HNO_3 3M, se obtienen %eficacia en la extracción cuantitativos (Tabla 136).

Tabla 136. Experimentos realizados para la optimización de la concentración de HCl

$[\text{HCl}]$ (M) ^a	$[\text{Mg}]$ $\mu\text{g/g}^b$	(%) Eficacia en la extracción
3,0	$290,2 \pm 1,1$	100,5
1,5	$287,6 \pm 2,0$	99,5
0	$288,2 \pm 1,1$	99,8

a. $[\text{HNO}_3]=3\text{M}$; Tiempo de sonicación=0,5 min; Temperatura de extracción= 20°C ; Caudal de extracción=6,0 mL/min; Volumen de disolución extractante=1mL; $[\text{La}]=5\%$.

b. $[\text{Mg}]$ = Media $\pm$ desviación estándar (n=3)

Una vez eliminado el HCl de la disolución extractante, se ha estudiado la posibilidad de disminuir la concentración de HNO_3 y se ha observado que una concentración 0,5 M es suficiente para obtener %eficacia en la extracción cuantitativos (Tabla 137).

Tabla 137. Experimentos realizados para la optimización de la concentración de HNO_3

$[\text{HNO}_3]$ (M) ^a	$[\text{Mg}]$ $\mu\text{g/g}^b$	(%) Eficacia en la extracción
3	$288,2 \pm 1,1$	99,8
1,5	$288,9 \pm 1,1$	100,0
0,75	$289,5 \pm 2,0$	100,2
0,5	$288,2 \pm 1,1$	99,8
0,25	$189,5 \pm 2,0$	65,6

a. $[\text{HCl}]=0\text{M}$; Tiempo de sonicación=0,5 min; Temperatura de extracción= 20°C ; Caudal de extracción=6,0 mL/min; Volumen de disolución extractante=1mL; $[\text{La}]=5\%$.

b. $[\text{Mg}]$ = Media $\pm$ desviación estándar (n=3)

La concentración de lantano es la otra variable significativa del proceso y tiene un efecto estimado positivo, pero a pesar de ello, se ha comprobado que una disolución de La 2% es suficiente para eliminar las interferencias químicas del magnesio en este tipo de muestras (Tabla 138).

Tabla 138. Experimentos realizados para la optimización de la concentración de lantano

$[\text{La}]$ (%) ^a	$[\text{Mg}]$ $\mu\text{g/g}^b$	(%)Eficacia en la extracción
5	$290,8 \pm 1,1$	100,7
4	$288,9 \pm 1,1$	100,0
3	$287,6 \pm 0,0$	99,5
2	$285,6 \pm 0,0$	98,9
1	$230,7 \pm 2,0$	79,9

a. $[\text{HNO}_3]=0,5\text{M}$; $[\text{HCl}]=0\text{M}$; Tiempo de sonicación= 0,5 min; Temperatura de extracción= 20°C ; Caudal de extracción=6,0 mL/min; Volumen de disolución extractante=1mL

b. $[\text{Mg}]$ = Media $\pm$ desviación estándar (n=3)

Los valores óptimos para cada variable implicada en la extracción de magnesio en las muestras de cereales y derivados se indican en la Tabla 139.

Tabla 139. Valores óptimos para cada una de las variables implicadas en el proceso de extracción de magnesio de las muestras de cereales y derivados

VARIABLE	VALORES ÓPTIMOS PARA CADA UNA DE LAS VARIABLES
[HNO ₃]	0,5 M
[HCl]	0M
Tiempo de sonicación	0,5 min
Temperatura de extracción	20 °C
Caudal de extracción	6,0 mL/min
Volumen de disolución extractante	1mL
La	2%

- **Experimentos realizados para la optimización de la extracción de magnesio muestras de Frutos Secos**

En el caso de la determinación de magnesio en frutos no hay ninguna variable significativa en el proceso, pero hay que tener en cuenta que hay tres variables de elevados efectos estimados que son la concentración de HNO₃, la concentración de La y la concentración de HCl.

Comenzando el estudio por las variables de menor influencia en la extracción, se ha observado que cuando la **temperatura de extracción** y el **volumen de disolución extractante** toman valor mínimo dentro del intervalo de estudio establecido en el diseño (experimentos 1 de la matriz del diseño, Tabla 126) se obtiene un %eficacia en la extracción del 100,5%. Como al minimizar los valores de estas dos variables se mejoran las características del proceso, 1mL y 20°C serán los valores óptimos considerados para estas dos variables.

Con respecto al estudio del **tiempo de sonicación** y del **caudal de extracción** (Figura 58) se observa que los valores óptimos para estas dos variables, ya que con ellos se consigue la frecuencia de muestreo más elevada, son un tiempo de sonicación de 2 min y un caudal de extracción de 6 mL/min. Estos dos valores coinciden con los óptimos obtenidos en la extracción del cobre y el hierro en este mismo tipo de muestra.

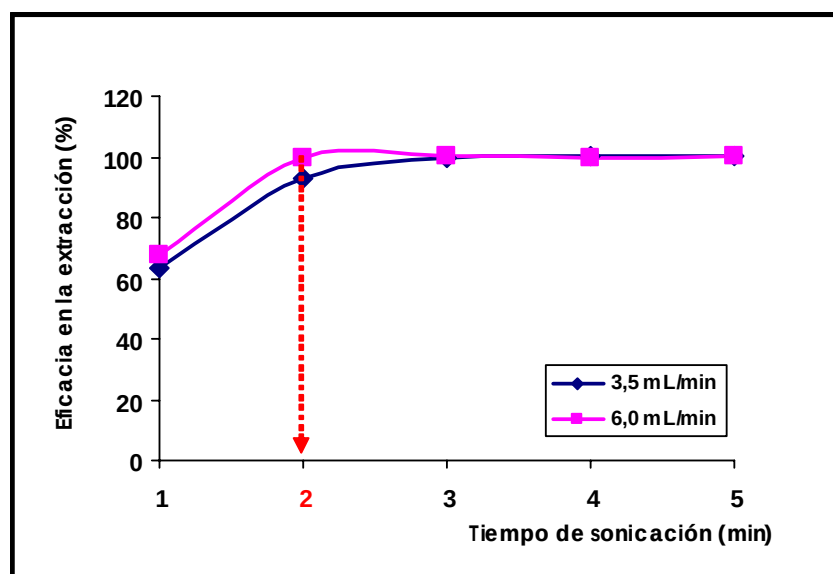


Figura 58. Experimentos realizados para la optimización del tiempo de sonicación a un caudal de extracción de 3,5 mL/min y 6,0 mL/min. $[\text{HNO}_3]=3\text{M}$; $[\text{HCl}]=3\text{M}$; Temperatura de extracción= 20°C ; Volumen de disolución extractante=1mL; $[\text{La}]=5\%$

A pesar de que ninguna de las **concentraciones de los ácidos** constituyentes de la disolución extractante sea una variable significativa, ambas variables presentan efectos estimados elevados y positivos. Así, se ha estudiado la posibilidad de eliminar uno de los dos ácidos de la disolución extractante. Se ha estudiado en concreto la posibilidad de eliminar el HCl, ya que, en principio, parece ser el ácido de menor importancia en la extracción (Tabla 140). En los resultados obtenidos se ha demostrado que eliminando el HCl de la disolución extractante y manteniendo una concentración de HNO_3 3M se obtienen %eficacia en la extracción cuantitativos (100,1%).

Tabla 140. Experimentos realizados para la optimización de la concentración de HCl

$[\text{HCl}] \text{ (M)}^{\text{a}}$	$[\text{Mg}] \mu\text{g/g}^{\text{b}}$	(%) Eficacia en la extracción
3,0	$1454,5 \pm 5,3$	100,7
1,5	$1457,6 \pm 9,2$	100,9
0	$1445,3 \pm 5,3$	100,1

a. $[\text{HNO}_3]=3\text{M}$; Tiempo de sonicación=2 min; Temperatura de extracción= 20°C ; Caudal de extracción=6,0 mL/min; Volumen de disolución extractante=1mL; $[\text{La}]=5\%$.

b. $[\text{Mg}]$ = Media $\pm$ desviación estándar (n=3)

Una vez eliminado el HCl de la disolución extractante, se ha estudiado la posibilidad de disminuir la concentración de HNO_3 al máximo, y se ha observado que concentraciones menores de 3M de este ácido no proporcionan %eficacia en la extracción cuantitativos (con una disolución extractante de HNO_3 1,5 M se obtiene un %extracción de 79,6%). En consecuencia, se ha considerado como disolución extractante óptima HNO_3 3M.

La concentración de lantano es la variable de mayor efecto en el proceso y tiene un efecto estimado positivo, pero a pesar de ello, se ha observado que, como en todos los casos anteriores, una disolución de La 2% es suficiente para eliminar las interferencias químicas (Tabla141).

Tabla 141. Experimentos realizados para la optimización de la concentración de lantano

[La] (%) ^a	[Mg] $\mu\text{g/g}^b$	(%)Eficacia en la extracción
5	1445,3 $\pm$ 5,3	100,1
4	1448,4 $\pm$ 9,2	100,3
3	1442,2 $\pm$ 5,3	99,8
2	1442,2 $\pm$ 5,3	99,8
1	1078,8 $\pm$ 0,0	74,7

a. $[\text{HNO}_3]=3\text{M}$; $[\text{HCl}]=0\text{M}$; Tiempo de sonicación= 2 min; Temperatura de extracción= 20°C; Caudal de extracción=6,0 mL/min; Volumen de disolución extractante=1mL.

b. [Mg] = * Media $\pm$ desviación estándar (n=3)

Los valores óptimos para cada variable implicada en la extracción de magnesio en las muestras de frutos secos se indican en la Tabla 142.

Tabla 142. Valores óptimos para cada una de las variables implicadas en el proceso de extracción de magnesio de las muestras de frutos secos

VARIABLE	VALORES ÓPTIMOS PARA CADA UNA DE LAS VARIABLES
[HNO_3]	3M
[HCl]	0M
Tiempo de sonicación	2 min
Temperatura de extracción	20 °C
Caudal de extracción	6,0 mL/min
Volumen de disolución extractante	1mL
La	2%

- Experimentos realizados para la optimización de la extracción de magnesio en las muestras de Legumbres

En el proceso de extracción de magnesio en las muestras de legumbres hay dos variables significativas que son la concentración de HNO_3 y la concentración de lantano. La concentración de HCl no es una variable significativa pero sí presenta un importante efecto estimado positivo.

Los valores considerados como óptimos para las variables **volumen de disolución extractante** y **temperatura de extracción** son, como en los casos anteriores, 1mL y 20°C, respectivamente, ya que se obtienen %eficacia en la extracción cuantitativos (99,9%) cuando estas dos variables toman estos valores (experimento 1 de la matriz de Plackett-Burman, Tabla 126).

Con respecto a las variables **caudal de extracción** y **tiempo de sonicación**, se han estudiado la combinación de las mismas con el objetivo de obtener la frecuencia de muestreo más elevada (Figura 59). En los resultados obtenidos se observa que la mayor frecuencia de muestreo siendo la extracción cuantitativa se consigue a un caudal de 6,0 mL/min y con un tiempo de sonicación de 1 min, siendo por tanto, éstos los valores considerados como óptimos para estas dos variables.

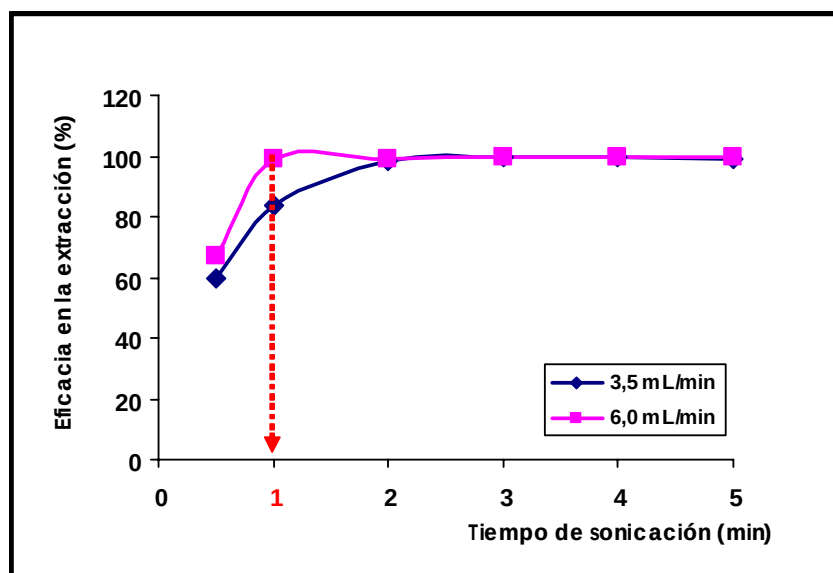


Figura 59. Experimentos realizados para la optimización del tiempo de sonicación a un caudal de extracción de 3,5 mL/min y 6,0 mL/min. $[\text{HNO}_3]=3\text{M}$; $[\text{HCl}]=3\text{M}$; Temperatura de extracción= 20°C; Volumen de disolución extractante=1mL; $[\text{La}]=5\%$

En el estudio llevado a cabo con las **concentraciones de los ácidos** se estudió la posibilidad de disminuir la concentración ácida presente en la disolución extractante. Para ello, se comenzó estudiando la posibilidad de utilizar sólo uno de los ácidos en esta disolución, y como el HNO_3 , según los resultados del diseño, tiene un efecto positivo en la extracción mucho mayor que el HCl (este último ácido no es significativo en el proceso), se estudió la posibilidad de eliminar este último (Tabla 143). En los resultados obtenidos se observa que eliminando el HCl y utilizando HNO_3 3M como disolución extractante se obtienen %extracción cuantitativos (99,2%).

Tabla 143. Experimentos realizados para la optimización de la concentración de HCl

[HCl] (M) ^a	[Mg] $\mu\text{g/g}^b$	(%) Eficacia en la extracción
3	1180,6 $\pm$ 3,4	99,5
1,5	1178,7 $\pm$ 5,9	99,4
0	1176,7 $\pm$ 3,4	99,2

a. $[\text{HNO}_3]=0\text{M}$; Tiempo de sonicación=1 min; Temperatura de extracción= 20°C; Caudal de extracción=6,0 mL/min; Volumen de disolución extractante=1mL; [La]=5%.

b. [Mg] = Media $\pm$ desviación estándar (S.D.) (n=3)

Una vez eliminado el HCl de la disolución extractante, se ha estudiado la posibilidad de disminuir la concentración de HNO_3 al máximo, y se ha observado que concentraciones menores de 3M no proporcionan %eficacia en la extracción cuantitativos. Por lo que será esta la disolución extractante óptima para el proceso (con una disolución extractante de HNO_3 1,5 M se obtiene un %extracción de 80,2%).

La concentración de lantano es la segunda variable significativa en cuanto a efectos estimados se refiere, pero dado que el intervalo de concentraciones establecido en el diseño es relativamente amplio, se ha estudiado la posibilidad de poder disminuir la concentración necesaria para eliminar las interferencias químicas del metal (Tabla 144). En este estudio se ha observado, de nuevo, que una concentración de La 2% es suficiente para eliminar dichas interferencias.

Tabla 144. Experimentos realizados para la optimización de la concentración de lantano

[La] (%) ^a	[Mg] µg/g ^b	(%)Eficacia en la extracción
5	1184,6 ± 5,9	99,9
4	1182,6 ± 3,4	99,7
3	1182,6 ± 3,4	99,7
2	1176,7 ± 3,4	99,2
1	890,9 ± 5,9	75,1

a. [HNO₃]=3M; [HCl]=0M; Tiempo de sonicación=1 min; Temperatura de extracción= 20°C; Caudal de extracción=6,0 mL/min; Volumen de disolución extractante=1mL.

b. [Mg] = * Media ± desviación estándar (n=3)

Los valores óptimos para cada variable implicada en la extracción de magnesio en las muestras de legumbres se indican en la Tabla 145.

Tabla 145. Valores óptimos para cada una de las variables implicadas en el proceso de extracción de magnesio de las muestras de legumbres

VARIABLE	VALORES ÓPTIMOS PARA CADA UNA DE LAS VARIABLES
[HNO ₃]	3M
[HCl]	0M
Tiempo de sonicación	1 min
Temperatura de extracción	20 °C
Caudal de extracción	6,0 mL/min
Volumen de disolución extractante	1mL
La	2%

- Experimentos realizados para la optimización de la extracción de magnesio en las muestras de Verduras, Hortalizas y Frutas**

En el proceso de extracción de magnesio en muestras de verduras, hortalizas y frutas las variables significativas son las concentraciones de La y HNO₃. En estos casos la concentración de HCl tiene un importante efecto positivo, pero no llega a ser una variable significativa.

Comenzando el estudio por las variables **temperatura de extracción** y **volumen de disolución extractante**, se observa que, 1mL y 20°C son los valores óptimos para estas variables, ya que con ellos se obtienen %eficacia en la

extracción cuantitativos (experimento 1 de la matriz de Plackett-Burman, Tabla 126).

El **caudal de extracción** se ha estudiado con el **tiempo de sonicación** debido a que estas dos variables están relacionadas (Figura 60). En los resultados obtenidos en los diferentes experimentos realizados se observa que un tiempo de sonicación de 0,5 min a un caudal de 6mL/min, es suficiente para extraer cuantitativamente el magnesio de este tipo de muestras. Por tanto, como el objetivo es que el tiempo de análisis sea el menor posible, éstos serán los valores considerados como óptimos para estas dos variables.

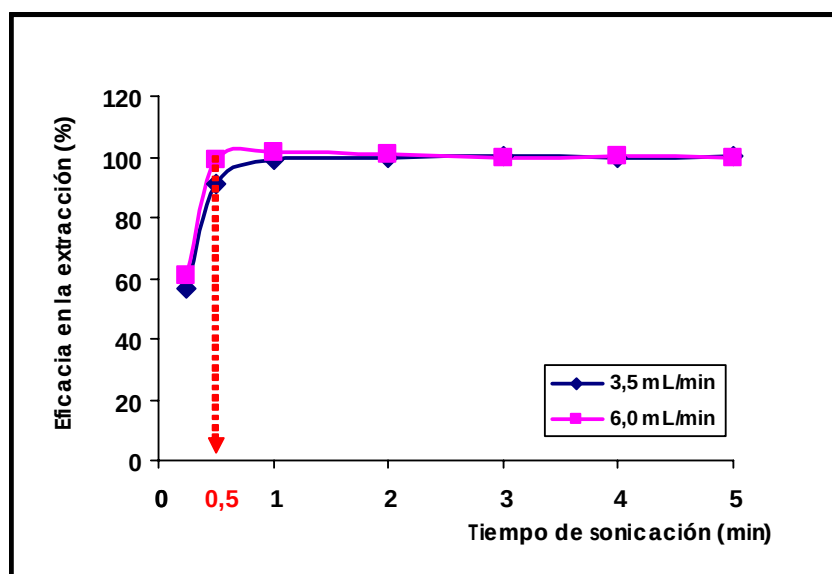


Figura 60. Experimentos realizados para la optimización del tiempo de sonicación a un caudal de extracción de 3,5 mL/min y 6,0 mL/min. $[\text{HNO}_3]=3\text{M}$; $[\text{HCl}]=3\text{M}$; Temperatura de extracción= 20°C ; Volumen de disolución extractante=1mL; $[\text{La}]=5\%$

Con respecto a las concentraciones de los **ácidos constituyentes de la disolución extractante**, se estudió la posibilidad de disminuir la concentración ácida presente en la disolución extractante. Para ello, se comenzó estudiando la posibilidad de utilizar sólo el HNO_3 , variable significativa, y eliminar el HCl de esta disolución, ya que esta variable tiene un efecto estimado menor y no llega a ser una variable significativa en el proceso (Tabla 146). En los resultados obtenidos se observa que eliminando el HCl y utilizando HNO_3 3M como disolución extractante se obtienen %eficacia en la extracción cuantitativos (99,5%).

Tabla 146. Experimentos realizados para la optimización de la concentración de HCl

[HCl] (M) ^a	[Mg] $\mu\text{g/g}^b$	(%) Eficacia en la extracción
3,0	1701 $\pm$ 5	100,1
1,5	1698 $\pm$ 9	99,9
0	1692 $\pm$ 5	99,5

a. [HNO₃]=3M; Tiempo de sonicación=0,5min; Temperatura de extracción= 20°C; Caudal de extracción=6,0 mL/min; Volumen de disolución extractante=1mL; [La]=5%.

b. [Mg] = Media $\pm$ desviación estándar (n=3)

Una vez eliminado el HCl de la disolución extractante, se ha estudiado la posibilidad de disminuir la concentración de HNO₃ al máximo, y se ha observado que una concentración 0,5M de este ácido es suficiente para obtener %extracción cuantitativos, por lo que ésta será la disolución extractante óptima (Tabla 147).

Tabla 147. Experimentos realizados para la optimización de la concentración de HNO₃

[HNO ₃] (M) ^a	[Mg] $\mu\text{g/g}^b$	(%) Eficacia en la extracción
3	1704 $\pm$ 5	100,2
1,5	1692 $\pm$ 5	99,5
0,75	1698 $\pm$ 9	99,9
0,5	1692 $\pm$ 5	99,5
0,25	1211 $\pm$ 14	71,2

a. [HCl]=0M; Tiempo de sonicación=0,5min; Temperatura de extracción= 20°C; Caudal de extracción=6,0 mL/min; Volumen de disolución extractante=1mL; [La]=5%.

b. [Mg] = Media $\pm$ desviación estándar (n=3)

La concentración de lantano es la variable significativa más importante en cuanto a efectos estimados se refiere, pero aún así, se ha estudiado la posibilidad de poder disminuir la concentración necesaria de este reactivo para eliminar las posibles interferencias del metal (Tabla 148). En este estudio se ha observado que una concentración de La 2% es suficiente para eliminar dichas interferencias.

Tabla 148. Experimentos realizados para la optimización de la concentración de lantano

[La] (%) ^a	[Mg] µg/g ^b	(%)Eficacia en la extracción
5	1722 ± 5	101,3
4	1713 ± 5	100,8
3	1698 ± 9	99,9
2	1713 ± 5	100,8
1	1322 ± 5	77,8

a. [HNO₃]=0,5M; [HCl]=0M; Tiempo de sonicación=0,5min; Temperatura de extracción= 20°C; Caudal de extracción=6,0 mL/min; Volumen de disolución extractante=1mL; [la]=5%.

b. [Mg] = * Media ± desviación estándar (n=3)

Los valores óptimos para cada variable implicada en la extracción de magnesio en las muestras de verduras, hortalizas y frutas se indican en la Tabla 149.

Tabla 149. Valores óptimos para cada una de las variables implicadas en el proceso de extracción de magnesio de las muestras de verduras, hortalizas y frutas

VARIABLE	VALORES ÓPTIMOS PARA CADA UNA DE LAS VARIABLES
[HNO ₃]	0,5M
[HCl]	0M
Tiempo de sonicación	0,5 min
Temperatura de extracción	20 °C
Caudal de extracción	6,0 mL/min
Volumen de disolución extractante	1mL
La	2%

En la Tabla 150 se muestra un resumen de los valores óptimos para cada una de las variables implicadas en el proceso de extracción de magnesio en los diferentes tipos de muestras de alimentos.

Tabla 150. Valores óptimos para cada una de las variables implicadas en el proceso de extracción de magnesio de los diferentes tipos de muestras alimenticias

Variables	VALORES ÓPTIMOS PARA CADA UNA DE LAS VARIABLES IMPLICADAS EN LA EXTRACCIÓN DE MAGNESIO EN LOS DIFERENTES TIPOS DE MUESTRAS ALIMENTICIAS					
	Moluscos y pescados	Carnes	Cereales y derivados	Frutos secos	Legumbres	Verduras, hortalizas y frutas
A (M)	3 / 0	1,5	0,5	3	3	0,5
B (M)	0 / 3	0	0	0	0	0
C (min)	2	0,5	0,5	2	1	0,5
D (°C)	20	20	20	20	20	20
E (mL/min)	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
F (mL)	2	1	1	1	1	1
G(%)	2	2	2	2	2	2

A, [HNO₃]; B, [HCl]; C, Tiempo sonicación; D, Temperatura de extracción; E, Caudal de extracción; F, Volumen de disolución extractante; G, [La]

En los valores óptimos obtenidos para la extracción de magnesio de los diferentes tipos de muestras, se observa que, en lo que respecta a las concentraciones de los ácidos constituyentes la disolución extractante, se puede eliminar en todos los casos el HCl, y que el HNO₃, en diferentes concentraciones, proporciona %eficacia en la extracción cuantitativos. Sólo en el caso de las muestras de moluscos y pescados se observa que ambos ácidos tienen el mismo poder extractante a una concentración 3M. Entre las diferentes muestras, aquellas que necesitan una mayor concentración ácida (HNO₃ 3M) para extraer cuantitativamente el metal son los moluscos y pescados, los frutos secos y las legumbres. A estas muestras le siguen, en cuanto a concentración ácida necesaria para extraer el metal se refiere, las muestras de carnes que necesitan una disolución de HNO₃1,5 M y finalmente se encuentran las muestras de cereales y derivados y verduras, hortalizas y frutas en las que sólo es necesaria una concentración 0,5 M para extraer el magnesio de las mismas.

En cuanto al tiempo de extracción, se observa que para casi todos los tipos de muestras son necesarios sólo 0,5 min para extraer cuantitativamente el magnesio. Las legumbres necesitan 1 min de tiempo, y en el caso de los

moluscos y pescados y los frutos secos son necesarios 2 min. El caudal óptimo en todos los casos es de 6mL/min.

En el caso de la temperatura de extracción, el volumen de disolución y la concentración de La se observa que el valor óptimo para cada variable es el mismo para todos los tipos de muestras (20°C, 1mL y 2%, respectivamente). Sólo, en el caso de los moluscos y pescados, el volumen óptimo de disolución extractante no es de 1mL, sino de 2mL. Esto se debe a las elevadas concentraciones de magnesio presentes en este tipo de muestras que no permiten utilizar 1mL de disolución, ya que las señales de absorbancia estarían fuera del intervalo lineal para el magnesio.

4.1.5.1 Estudio de la cantidad de muestra

En los estudios previos realizados se han utilizado las cantidades de muestra que se indican en la Tabla 125. La posibilidad de utilizar mayores cantidades de muestra, implicaría tener que aplicar una mayor dilución del extracto debido a las elevadas concentraciones presentes en las mismas y al intervalo lineal del magnesio en el detector (0-0,5 µg/mL). En esta situación, los resultados no implicarían una mejora en la sensibilidad, que es lo que se pretende al analizar mayores cantidades de muestra, ya que el extracto tendría que ser diluido de forma que el resultado sería idéntico al que se obtendría si se utilizase menor cantidad de muestra. Analizar menores cantidades de muestra, tampoco implicaría una mejora, pues se comete mayor error en la pesada y la sensibilidad de los resultados obtenidos sería menor.

Así, con respecto a la cantidad de muestra, las cantidades utilizadas en la optimización son las propuestas para el análisis de magnesio en las mismas.

4.1.5.2 Estudio de la influencia del tamaño de partícula de la muestra

Todos los estudios descritos anteriormente se han realizado con un diámetro de partícula menor de 30 µm. Para ver la influencia del tamaño de partícula en la extracción del magnesio se han tomado diferentes porciones de una misma

muestra (para cada tipo de matriz) con diferentes tamaños de partícula: diámetro menor de 30 μm y de diámetro comprendido entre 30-100 μm .

Para llevar a cabo este estudio se han utilizado las muestras analizadas en la optimización (Tabla 125), excepto en los casos de los cereales y derivados y las verduras, hortalizas y frutas. Esto se debe a que en la optimización se han utilizado una muestra de harina y un material de referencia de té para estos dos casos, respectivamente, muestras donde no se puede hacer un estudio del tamaño de partícula pues los diámetros de partícula de las mismas son estándar. Así, para estudiar el diámetro de partícula en estas matrices se han utilizado otras muestras que se indican en la Tabla 151.

Con las porciones de diferente diámetro de cada muestra se ha realizado por una parte el análisis utilizando el método de referencia descrito previamente (pág. 86) y por otra el análisis continuo de las mismas con las metodologías propuestas. Se han comparado los resultados obtenidos por ambas metodologías y se han calculado las eficacias en la extracción (Tabla 151). De los resultados obtenidos se deduce que el tamaño de partícula no influye en la determinación de magnesio con el sistema propuesto. Esto simplifica mucho el análisis, ya que no hay que someter la muestra a ningún tratamiento previo que garantice un cierto tamaño de partícula.

Tabla 151. Experimentos realizados en porciones de muestras con diferente tamaño de partícula para todos los tipos de muestras estudiados utilizando el método de referencia y las metodologías continuas propuestas. Se indica además la eficacia en la extracción del sistema FIA

Tipo de muestra	Muestra analizada	Tamaño de partícula	[Mg] obtenida mediante el método de referencia ($\mu\text{g/g}$)	[Mg] obtenida mediante los métodos continuos propuestos ($\mu\text{g/g}$)	(%)Eficacia en la extracción
Moluscos y pescados	Mejillón	<30 μm	4804,1 $\pm$ 35,6	4898,7 $\pm$ 10,7	101,2
		30-100 μm	4804,1 $\pm$ 35,6	4793,9 $\pm$ 10,7	99,8
Carnes	Músculo de pollo	<30 μm	772,5 $\pm$ 7,1	781,7 $\pm$ 2,3	101,2
		30-100 μm	776,1 $\pm$ 7,1	776,5 $\pm$ 2,3	100,5
Cereales y derivados	Galletas	<30 μm	221,8 $\pm$ 2,7	222,2 $\pm$ 1,1	100,2
		30-100 μm	222,4 $\pm$ 3,6	224,2 $\pm$ 1,1	100,8
Frutos secos	Nueces	<30 μm	1444,4 $\pm$ 13,6	1436,1 $\pm$ 5,3	99,4
		30-100 μm	1441,5 $\pm$ 17,8	1426,8 $\pm$ 5,3	99,0
Legumbres	Garbanzos	<30 μm	1186,2 $\pm$ 13,6	1182,6 $\pm$ 3,4	99,7
		30-100 μm	1180,2 $\pm$ 13,6	1184,6 $\pm$ 5,9	100,4
Verduras, hortalizas y frutas	Grelo	<30 μm	2183,6 $\pm$ 13,6	2178,3 $\pm$ 9,2	99,8
		30-100 μm	1649,3 $\pm$ 13,6	1642,4 $\pm$ 9,2	99,6

4.1.6 Extracción de manganeso

Para optimizar el proceso se ha utilizado un diseño factorial de Plackett-Burman $2^6 \cdot 3/16$ de resolución tipo IV con 6 grados de libertad y un punto central. Las variables que afectan a la extracción de manganeso, así como los valores máximos y mínimos, no difieren de los casos anteriores, ya que el objetivo es conocer el comportamiento de las mismas en los mismos intervalos de estudio (Tabla 57, pág. 141).

Una vez obtenida la matriz del diseño (Tabla 27), se realizaron los experimentos fijados por la misma. Para realizar estos experimentos sobre las diferentes matrices, se han utilizado materiales de referencia, en los casos en los que se certificaba la concentración de manganeso y, en los otros casos, se han utilizado muestras en las que previamente se había determinado por triplicado su concentración de manganeso utilizando el método de referencia descrito en la página 86 (Tabla 152). La cantidad de material de referencia o muestra utilizada para llevar a cabo la optimización del proceso se ha fijado en función de la concentración de manganeso presente.

Tabla 152. Muestras y materiales de referencia utilizados en la optimización del procedimiento FIA, concentración de manganeso presente en dichas muestras y cantidad utilizada en la optimización

Tipo de matriz	Muestra con la que se realiza la optimización	[Mn]($\mu\text{g/g}$)	Cantidad de muestra (g, peso seco)
Moluscos y pescados	NRCC-Tort 1 ^a	$23,4 \pm 1,0$	0,0300
Carnes	Riñón de cerdo BCR-186 ^b	$8,5 \pm 0,3$	0,0300 ^c
Cereales y derivados	Harina integral BCR-189 ^b	$63,3 \pm 1,9$	0,0100
Frutos secos	Avellanas	$42,3 \pm 0,8$	0,0200
Legumbres	Garbanzos	$19,4 \pm 0,8$	0,0300
Verduras, hortalizas y frutas	Lechuga	$35,3 \pm 0,5$	0,0300

a.NRCC: National Research Council of Canada

b.BCR: Community Bureau of Reference

c. Se ha realizado una adición de $1 \mu\text{g/mL}$ al material de referencia debido la baja [Mn] presente

En el caso del material de referencia BCR-186 (riñón de cerdo) utilizado para optimizar las muestras de carne, se ha tenido que hacer una adición de

1µg/mL debido a las bajas concentraciones de manganeso presentes en el mismo.

La matriz del diseño de Plackett-Burman con los valores que toma cada variable en cada experimento y el %eficacia en la extracción obtenido en cada caso se recoge en la Tabla 153. Los experimentos se han realizado por duplicado, por lo que la eficacia de la extracción indicada es la media obtenida de los dos experimentos.

Una vez realizados los experimentos, se procede al análisis de los datos proporcionados por el diseño. Para ello se comenzará de nuevo estudiando las **Cartas Pareto estandarizadas** (Figura 61) para conocer que variables son significativas y como afectan al proceso de extracción.

Tabla 153. Matriz del diseño de Plackett-Burman con los valores de cada variable en cada experimento, con el %eficacia en la extracción de manganeso obtenidas en cada uno de ellos para cada tipo de muestra

						% Eficacia en la extracción					
A	B	C	D	E	F	Moluscos y pescados	Carnes	Cereales y derivados	Frutos secos	Legumbres	Verduras, hortalizas y frutas
3	0	5	20	3,5	1	101,0	101,5	101,7	100,9	102,3	100,5
3	3	0,5	70	3,5	1	101,0	95,2	86,4	58,8	49,5	99,0
0	3	5	20	6	1	98,7	101,5	99,2	91,3	99,5	97,5
3	0	5	70	3,5	3	102,3	95,2	105,8	102,0	98,4	99,9
3	3	0,5	70	6	1	98,7	101,5	89,0	62,7	49,5	99,0
3	3	5	20	6	3	102,3	95,2	105,8	102,0	106,8	99,9
1,5	1,5	2,75	45	4,75	1,5	100,5	101,5	101,2	102,4	99,0	100,2
0	3	5	70	3,5	3	102,3	95,2	90,5	96,3	98,4	99,9
0	0	5	70	6	1	15,7	6,3	9,7	0,0	0,0	24,1
0	0	0,5	70	6	3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
3	0	0,5	20	6	3	102,3	95,2	90,5	56,2	40,0	99,9
0	3	0,5	20	3,5	3	102,3	95,2	75,2	50,4	31,7	95,3
0	0	0,5	20	3,5	1	0,0	12,7	0,0	0,0	0,0	0,0

A, [HNO₃]; B, [HCl]; C, Tiempo sonicación; D, Temperatura de extracción; E, Caudal de extracción; F, Volumen de disolución extractante.

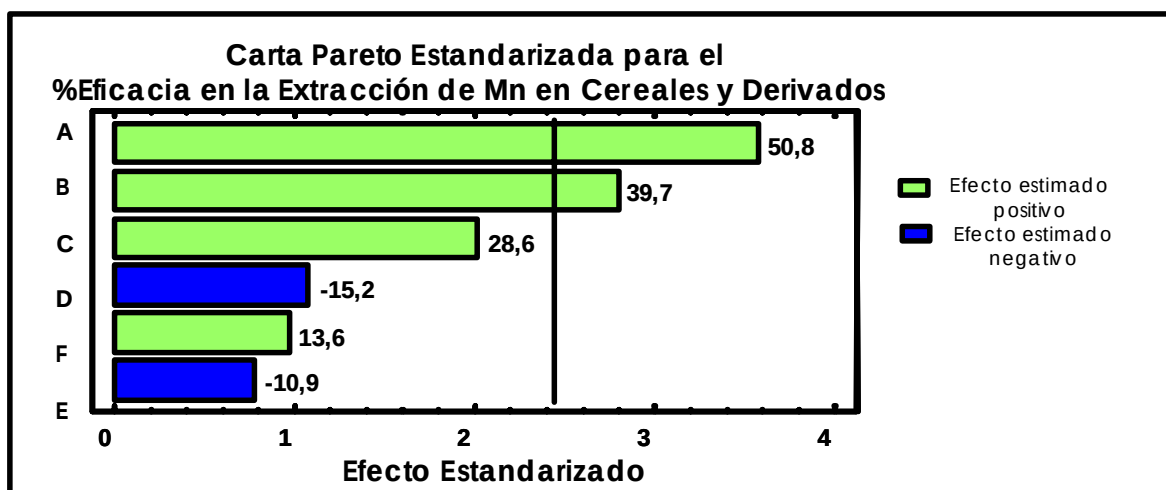
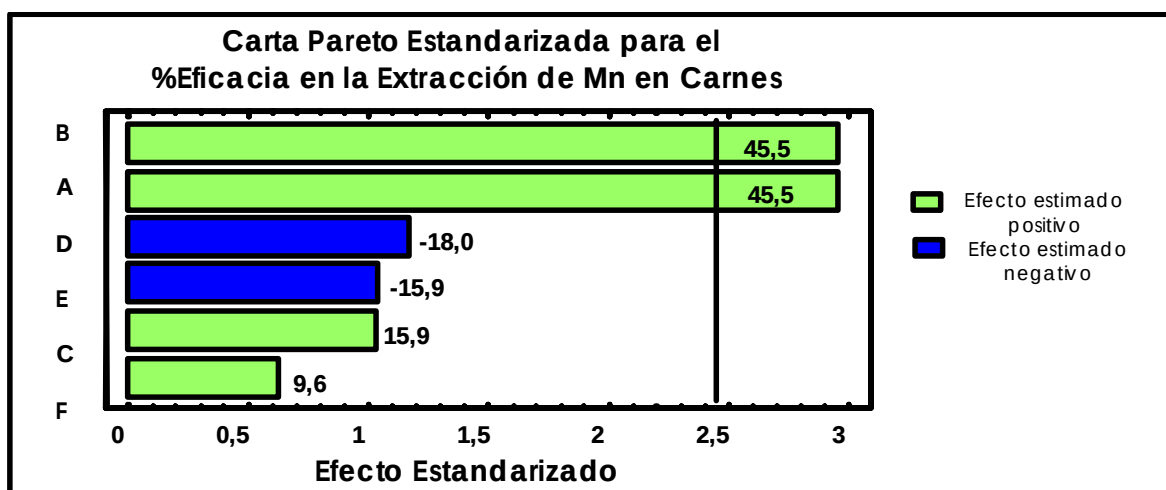
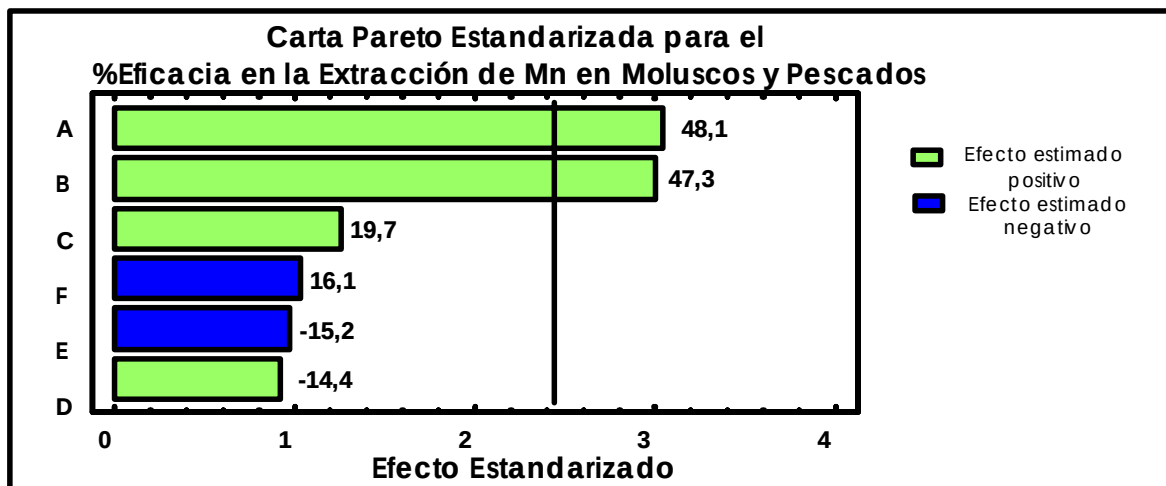


Figura 61. Carta Pareto estandarizada de los efectos principales estandarizados en el diseño factorial; la flecha vertical indica el límite de significación estadística para los efectos. A, $[\text{HNO}_3]$; B, $[\text{HCl}]$; C, Tiempo sonicación; D, Temperatura de extracción; E, Caudal de extracción; F, Volumen de disolución extractante.

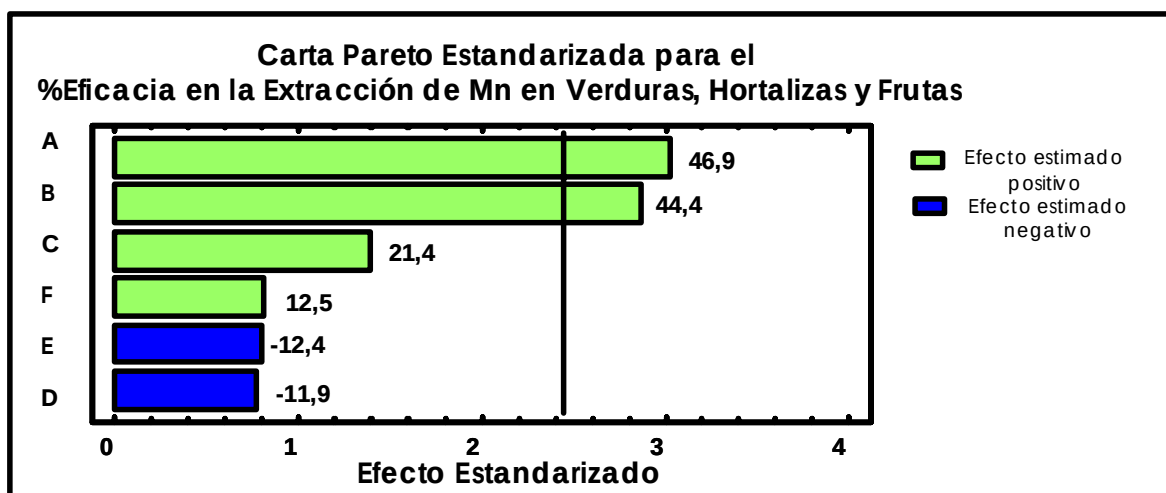
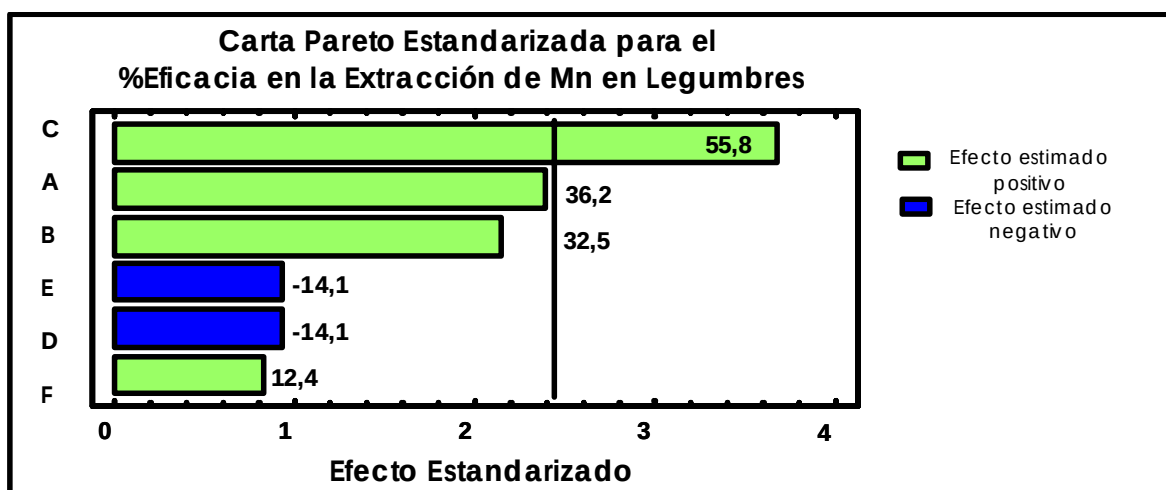
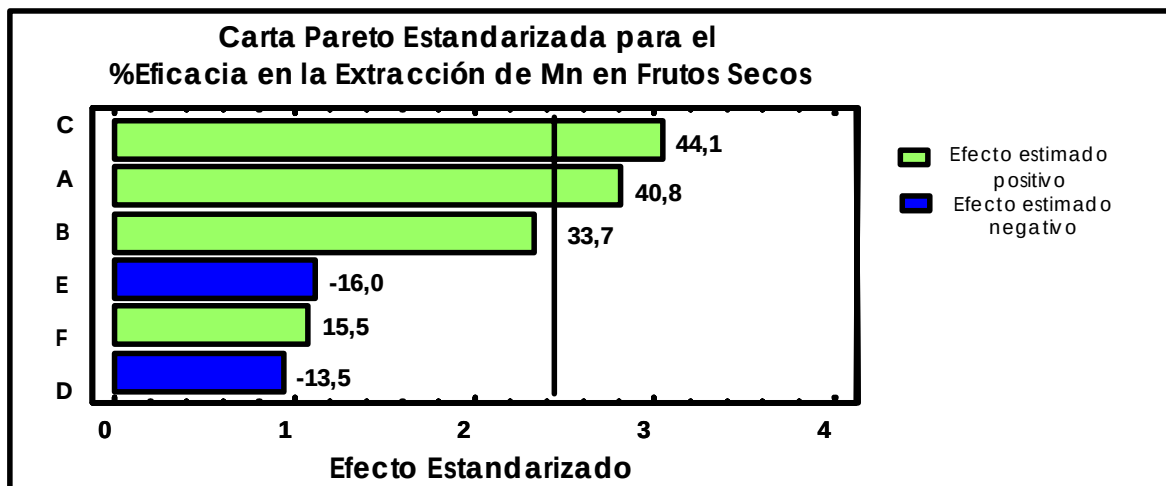


Figura 61 (continuación). Carta Pareto estandarizada de los efectos principales estandarizados en el diseño factorial; la flecha vertical indica el límite de significación estadística para los efectos. A, $[\text{HNO}_3]$; B, $[\text{HCl}]$; C, Tiempo sonicación; D, Temperatura de extracción; E, Caudal de extracción; F, Volumen de disolución extractante.

- **Análisis de los resultados obtenidos con el diseño factorial**

En los resultados obtenidos al aplicar el diseño de Plackett-Burman a la extracción de manganeso se observa que para todos los tipos de muestras las variables significativas son las concentraciones de los ácidos constituyentes de la disolución extractante, excepto para los frutos secos y las legumbres. Las variables que afectan significativamente al proceso en estos dos casos son el tiempo de sonicación y la concentración de HNO_3 , para las muestras de frutos secos, y sólo el tiempo de sonicación para las muestras de legumbres. A pesar de que para estos dos tipos de muestras ambas concentraciones de los ácidos no sean significativas (para los frutos secos la concentración de HNO_3 sí es una variable significativa), éstas presentan un efecto positivo y elevado por lo que tienen cierto grado de importancia en el proceso. Las variables que presentan los efectos estimados más elevados en cada tipo de muestra tienen un efecto positivo, por lo que tal y como se puede observar en las correspondientes superficies de respuesta (Figura 62) las eficacias en la extracción son mayores al aumentar su valor.

Las demás variables no son significativas y presentan efectos estimados más bajos. El comportamiento, en cuanto al signo del efecto estimado de estas variables se refiere, es igual para todos los tipos de muestras. El tiempo de sonicación y el volumen de disolución extractante tienen un efecto positivo en todos los casos. Al contrario ocurre con la temperatura de extracción y el caudal de sonicación, ya que para todos los tipos de muestras presentan efectos estimados negativos.

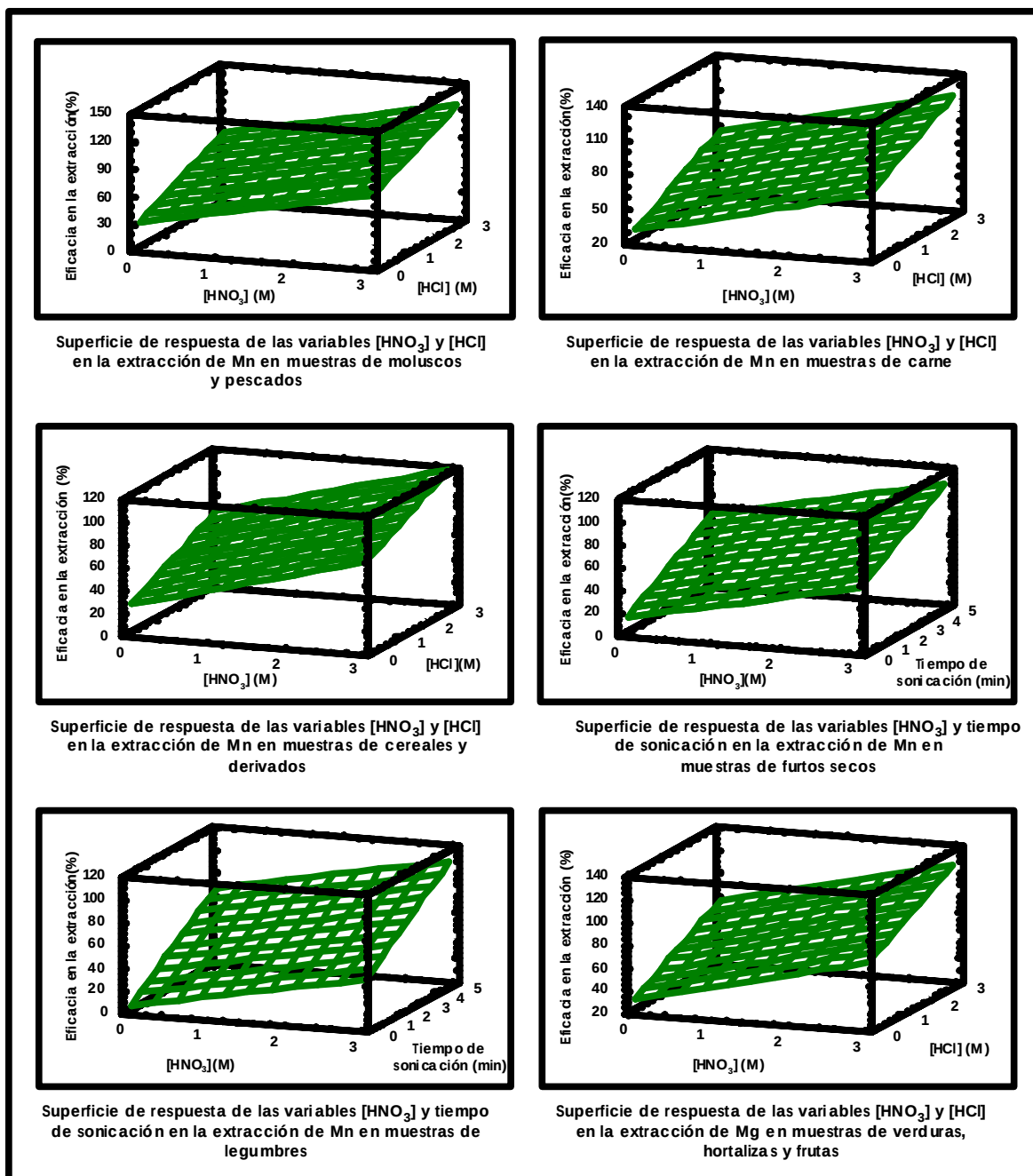


Figura 62. Superficies de respuesta proporcionadas por el diseño de Plackett-Burman para las variables de mayor peso estadístico en la determinación de manganeso en todos los tipos de muestra estudiados (las demás variables toman el valor medio del intervalo de estudio establecido en el diseño)

Una vez analizados los resultados obtenidos al aplicar el diseño de Plackett-Burman, los valores óptimos según el diseño de Screening para cada una de las variables son los que aparecen en la Tabla 154.

Tabla 154. Valores óptimos para cada una de las variables implicadas en el proceso de extracción de manganeso de los diferentes tipos de muestras según el diseño de Plackett-Burman

Variables	VALORES ÓPTIMOS PARA CADA UNA DE LAS VARIABLES SEGÚN EL DISEÑO DE PLACKETT-BURMAN					
	Moluscos y pescados	Carnes	Cereales y derivados	Frutos secos	Legumbres	Verduras, hortalizas y frutas
A (M)	3	3	3	3	3	3
B (M)	3	3	3	3	3	3
C (min)	5	5	5	5	5	5
D (°C)	20	20	20	20	20	20
E (mL/min)	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
F (mL)	3	3	3	3	3	3

A, [HNO₃]; B, [HCl]; C, Tiempo sonicación; D, Temperatura de extracción; E, Caudal de extracción; F, Volumen de disolución extractante.

Como que el diseño de Plackett-Burman proporciona las tendencias de cada una de ellas hacia el óptimo, y no el valor óptimo en sí mismo, se realizaron una serie de experimentos fuera del marco del diseño, de acuerdo con los resultados obtenidos por el mismo, para determinar los valores óptimos de cada una de las variables que afectan a la extracción de manganeso en los diferentes tipos de muestras objeto de estudio.

- **Experimentos realizados fuera del marco del diseño**

- **Experimentos realizados para la optimización de la extracción de manganeso en las muestras de Moluscos y Pescados**

La extracción de manganeso en muestras de moluscos y pescados está afectada significativamente por las concentraciones de los ácidos que forman la disolución extractante, como se ha observado en la correspondiente Carta Pareto (Figura 61).

En este estudio se optimizaron primero aquellas variables no significativas en el proceso de extracción. Dentro de estas variables no significativas, se encuentran la **temperatura de la extracción** y el **volumen de la disolución extractante**, con efectos estimados negativo y positivo, respectivamente. Sin embargo, a pesar de estos efectos, se observa que cuando estas dos variables

toman el valor más bajo del intervalo de estudio establecido en el diseño se obtienen %eficacia en la extracción cuantitativos (experimentos 1 y 3 de la matriz de Plackett-Burman, Tabla 153). Por tanto, los valores óptimos para la temperatura de extracción y el volumen de disolución extractante son 20°C y 1mL, ya que minimizando estos valores se obtienen resultados satisfactorios y se mejoran las características del proceso.

El **caudal de sonicación** y el **tiempo de sonicación** son las otras dos variables no significativas del proceso. Como se ha realizado en todos los estudios previos, estas dos variables se han estudiado juntas debido a la relación existente entre ellas. Así, se ha estudiado el tiempo de sonicación a los dos caudales establecidos en el diseño con el objetivo de que el tiempo de análisis sea el menor posible (Figura 63). En los resultados obtenidos, se observa que 0,5 min a un caudal de 6mL/min es tiempo suficiente para extraer cuantitativamente el manganeso de este tipo de muestras, además de que proporcionan la frecuencia de muestreo más elevada. Por tanto, estos dos valores son los considerados óptimos en esta extracción.

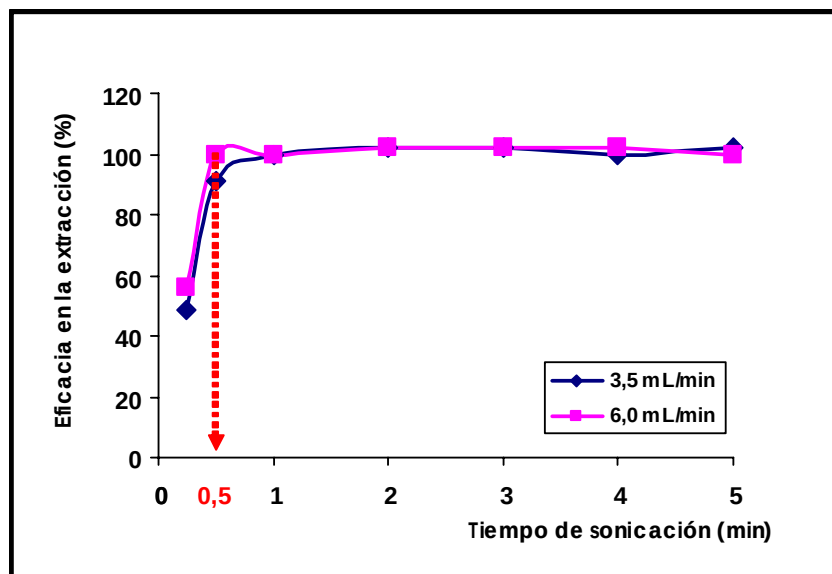


Figura 63. Experimentos realizados para la optimización del tiempo de sonicación a un caudal de extracción de 3,5 mL/min y 6,0 mL/min. $[\text{HNO}_3]=3\text{M}$; $[\text{HCl}]=3\text{M}$; Temperatura de extracción= 20°C; Volumen de disolución extractante=1mL

En lo que respecta a los componentes de la disolución extractante, variables significativas del proceso, se observa que las **concentraciones de ambos ácidos** tienen efectos estimados casi idénticos y bastante elevados. Sin

embargo, como el objetivo es disminuir al máximo esta concentración se ha estudiado la posibilidad de eliminar uno de los componentes de la disolución ácida y/o disminuir al máximo la concentración de la misma (Tablas 155 y 156). De los resultados obtenidos se observa que una disolución 1,5 M de HNO_3 o de HCl 3 M son suficientes para obtener resultados cuantitativos, y que no son necesarios ambos ácidos en la disolución extractante. Como lo que interesa es que la concentración ácida sea la mínima, la disolución extractante óptima en este caso es la disolución de HNO_3 1,5 M.

Tabla 155. Experimentos realizados para la optimización de la concentración de HNO_3

$[\text{HNO}_3]$ (M) ^a	$[\text{Mn}]$ $\mu\text{g/g}^b$	(%) Eficacia en la extracción
3,0	$23,4 \pm 0,3$	100,2
1,5	$23,6 \pm 0,5$	101,0
0,75	$16,8 \pm 0,3$	71,8

a. $[\text{HCl}]=0\text{M}$; Tiempo de sonicación=0,5 min; Temperatura de extracción= 20°C; Caudal de extracción=6,0 mL/min; Volumen de disolución extractante=1mL

b. $[\text{Mn}]$ = Media $\pm$ desviación estándar (n=3)

Tabla 156. Experimentos realizados para la optimización de la concentración de HCl

$[\text{HCl}]$ (M) ^a	$[\text{Mn}]$ $\mu\text{g/g}^b$	(%) Eficacia en la extracción
3,0	$23,3 \pm 0,3$	99,4
1,5	$22,2 \pm 0,3$	94,8

a. $[\text{HNO}_3]=0\text{M}$; Tiempo de sonicación=0,5 min; Temperatura de extracción= 20°C; Caudal de extracción=6,0 mL/min; Volumen de disolución extractante=1mL

b. $[\text{Mn}]$ = Media $\pm$ desviación estándar (n=3)

Los valores óptimos para cada variable implicada en la extracción de manganeso en las muestras de moluscos y pescados se indican en la Tabla 157.

Tabla 157. Valores óptimos para cada una de las variables implicadas en el proceso de extracción de manganeso de las muestras de moluscos y pescados

VARIABLE	VALORES ÓPTIMOS PARA CADA UNA DE LAS VARIABLES
$[\text{HNO}_3]$	1,5 M
$[\text{HCl}]$	0 M
Tiempo de sonicación	0,5 min
Temperatura de extracción	20 °C
Caudal de extracción	6,0 mL/min
Volumen de disolución extractante	1mL

- Experimentos realizados para la optimización de la extracción de manganeso en muestras de Carne

La extracción de manganeso en muestras de carne está afectada significativamente por la concentración de los ácidos constituyentes de la disolución extractante.

Con respecto a las variables no significativas, **temperatura de extracción** y **volumen de disolución extractante**, se ha observado que 20°C y 1mL de disolución son suficientes para obtener %eficacia en la extracción cuantitativos (101,5% en los experimentos 1 y 3 de la matriz de Plackett-Burman, Tabla 153). Debido que los resultados son satisfactorios y que al minimizar los valores de estas dos variables se mejoran las características del proceso, estos dos son los valores considerados como óptimos para estas dos variables.

Las otras variables no significativas son el **caudal de extracción**, y el **tiempo de sonicación**. Se estudió el tiempo de sonicación a los dos caudales fijados previamente en el diseño, con el objetivo de encontrar la combinación de estas dos variables que proporcione la mejor frecuencia de muestreo. En este caso, como se demuestra en los resultados obtenidos (Figura 64), el tiempo de sonicación necesario para obtener un %eficacia en la extracción cuantitativo es de 0,5 min, independientemente del caudal de extracción. Los siguientes estudios se han realizado a un caudal de 6mL/min, no porque se obtengan mejores resultados que a 3,5 mL/min, sino por tomar uno de los dos valores óptimos.

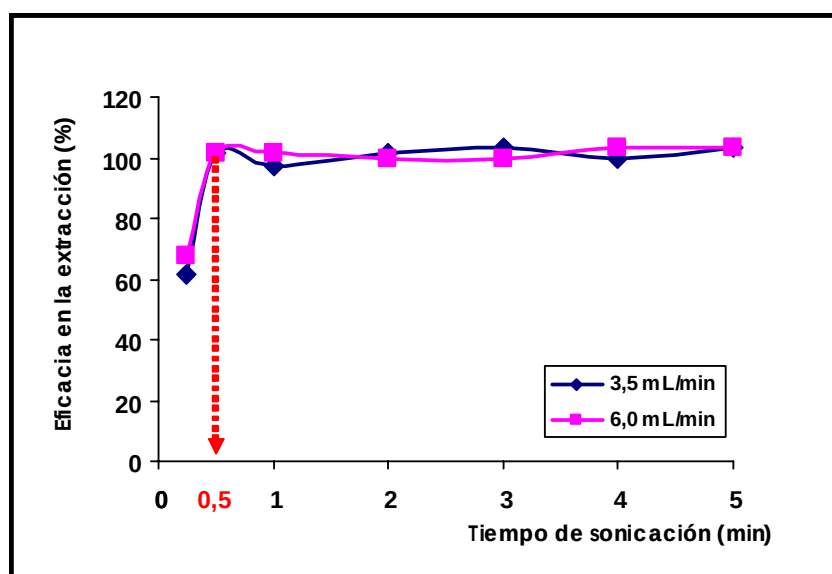


Figura 64. Experimentos realizados para la optimización del tiempo de sonicación a un caudal de extracción de 3,5 mL/min y 6,0 mL/min. $[\text{HNO}_3]=3\text{M}$; $[\text{HCl}]=3\text{M}$; Temperatura de extracción= 20°C ; Volumen de disolución extractante=1mL

Con respecto a las **concentraciones de los ácidos de la disolución extractante**, éstas tienen efectos estimados elevados e idénticos. A pesar de ello, se ha estudiado la posibilidad de eliminar uno de los componentes de la disolución ácida y/o de disminuir al máximo la concentración de los mismos (Tablas 158 y 159). De los resultados obtenidos se observa que una disolución 1,5M bien de HNO_3 o de HCl es suficiente para obtener resultados cuantitativos, y que no son necesarios ambos ácidos en la disolución extractante. En los siguientes estudios de la extracción de manganeso en muestras de carne se utilizará una disolución de HNO_3 1,5 M, simplemente por tomar uno de los valores óptimos, pero no porque se obtengan mejores resultados que con el HCl 1,5M.

Tabla 158. Experimentos realizados para la optimización de la concentración de HNO_3

$[\text{HNO}_3]$ (M) ^a	$[\text{Mn}]$ $\mu\text{g/g}$ ^b	(%) Eficacia en la extracción
3,0	$8,8 \pm 0,3$	103,6
1,5	$8,5 \pm 0,3$	99,4
0,75	$7,2 \pm 0,3$	84,6

a. $[\text{HCl}]=0\text{M}$; Tiempo de sonicación=0,5 min; Temperatura de extracción= 20°C ; Caudal de extracción=6,0 mL/min; Volumen de disolución extractante=1mL

b. $[\text{Mn}]$ = Media $\pm$ desviación estándar (n=3)

Tabla 159. Experimentos realizados para la optimización de la concentración de HCl

[HCl] (M) ^a	[Mn] µg/g ^b	(%) Eficacia en la extracción
3,0	8,5 ± 0,3	99,4
1,5	8,3 ± 0,3	97,3
0,75	6,8 ± 0,3	80,4

a. [HNO₃]=0M; Tiempo de sonicación=0,5 min; Temperatura de extracción= 20°C; Caudal de extracción=6,0 mL/min; Volumen de disolución extractante=1mL

b. [Mn] = Media ± desviación estándar (n=3)

Los valores óptimos para cada variable implicada en la extracción de manganeso en las muestras de carne se indican en la Tabla 160.

Tabla 160. Valores óptimos para cada una de las variables implicadas en el proceso de extracción de manganeso de las muestras de carne

VARIABLE	VALORES ÓPTIMOS PARA CADA UNA DE LAS VARIABLES
[HNO ₃]	1,5 M / 0M
[HCl]	0M / 1,5M
Tiempo de sonicación	0,5 min
Temperatura de extracción	20 °C
Caudal de extracción	3,5 mL/min/ 6,0 mL/min
Volumen de disolución extractante	1mL

- Experimentos realizados para la optimización de la extracción de manganeso en las muestras de Cereales y Derivados**

Con respecto a las variables no significativas, **temperatura de extracción** y **volumen de disolución extractante**, se observa en los experimentos 1 y 3 de la matriz del diseño (Tabla 153) que estableciendo los valores de estas variables en los límites más bajos del intervalo estudiado, 1mL y 20°C, respectivamente, los %eficacia en la extracción obtenidos son cuantitativos, por lo que éstos serán los valores óptimos considerados para estas variables.

Las otras dos variables no significativas son el **tiempo de sonicación** y el **caudal de extracción**. Dado que estas variables están relacionadas, se han estudiado fuera del marco del diseño de modo conjunto con el objetivo de disminuir al máximo el tiempo de análisis (Figura 65). En los resultados obtenidos se observa que el menor tiempo necesario de análisis para obtener resultados

satisfactorios es 1 min a un caudal de 6mL/min, y por ello, éstos son los valores óptimos para estas dos variables.

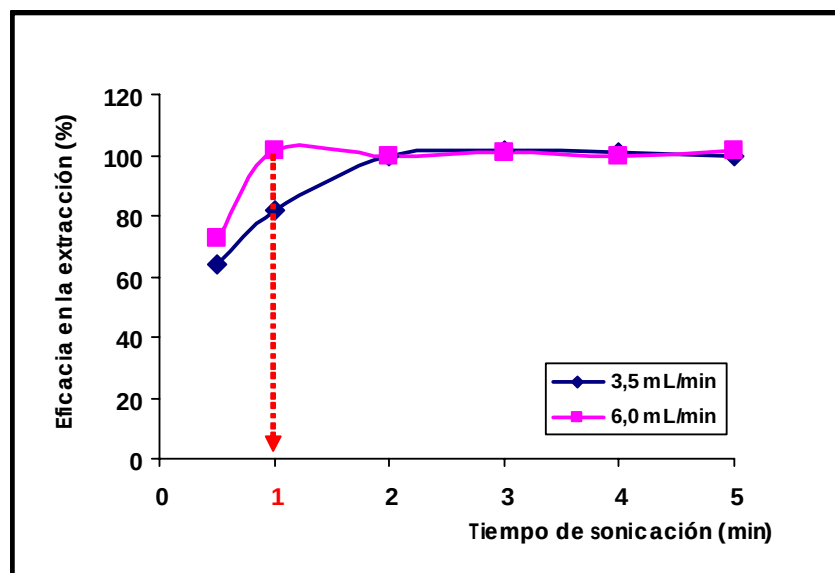


Figura 65. Experimentos realizados para la optimización del tiempo de sonicación a un caudal de extracción de 3,5 mL/min y 6,0 mL/min. $[\text{HNO}_3]=3\text{M}$; $[\text{HCl}]=3\text{M}$; Temperatura de extracción= 20°C ; Volumen de disolución extractante=1mL

Al igual que en los restantes casos, a pesar de que los componentes de la disolución extractante sean las variables significativas en el proceso, se ha estudiado la posibilidad de eliminar de la misma alguno de los ácidos constituyentes y/o disminuir al máximo las **concentraciones** de los mismos. Se ha estudiado en primer lugar la posibilidad de eliminar el HCl de la disolución extractante, ya que este componente tiene un efecto estimado bastante menor que el HNO_3 (Tabla 161). Se ha demostrado que se puede extraer cuantitativamente el manganeso de las muestras (101,7%) si se elimina el HCl de la disolución extractante, manteniendo una concentración 3M de HNO_3 .

Tabla 161. Experimentos realizados para la optimización de la concentración de HCl

$[\text{HCl}] \text{ (M)}^a$	$[\text{Mn}] \mu\text{g/g}^b$	(%) Eficacia en la extracción
3,0	$63,3 \pm 0,9$	100,0
1,5	$63,9 \pm 0,9$	100,9
0	$64,4 \pm 1,6$	101,7

a. $[\text{HNO}_3]=0\text{M}$; Tiempo de sonicación=1,0min; Temperatura de extracción= 20°C ; Caudal de extracción=6,0 mL/min; Volumen de disolución extractante=1mL

b. $[\text{Mn}]$ = Media $\pm$ desviación estándar (n=3)

Una vez eliminado el HCl de la disolución extractante, se ha estudiado la posibilidad de disminuir la concentración de HNO_3 , ya que el objetivo es utilizar la mínima concentración ácida. En este estudio se ha demostrado experimentalmente que una concentración 1,5 M de este ácido es suficiente para obtener resultados cuantitativos (Tabla 162).

Tabla 162. Experimentos realizados para la optimización de la concentración de HNO_3

$[\text{HNO}_3]$ (M) ^a	$[\text{Mn}]$ $\mu\text{g/g}^b$	(%) Eficacia en la extracción
3,0	$64,4 \pm 1,6$	101,7
1,5	$63,9 \pm 0,9$	100,9
0,75	$46,6 \pm 1,6$	73,6

a $[\text{HCl}] = 0\text{M}$; Tiempo de sonicación=1,0 min; Temperatura de extracción= 20°C; Caudal de extracción=6,0 mL/min; Volumen de disolución extractante=1mL

b $[\text{Mn}]$ = Media $\pm$ desviación estándar (n=3)

Los valores óptimos para cada variable implicada en la extracción de manganeso en las muestras de cereales y derivados se indican en la Tabla 163.

Tabla 163. Valores óptimos para cada una de las variables implicadas en el proceso de extracción de manganeso de las muestras de cereales y derivados

VARIABLE	VALORES ÓPTIMOS PARA CADA UNA DE LAS VARIABLES
$[\text{HNO}_3]$	1,5 M
$[\text{HCl}]$	0 M
Tiempo de sonicación	1 min
Temperatura de extracción	20 °C
Caudal de extracción	6,0 mL/min
Volumen de disolución extractante	1mL

- Experimentos realizados para la optimización de la extracción de manganeso en las muestras de Frutos Secos**

En el caso de la determinación de manganeso en frutos secos se observa que las variables significativas en este proceso son el tiempo de sonicación y la concentración de HNO_3 . En este proceso la concentración de HCl no llega a ser una variable significativa, pero sí presenta un efecto estimado relativamente elevado y positivo.

Se ha comenzado a realizar el estudio de optimización por las variables no significativas. Dentro de este grupo se encuentran la **temperatura de extracción** y **volumen de disolución extractante**. En relación con estas dos variables, se observa que cuando éstas toman los valores más bajos del intervalo de estudio establecido en el diseño, 20 °C y 1 mL, se obtiene un %eficacia en la extracción cuantitativo (experimento 1 de la matriz de Plackett-Burman, Tabla 153). Por tanto, estos dos serán los valores considerados como óptimos para esta extracción.

La otra variable no significativa es el **caudal de extracción**, pero esta variable se ha de estudiar con el **tiempo de sonicación** ya que estas variables están relacionadas. A pesar de que esta última variable es una variable significativa de elevado efecto estimado, se ha estudiado también la posibilidad de disminuir su valor ya que es de gran interés disminuir al máximo el tiempo de análisis. Así, se ha estudiado el tiempo de análisis a los dos caudales establecidos en el diseño (Figura 66), y se ha observado que 2 min a un caudal de 6 mL/min son suficientes para extraer cuantitativamente el manganeso de las muestras de frutos secos.

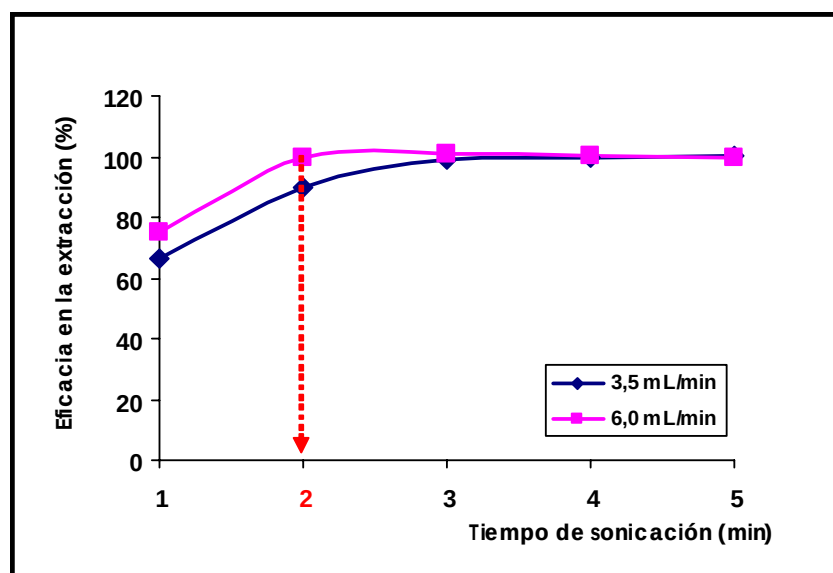


Figura 66. Experimentos realizados para la optimización del tiempo de sonicación a un caudal de extracción de 3,5 mL/min y 6,0 mL/min. $[\text{HNO}_3]=3\text{M}$; $[\text{HCl}]=3\text{M}$; Temperatura de extracción= 20°C; Volumen de disolución extractante=1mL

Con respecto a las **concentraciones de los ácidos** constituyentes de la disolución extractante, sólo la concentración de HNO_3 es una variable significativa. La concentración de HCl posee un efecto estimado positivo elevado, pero no llega a ser una variable estadísticamente significativa. Así, como el objetivo es disminuir la concentración ácida, se ha estudiado la posibilidad de eliminar el HCl , dado que su efecto estimado es menor. Se ha observado que manteniendo una concentración de HNO_3 3M, se puede eliminar el HCl de la disolución extractante obteniendo %eficacias en la extracción cuantitativos (Tabla 164).

Tabla 164. Experimentos realizados para la optimización de la concentración de HCl

[HCl] (M) ^a	[Mn] $\mu\text{g/g}^b$	(%) Eficacia en la extracción
3,0	42,4 $\pm$ 0,5	100,2
1,5	42,2 $\pm$ 0,5	99,6
0	42,2 $\pm$ 0,5	99,6

a. $[\text{HNO}_3]=3\text{M}$; Tiempo de sonicación=2,0min; Temperatura de extracción= 20°C; Caudal de extracción=6,0 mL/min; Volumen de disolución extractante=1mL

b. [Mn] = Media $\pm$ desviación estándar (n=3)

Una vez eliminado el HCl de la disolución extractante, se ha estudiado la posibilidad de disminuir la concentración de HNO_3 , ya que el objetivo es utilizar la mínima concentración ácida. En este estudio se ha observado que una concentración 1,5 M de este ácido es suficiente para obtener resultados cuantitativos (Tabla 165).

Tabla 165. Experimentos realizados para la optimización de la concentración de HNO_3

[HNO ₃] (M) ^a	[Mn] $\mu\text{g/g}^b$	(%) Eficacia en la extracción
3,0	42,2 $\pm$ 0,5	99,6
1,5	42,4 $\pm$ 0,5	100,2
0,75	30,9 $\pm$ 0,5	72,9

a. $[\text{HCl}]=0\text{M}$; Tiempo de sonicación=2,0 min; Temperatura de extracción= 20°C; Caudal de extracción=6,0 mL/min; Volumen de disolución extractante=1mL

b. [Mn] = Media $\pm$ desviación estándar (n=3)

Los valores óptimos para cada variable implicada en la extracción de manganeso en las muestras de frutos secos se indican en la Tabla 166.

Tabla 166. Valores óptimos para cada una de las variables implicadas en el proceso de extracción de manganeso de las muestras de frutos secos

VARIABLE	VALORES ÓPTIMOS PARA CADA UNA DE LAS VARIABLES
[HNO ₃]	1,5 M
[HCl]	0 M
Tiempo de sonicación	2 min
Temperatura de extracción	20 °C
Caudal de extracción	6,0 mL/min
Volumen de disolución extractante	1mL

- **Experimentos realizados para la optimización de la extracción de manganeso en las muestras de Legumbres**

La extracción de manganeso en muestras de legumbres sólo está afectada significativamente por el tiempo de sonicación. En este caso las concentraciones de los ácidos constituyentes de la disolución extractante no llegan a ser variables significativas, pero sí presentan efectos estimados positivos elevados.

Los valores óptimos establecidos para las variables **volumen de disolución extractante** y **temperatura de extracción** son, como en los casos anteriores, 1mL y 20°C, respectivamente, ya que se obtienen %eficacias en la extracción cuantitativos cuando estas dos variables toman el valor mínimo del intervalo establecido en el diseño (102,3% y 99,5% respectivamente en los experimentos 1 y 3 de la matriz de Plackett-Burman, Tabla 153).

La variable **caudal de extracción** se ha estudiado con la variable significativa **tiempo de sonicación**, debido a la relación existente entre ellas. A pesar de que esta última variable presenta un importante efecto positivo en la extracción, se ha estudiado la posibilidad de disminuir el valor de esta variable, ya que es de gran interés disminuir el tiempo de análisis al máximo. Así, se ha estudiado este tiempo de sonicación a los dos caudales establecidos en el diseño (Figura 67), y se ha observado que el tiempo mínimo necesario para obtener %eficacias en la extracción cuantitativos es de 3 min a un caudal de

6mL/min, y, por tanto, serán estos dos los valores óptimos para estas dos variables.

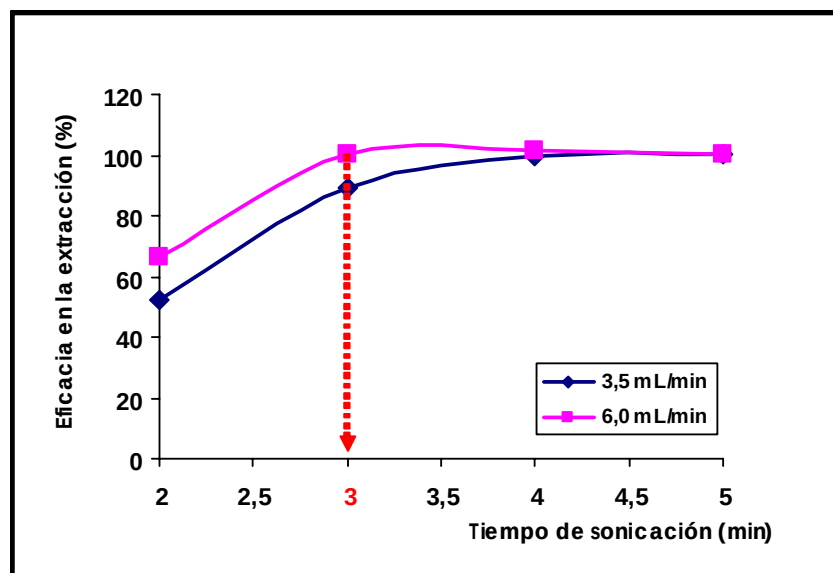


Figura 67. Experimentos realizados para la optimización del tiempo de sonicación a un caudal de extracción de 3,5 mL/min y 6,0 mL/min. $[\text{HNO}_3]=3\text{M}$; $[\text{HCl}]=3\text{M}$; Temperatura de extracción= 20°C ; Volumen de disolución extractante=1mL

Con respecto a las **concentraciones de los ácidos** se estudió, la posibilidad de utilizar sólo uno de los ácidos como disolución extractante y/o disminuir al máximo la concentración del mismo (Tablas 167 y 168). En los resultados obtenidos se observa que una disolución de HNO_3 3M es suficiente para extraer cuantitativamente todo el manganeso de las muestras de legumbres, y por tanto, se puede eliminar el HCl de la disolución extractante. Sin embargo, si se elimina el HNO_3 , una disolución de HCl 3M no proporciona %eficacia en la extracción cuantitativos. A su vez, se ha estudiado la posibilidad de utilizar menores concentraciones ácidas y se ha observado que una disolución de HNO_3 1,5M es la disolución de concentración más baja que proporciona resultados satisfactorios, por lo que será esta última la disolución extractante seleccionada como óptima.

Tabla 167. Experimentos realizados para la optimización de la concentración de HNO_3

$[\text{HNO}_3]$ (M) ^a	$[\text{Mn}]$ $\mu\text{g/g}^b$	(%)Eficacia en la extracción
3	$19,3 \pm 0,5$	99,5
1,5	$19,5 \pm 0,3$	100,5
0,75	$16,3 \pm 0,3$	83,8

a. $[\text{HCl}]=0\text{M}$; Tiempo de sonicación=3 min; Temperatura de extracción= 20°C; Caudal de extracción=6,0 mL/min; Volumen de disolución extractante=1mL

b. $[\text{Mn}]$ = Media $\pm$ desviación estándar (n=3)

Tabla 168. Experimentos realizados para la optimización de la concentración de HCl

$[\text{HCl}]$ (M) ^a	$[\text{Mn}]$ $\mu\text{g/g}^b$	(%) Eficacia en la extracción
3	$19,3 \pm 0,5$	99,5
1,5	$18,0 \pm 0,3$	93,0

a. $[\text{HNO}_3]=0\text{M}$; Tiempo de sonicación=3 min; Temperatura de extracción= 20°C; Caudal de extracción=6,0 mL/min; Volumen de disolución extractante=1mL

b. $[\text{Mn}]$ = Media $\pm$ desviación estándar (S.D.) (n=3)

Los valores óptimos para cada variable implicada en la extracción de manganeso en las muestras de legumbres se indican en la Tabla 169.

Tabla 169. Valores óptimos para cada una de las variables implicadas en el proceso de extracción de manganeso de las muestras de legumbres

VARIABLE	VALORES ÓPTIMOS PARA CADA UNA DE LAS VARIABLES
$[\text{HNO}_3]$	1,5M
$[\text{HCl}]$	0M
Tiempo de sonicación	3 min
Temperatura de extracción	20 °C
Caudal de extracción	6,0 mL/min
Volumen de disolución extractante	1mL

- Experimentos realizados para la optimización de la extracción de manganeso en las muestras de Verduras, Hortalizas y Frutas

En la extracción de manganeso en verduras, hortalizas y frutas las variables significativas son las concentraciones de los ácidos constituyentes de la disolución extractante.

Comenzando el estudio por las variables no significativas se observa, al igual que en todas las extracciones de manganeso estudiadas, que una **temperatura de extracción** de 20°C y **volumen de disolución extractante** de 1 mL son los valores óptimos para estas variables, ya que con ellos se obtienen %eficacias en la extracción cuantitativos (experimentos 1 y 3 de la matriz de Plackett-Burman, Tabla 153) y se mejoran las características del sistema.

El **caudal de extracción** es otra variable no significativa en el proceso. Esta variable se ha estudiado con el **tiempo de sonicación**. Así, se ha estudiado el tiempo de sonicación a los dos caudales establecidos previamente en el diseño de Plackett-Burman y se ha observado que el tiempo mínimo necesario para obtener resultados satisfactorios es de 0,5 min a un caudal de 6mL/min (Figura 68).

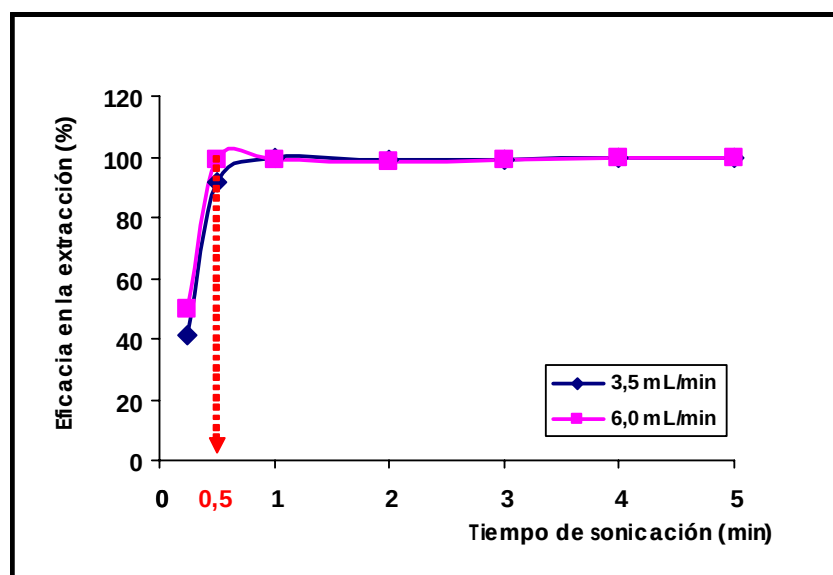


Figura 68. Experimentos realizados para la optimización del tiempo de sonicación a un caudal de extracción de 3,5 mL/min y 6,0 mL/min. $[\text{HNO}_3]=3\text{M}$; $[\text{HCl}]=3\text{M}$; Temperatura de extracción= 20°C; Volumen de disolución extractante=1mL

Con respecto a las concentraciones de los **ácidos constituyentes de la disolución extractante**, se ha estudiado la posibilidad de utilizar sólo uno de ellos como componente de la disolución extractante, y disminuir al máximo la concentración de los mismos (Tablas 170 y 171). En los resultados obtenidos se observa que la disolución extractante de menor concentración ácida, con la que se obtienen %eficacia en la extracción cuantitativos para este proceso, es una disolución de HNO_3 0,5 M.

Tabla 170. Experimentos realizados para la optimización de la concentración de HNO_3

$[\text{HNO}_3]$ (M) ^a	$[\text{Mn}]$ $\mu\text{g/g}^b$	(%) Eficacia en la extracción
3	$35,1 \pm 0,3$	99,5
1,5	$35,0 \pm 0,5$	99,0
0,75	$35,0 \pm 0,5$	99,0
0,5	$35,1 \pm 0,3$	99,5
0,25	$26,3 \pm 0,5$	74,6

a. $[\text{HCl}] = 0\text{M}$; Tiempo de sonicación=0,5 min; Temperatura de extracción= 20°C; Caudal de extracción=6,0 mL/min; Volumen de disolución extractante=1mL

b. $[\text{Mn}]$ = Media $\pm$ desviación estándar (n=3)

Tabla 171. Experimentos realizados para la optimización de la concentración de HCl

$[\text{HCl}]$ (M) ^a	$[\text{Mn}]$ $\mu\text{g/g}^b$	(%) Eficacia en la extracción
3,0	$35,3 \pm 0,3$	100,0
1,5	$35,1 \pm 0,3$	99,5
0,75	$31,5 \pm 0,3$	89,3

a. $[\text{HNO}_3] = 3\text{M}$; Tiempo de sonicación=1min; Temperatura de extracción= 20°C; Caudal de extracción=6,0 mL/min; Volumen de disolución extractante=1mL

b. $[\text{Cu}]$ = Media $\pm$ desviación estándar (n=3)

Los valores óptimos para cada variable implicada en la extracción de manganeso en las muestras de verduras, hortalizas y frutas se indican en la Tabla 172.

Tabla 172. Valores óptimos para cada una de las variables implicadas en el proceso de extracción de manganeso de las muestras de verduras, hortalizas y frutas

VARIABLE	VALORES ÓPTIMOS PARA CADA UNA DE LAS VARIABLES
$[\text{HNO}_3]$	0,5M
$[\text{HCl}]$	0 M
Tiempo de sonicación	0,5 min
Temperatura de extracción	20 °C
Caudal de extracción	6,0 mL/min
Volumen de disolución extractante	1mL

En la Tabla 173 se muestra un resumen de los valores óptimos para cada una de las variables implicadas en el proceso de extracción de manganeso en los diferentes tipos de muestras de alimentos.

Tabla 173. Valores óptimos para cada una de las variables implicadas en el proceso de extracción de manganeso de los diferentes tipos de muestras alimenticias

Variables	VALORES ÓPTIMOS PARA CADA UNA DE LAS VARIABLES IMPLICADAS EN LA EXTRACCIÓN DE MANGANESO EN LOS DIFERENTES TIPOS DE MUESTRAS ALIMENTICIAS					
	Moluscos y pescados	Carnes	Cereales y derivados	Frutos secos	Legumbres	Verduras, hortalizas y frutas
A (M)	1,5	1,5/ 0	1,5	1,5	1,5	0,5
B (M)	0	0/ 1,5	0	0	0	0
C (min)	0,5	0,5	1	2	3	0,5
D (°C)	20	20	20	20	20	20
E (mL/min)	6,0	3,5 / 6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
F (mL)	1	1	1	1	1	1

A, [HNO₃]; B, [HCl]; C, Tiempo sonicación; D, Temperatura de extracción; E, Caudal de extracción; F, Volumen de disolución extractante.

En los valores óptimos obtenidos para la extracción de manganeso de los diferentes tipos de muestras, se observa que en este proceso se puede eliminar de la disolución extractante el HCl en todos los casos, ya que el HNO₃ en diferentes concentraciones es suficiente para extraer cuantitativamente el metal. Sólo en el caso de las muestras de carne el HCl presenta el mismo poder extractante que el HNO₃. Con respecto a las concentraciones necesarias para obtener %eficacia en la extracción cuantitativos, se observa que en todos los casos la concentración óptima de HNO₃ es de 1,5 M, excepto en las verduras, hortalizas y frutas donde la concentración es menor (0,5 M).

En cuanto al tiempo de extracción, se observa que para las muestras de moluscos y pescados, de carnes y verduras, hortalizas y frutas sólo son necesarios 0,5 min para extraer el manganeso. Sin embargo, para las muestras de cereales y derivados, frutos secos y legumbres se necesita mayor tiempo de extracción (1, 2 y 3 min, respectivamente). Con respecto al caudal de extracción óptimo, en todos los casos es 6 mL/min, excepto en el caso de las muestras de carne donde ambos caudales, 3,5 ó 6,0 mL/min, proporcionan resultados satisfactorios.

En lo que respecta a la temperatura de extracción y al volumen de disolución extractante, en todos los casos la temperatura óptima es 20 °C

(temperatura ambiente), y 1mL de disolución es suficiente para extraer el manganeso de las muestras.

4.1.6.1 Estudio de la cantidad de muestra

En las extracciones de manganeso se han utilizado 0,0300 g de muestra para los diferentes tipos de las mismas, excepto en el caso de los cereales y derivados y frutos secos. En los casos que se han utilizado 0,0300 g de muestra, se podrían utilizar cantidades de muestra menores (0,0100 ó 0,0200 g), ya que se obtendrían %eficacia en la extracción cuantitativos. Sin embargo, en estos casos los resultados obtenidos no implicarían ninguna mejora en las características analíticas de la determinación, ya que éstos serían menos sensibles debido a que la concentración de manganeso presente en este tipo de muestras no es elevada. Por otra parte, no se han podido estudiar mayores cantidades de muestra, ya que cantidades de muestra mayores que 0,0300 g provocan presiones elevadas en el sistema FIA que hacen inviables los análisis.

Para los cereales y derivados y los frutos secos, sí se puede realizar un estudio más profundo de la cantidad de muestra debido a que las concentraciones de manganeso presentes en las mismas son más elevadas. Debido a esto, la cantidad de muestra utilizada en las distintas optimizaciones fue de 0,0100 g y 0,0200 g para los cereales y derivados y frutos secos, respectivamente. Por tanto, se estudió la posibilidad de utilizar mayores cantidades de las mismas, para así poder mejorar las características analíticas del proceso y poder analizar muestras de este tipo que presenten concentraciones en manganeso menores. En estos estudios se utilizaron una muestra de cereales con cacao y una muestra de avellanas (utilizada previamente en la optimización del proceso de extracción) cuyas concentraciones de manganeso son respectivamente de $12,4 \pm 0,8 \mu\text{g/g}$ y $42,2 \pm 0,8 \mu\text{g/g}$, determinadas en ambos utilizando el método de referencia (pág. 86).

En el caso de los cereales y derivados, se estudió la posibilidad de utilizar 0,0200 y 0,0300 g, y se observó que para obtener %extracción cuantitativos es necesario aumentar la concentración ácida de HNO_3 a 3M y el tiempo de sonicación a 2 min (para 0,0100g la concentración de HNO_3 óptima es de 1,5M

y el tiempo de sonicación es de 1 min), manteniendo las demás variables en los óptimos establecidos previamente. En estas condiciones los %eficacia en la extracción obtenidos son de 99,1% y 101%, para 0,0200 y 0,0300 g de muestra, respectivamente.

En el caso de los frutos secos se estudió la posibilidad de utilizar 0,0300 g de muestra, pues ya se habían utilizado 0,0200g de la misma en la optimización del proceso de extracción. Así, se han obtenido resultados satisfactorios (99,5% de eficacia en la extracción) manteniendo las variables en los valores óptimos obtenidos para 0,0200 g de muestra.

4.1.6.2 Estudio de la influencia del tamaño de partícula de la muestra

Todos los estudios descritos anteriormente se han realizado con un diámetro de partícula menor de 30 μm . Para ver la influencia del tamaño de partícula en la extracción del manganeso se han tomado diferentes porciones de una misma muestra (para cada tipo de matriz) con diferentes tamaños de partícula: diámetro menor de 30 μm y de diámetro comprendido entre 30-100 μm .

Para llevar a cabo este estudio no pueden utilizar materiales de referencia, ya que el diámetro de partícula es estándar, por lo que se han utilizado las mismas muestras que en el proceso de optimización (Tabla 153), excepto en los casos donde se haya utilizado un material de referencia, donde en su lugar se han analizado muestras donde sí se permitiese llevar a cabo este estudio. Las muestras analizadas en cada caso se indican en la Tabla 174.

Con las porciones de diferente diámetro de cada muestra se ha realizado por una parte el análisis utilizando el método de referencia (pág. 86) y por otra el análisis continuo de las mismas con las metodologías propuestas. En la metodología continua se han utilizado las mayores cantidades de muestra optimizadas previamente (0,0300g), para obtener una mayor sensibilidad en los resultados debido a las bajas concentraciones de manganeso presentes en las muestras. Se han comparado los resultados obtenidos por ambas metodologías y se han calculado las eficacias en la extracción (Tabla 174). De los resultados obtenidos se deduce que el tamaño de partícula no influye en la determinación de manganeso con el sistema propuesto. Esto simplifica mucho

el análisis, ya que no hay que someter la muestra a ningún tratamiento previo que garantice un cierto tamaño de partícula.

Tabla 174. Experimentos realizados en porciones de muestras con diferente tamaño de partícula para todos los tipos de muestras estudiados utilizando el método de referencia y las metodologías continuas propuestas. Se indica además la eficacia en la extracción del sistema FIA

Tipo de muestra	Muestra analizada	Tamaño de partícula	[Mn] obtenida mediante el método de referencia ($\mu\text{g/g}$)	[Mn] obtenida mediante los métodos continuos propuestos ($\mu\text{g/g}$)	(%)Eficacia en la extracción
Moluscos y pescados	Mejillón	<30 μm	$15,6 \pm 0,5$	$15,7 \pm 0,3$	100,5
		30-100 μm	$16,0 \pm 0,3$	$15,9 \pm 0,3$	99,6
Carnes	Hígado de conejo	<30 μm	$8,4 \pm 0,5^a$	$8,5 \pm 0,3^a$	101,1
		30-100 μm	$8,8 \pm 0,5^a$	$8,8 \pm 0,3^a$	100,0
Cereales y derivados	Cereales con cacao	<30 μm	$12,4 \pm 0,8$	$12,7 \pm 0,3$	102,4
		30-100 μm	$12,4 \pm 1,0$	$12,5 \pm 0,3$	101,0
Frutos secos	Avellanas	<30 μm	$42,3 \pm 0,8$	$42,1 \pm 0,3$	99,5
		30-100 μm	$42,8 \pm 0,8$	$42,7 \pm 0,3$	99,6
Legumbres	Garbanzos	<30 μm	$19,4 \pm 0,8$	$19,5 \pm 0,3$	101,2
		30-100 μm	$18,9 \pm 0,8$	$19,1 \pm 0,3$	101,2
Verduras, hortalizas y frutas	Lechuga	<30 μm	$35,3 \pm 0,5$	$35,7 \pm 0,3$	101,1
		30-100 μm	$35,5 \pm 0,8$	$36,0 \pm 0,5$	101,6

a: Se ha realizado una adición de 1 $\mu\text{g/mL}$ a la muestra debido la baja [Mn] presente

4.2 Optimización de los parámetros que afectan a la disolución de la muestra sólida de naturaleza alimenticia utilizando el sistema continuo de disolución asistida por ultrasonidos (CUDS)

En la optimización del CUES se han descrito los estudios de optimización realizados en función del metal analizado, y dentro de la clasificación por metales se han estudiado las diferentes muestras sólidas de naturaleza alimenticia. No se han estudiado las muestras de leche en polvo y fórmulas infantiles entre las mismas porque el proceso que tiene lugar en este tipo de muestras no es propiamente una extracción, sino que se observa que se forma una suspensión homogénea de la misma donde se determina el metal objeto de estudio. Debido a que este tipo de muestras constituyen un caso particular, se han estudiado por separado, ya que el sistema que se utiliza en este caso es el sistema continuo de disolución asistida por ultrasonidos (CUDS). Como ya se ha comentado la denominación CUDS no es totalmente correcta para este tipo de muestras porque el proceso que se lleva a cabo no es una disolución, pero por cuestiones de nomenclatura se ha mantenido el nombre en este caso.

4.2.1 Disolución de las muestras de leche en polvo y fórmulas infantiles

Se han estudiado las condiciones óptimas para realizar la “disolución” de las muestras de leche en polvo y fórmulas infantiles para después realizar la determinación de calcio, cinc, cobre hierro y magnesio. No se ha podido estudiar la concentración de manganeso en este tipo de muestras debido a que las concentraciones en las que se encuentra este metal no son detectables por FAAS. Probablemente, para poder llevar a cabo esta determinación sería necesario realizar una preconcentración de la suspensión de la muestra obtenida en el sistema continuo, pero éste no es un objetivo del presente trabajo de investigación.

Para llevar a cabo el estudio de los metales indicados hay que diferenciar dos situaciones establecidas en función del dispositivo FIA necesario para llevar a cabo la determinación. Por una parte se encuentran los metales cinc, cobre

e hierro, en los que para llevar a cabo este proceso se ha utilizado el dispositivo FIA indicado en la Figura 11 (pág. 76), y por otra parte, están los metales calcio y magnesio. Para estos dos metales se utiliza un dispositivo similar al del caso anterior, pero incluyendo un canal de dilución de lantano que realiza dos funciones: por una parte, diluye las elevadas concentraciones de calcio y magnesio presentes en las muestras de alimentos y, por otra, elimina las interferencias químicas que sufren estos metales en la celda de atomización (Figura 12, pág. 76). La dilución realizada para este tipo de muestra, tanto para la determinación de calcio como de magnesio, es 1:25.

Este hecho también se refleja en la optimización del proceso. En ambos casos se utiliza un diseño factorial de Screening de Plackett-Burman, pero el diseño aplicado es diferente, ya que el número de variables que afectan al proceso es diferente. Para los metales cinc, cobre e hierro, las variables que afectan al proceso son seis, y son las implicadas en el proceso de “disolución” (concentración de HNO_3 , concentración de HCl , tiempo de sonicación, temperatura de disolución, caudal de disolución y volumen de disolución). Así, el diseño factorial aplicado para la optimización del proceso es el diseño de Plackett-Burman $2^6 \cdot 3/16$ de resolución tipo IV con 6 grados de libertad y un punto central, cuya matriz de experimentos se recoge en la Tabla 27 (pág. 104). En el caso de los metales calcio y magnesio, además de estas variables se ha considerado la variable concentración de La, que aunque no es una variable implicada directamente en el proceso de disolución, es una variable que hay que estudiar en este proceso pues la determinación de los metales sin realizar una dilución y sin eliminar las interferencias sería inviable. Por tanto, el diseño factorial aplicado en este caso es el diseño de Plackett-Burman $2^7 \cdot 3/32$ de resolución tipo III con 5 grados de libertad y un punto central, cuya matriz de experimentos se muestra en la Tabla 28 (pág. 104). Se observa que, en ambos casos, se han incluido como variables las concentraciones de los ácidos nítrico y clorhídrico, a pesar de que como se ha indicado, el proceso que tiene lugar es la formación de una suspensión homogénea de la muestra. En principio, se han considerado estas dos variables para estudiar si la presencia de ácidos puede mejorar bien el proceso en sí o las características analíticas del mismo.

Para poder realizar los diseños se han fijado los valores máximos y mínimos para cada variable. En la Tabla 175 se indican los valores establecidos para los

metales cinc, cobre e hierro, y en la Tabla 176 los establecidos para el calcio y el magnesio. Estos valores fueron seleccionados en función de experimentos realizados en estudios previos. Los valores establecidos en los dos casos son prácticamente idénticos, sólo se diferencian en el intervalo estudiado en el volumen disolución, que es más amplio en el caso del calcio y el magnesio debido a las elevadas concentraciones de estos metales en las muestras, y en que en este último caso hay una variable más (la concentración de La).

Tabla 175. Valores máximos y mínimos establecidos para cada variable en el diseño de Plackett-Burman utilizado para optimizar la determinación de Zn, Cu y Fe en muestras de leche en polvo y fórmulas infantiles

VARIABLE	NOTACIÓN	VALOR MÍNIMO	VALOR MÁXIMO
[HNO ₃]	A	0 M	3M
[HCl]	B	0 M	3 M
Tiempo de sonicación	C	0,5 min	5 min
Temperatura de disolución	D	20 °C	70 °C
Caudal de disolución	E	3,5 mL/min	6 mL/min
Volumen de disolución	F	1,0 mL	3 mL

Tabla 176. Valores máximos y mínimos establecidos para cada variable en el diseño de Plackett-Burman utilizado para optimizar la determinación de Ca y Mg en muestras de leche en polvo y fórmulas infantiles

VARIABLE	NOTACIÓN	VALOR MÍNIMO	VALOR MÁXIMO
[HNO ₃]	A	0 M	3M
[HCl]	B	0 M	3 M
Tiempo de sonicación	C	0,5 min	5 min
Temperatura de disolución	D	20 °C	70 °C
Caudal de disolución	E	3,5 mL/min	6 mL/min
Volumen de disolución	F	1,0 mL	5 mL
[La]	G	0%	5%

Una vez obtenidas las matrices del diseño, se realizaron los 13 experimentos fijados en las mismas utilizando los correspondientes dispositivos FIA (Figuras 11 y 12). Para realizar estos experimentos sobre las diferentes matrices, se han utilizado materiales de referencia en los que se certificaba la concentración del metal objeto de estudio (Tabla 177). La cantidad de material de referencia utilizada para llevar a cabo la optimización del proceso se ha fijado en función de la concentración del metal presente, y en los casos del calcio y del magnesio, también se ha tenido en cuenta la dilución propuesta para cada tipo de matriz. En el caso de la determinación de cobre se ha tenido que realizar una adición de 1 µg/mL del metal debido a la baja concentración del mismo en el material de referencia.

Tabla 177. Materiales de referencia utilizados en la optimización del proceso continuo de “disolución” de las muestras de leche en polvo y fórmulas infantiles para la determinación de los metales Ca, Zn, Cu, Fe y Mg, concentración certificadas de los metales y cantidad utilizada en la optimización

Metal objeto de estudio	Material de referencia	[Me](µg/g) ^a	Cantidad de muestra (g, peso seco)
Ca	Leche en polvo desnatada BCR-063R ^b	13490 ± 100	0,0050
Zn	Leche en polvo desnatada BCR-063R ^b	49,0 ± 0,6	0,0100
Cu	Leche en polvo desnatada BCR-151 ^b	5,23 ± 0,08	0,0300 ^c
Fe	Leche en polvo desnatada BCR-151 ^b	50,1 ± 1,3	0,0300
Mg	Leche en polvo desnatada BCR-151 ^b	1263 ± 24	0,0050

a. [Me]: Concentración certificada en el material de referencia correspondiente del metal objeto de estudio

b. BCR: Community Bureau of Reference

c. Se ha tenido que realizar una adición de 1 µg/mL de Cu debido a las bajas concentraciones del mismo presente en el material de referencia

Las matrices de los dos diseños de Plackett-Burman con los valores que toma cada variable en cada experimento y el % recuperación obtenido en cada uno de ellos para cada metal se recogen en la Tablas 178 y 179. Los

experimentos se han realizado por duplicado, por lo que el % recuperación indicado es la media obtenida de los dos experimentos.

$$(\%) \text{Recuperación} = \frac{\text{concentración del metal determinada experimentalmente}}{\text{concentración del metal certificada}} \times 100$$

Tabla 178. Matriz del diseño de Plackett-Burman $2^{7*3/32}$ con los valores de cada variable en cada experimento y el %recuperación para el calcio y magnesio obtenida en cada uno de ellos para las muestras de leche en polvo y fórmulas infantiles

							%Recuperación	
A	B	C	D	E	F	G	Calcio	Magnesio
3	0	5	20	3,5	1	5	99,4	100,0
3	3	0,5	70	3,5	1	0	36,0	40,1
0	3	5	20	6	1	0	54,7	59,1
3	0	5	70	3,5	5	0	55,2	61,3
3	3	0,5	70	6	1	5	100,5	100,0
3	3	5	20	6	5	0	60,4	61,3
1,5	1,5	2,75	45	4,75	3	2,5	101,7	100,4
0	3	5	70	3,5	5	5	102,0	101,5
0	0	5	70	6	1	5	98,4	100,0
0	0	0,5	70	6	5	0	34,4	39,4
3	0	0,5	20	6	5	5	96,8	101,5
0	3	0,5	20	3,5	5	5	86,4	83,2
0	0	0,5	20	3,5	1	0	36,0	39,3

A, [HNO₃]; B, [HCl]; C, Tiempo sonicación; D, Temperatura de disolución; E, Caudal de disolución; F, Volumen de disolución; G, [La]

Tabla 179. Matriz del diseño de Plackett-Burman $2^6 \cdot 3/16$ con los valores de cada variable en cada experimento y el %recuperación para el cinc, cobre e hierro obtenida en cada uno de ellos para las muestras de leche en polvo y fórmulas infantiles

A	B	C	D	E	F	%Recuperación		
						Zn	Cu	Fe
3	0	5	20	3,5	1	101,9	101,7	103,4
3	3	0,5	70	3,5	1	91,2	94,2	96,7
0	3	5	20	6	1	101,9	103,5	103,4
3	0	5	70	3,5	3	100,9	99,4	103,5
3	3	0,5	70	6	1	101,9	103,5	101,2
3	3	5	20	6	3	100,9	101,5	103,5
1,5	1,5	2,75	45	4,75	1,5	100,4	101,0	100,1
0	3	5	70	3,5	3	100,9	101,5	103,5
0	0	5	70	6	1	101,9	103,5	103,4
0	0	0,5	70	6	3	100,9	101,5	103,5
3	0	0,5	20	6	3	100,9	101,5	103,5
0	3	0,5	20	3,5	3	89,2	91,2	90,2
0	0	0,5	20	3,5	1	90,2	94,2	94,5

A, [HNO₃]; B, [HCl]; C, Tiempo sonicación; D, Temperatura de disolución; E, Caudal de disolución; F, Volumen de disolución

Una vez obtenidos los datos experimentales se procede al análisis correspondiente de los diseños. En principio es necesario conocer que variables son significativas, es decir aquellas que van a tener una gran influencia sobre la determinación de los metales, para ello se recurre a la **Carta Pareto estandarizada** (Figura 69). En este gráfico se representa el valor absoluto del efecto estimado de cada variable en el proceso mediante barras, lo que ayuda a estudiar la importancia relativa de las mismas.

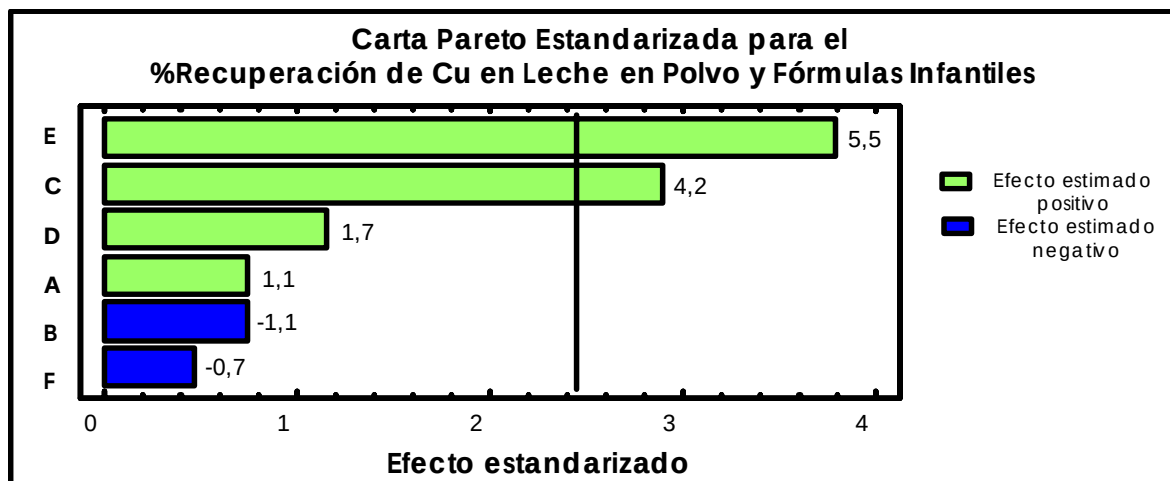
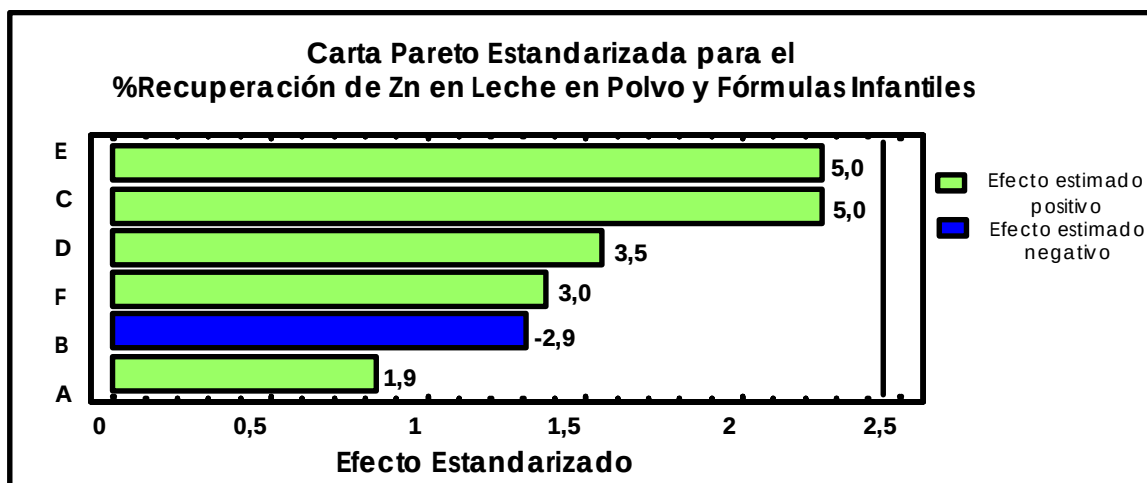
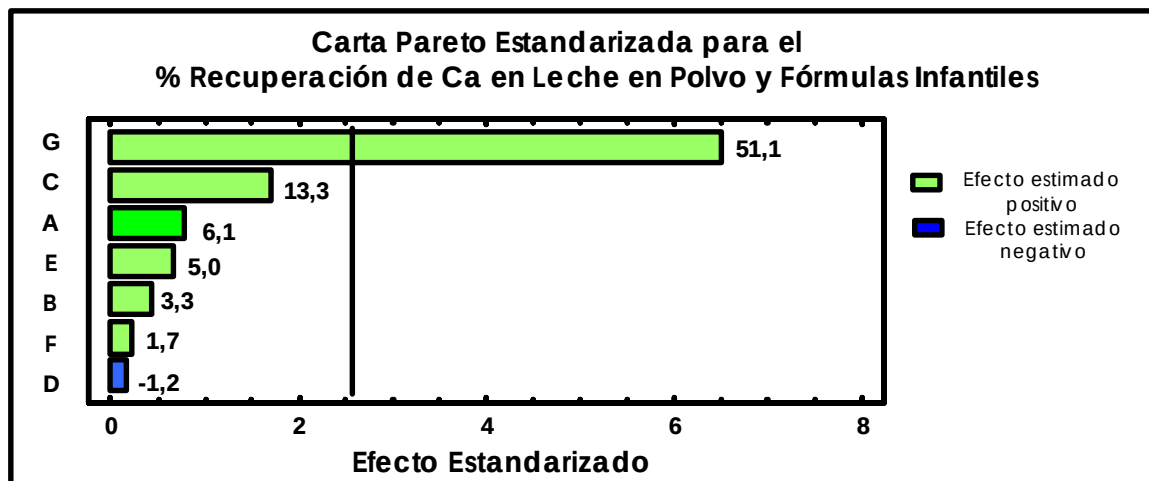


Figura 69. Carta Pareto estandarizada de los efectos principales estandarizados en el diseño factorial; la flecha vertical indica el límite de significación estadística para los efectos. A, $[\text{HNO}_3]$; B, $[\text{HCl}]$; C, Tiempo sonicación; D, Temperatura de disolución; E, Caudal de disolución; F, Volumen de disolución; G, $[\text{La}]$.

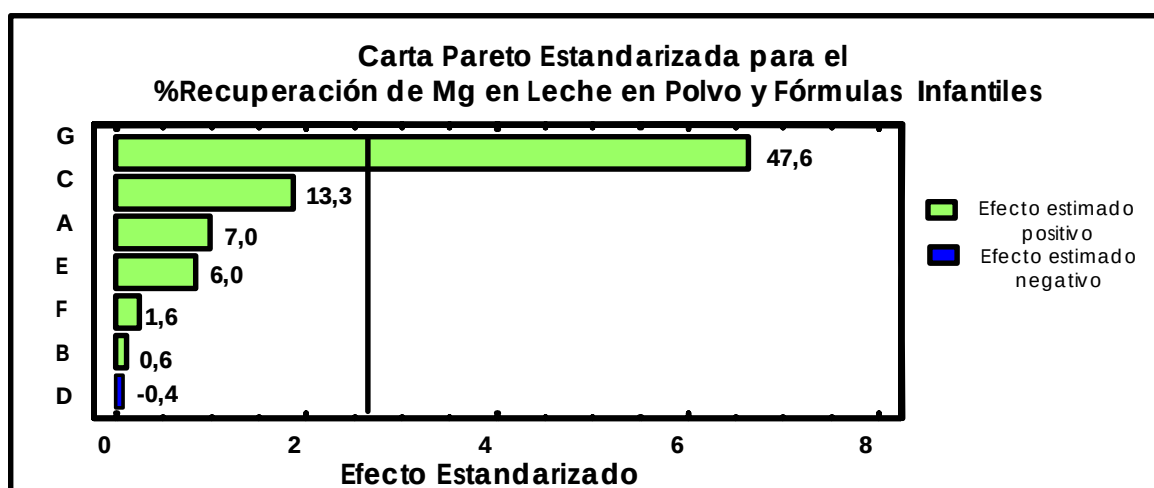
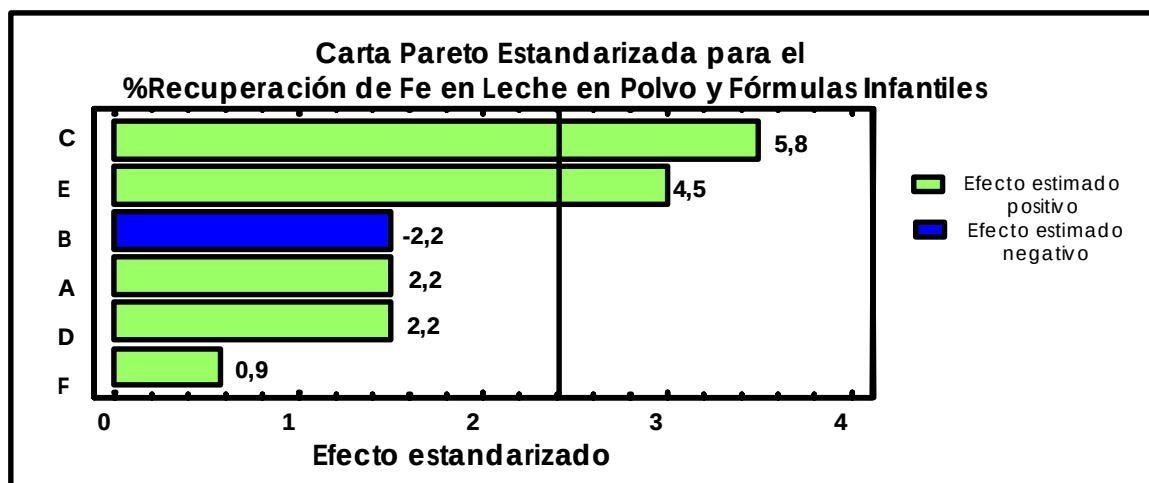


Figura 69 (continuación). Carta Pareto estandarizada de los efectos principales estandarizados en el diseño factorial; la flecha vertical indica el límite de significación estadística para los efectos. A, $[\text{HNO}_3]$; B, $[\text{HCl}]$; C, Tiempo sonicación; D, Temperatura de disolución; E, Caudal de disolución; F, Volumen de disolución; G, $[\text{La}]$.

• Análisis de los resultados obtenidos con el diseño factorial

En los resultados obtenidos al aplicar el diseño de Screening se observan dos situaciones diferentes, una correspondiente a los metales calcio y magnesio, y otra correspondiente a los metales cinc, cobre y hierro.

En las cartas Pareto correspondientes a las determinaciones de calcio y magnesio se observa que sólo hay una variable estadísticamente significativa en el proceso, que es la concentración de La. Esta variable presenta en ambos casos una gran influencia positiva en el proceso, lo que significa que para los niveles estudiados un incremento en el valor de esta variable

implicaría un incremento en el %recuperación, como se puede observar en las superficies de respuesta de las variables de mayor efecto estimado en cada proceso recogidas en la Figura 70.

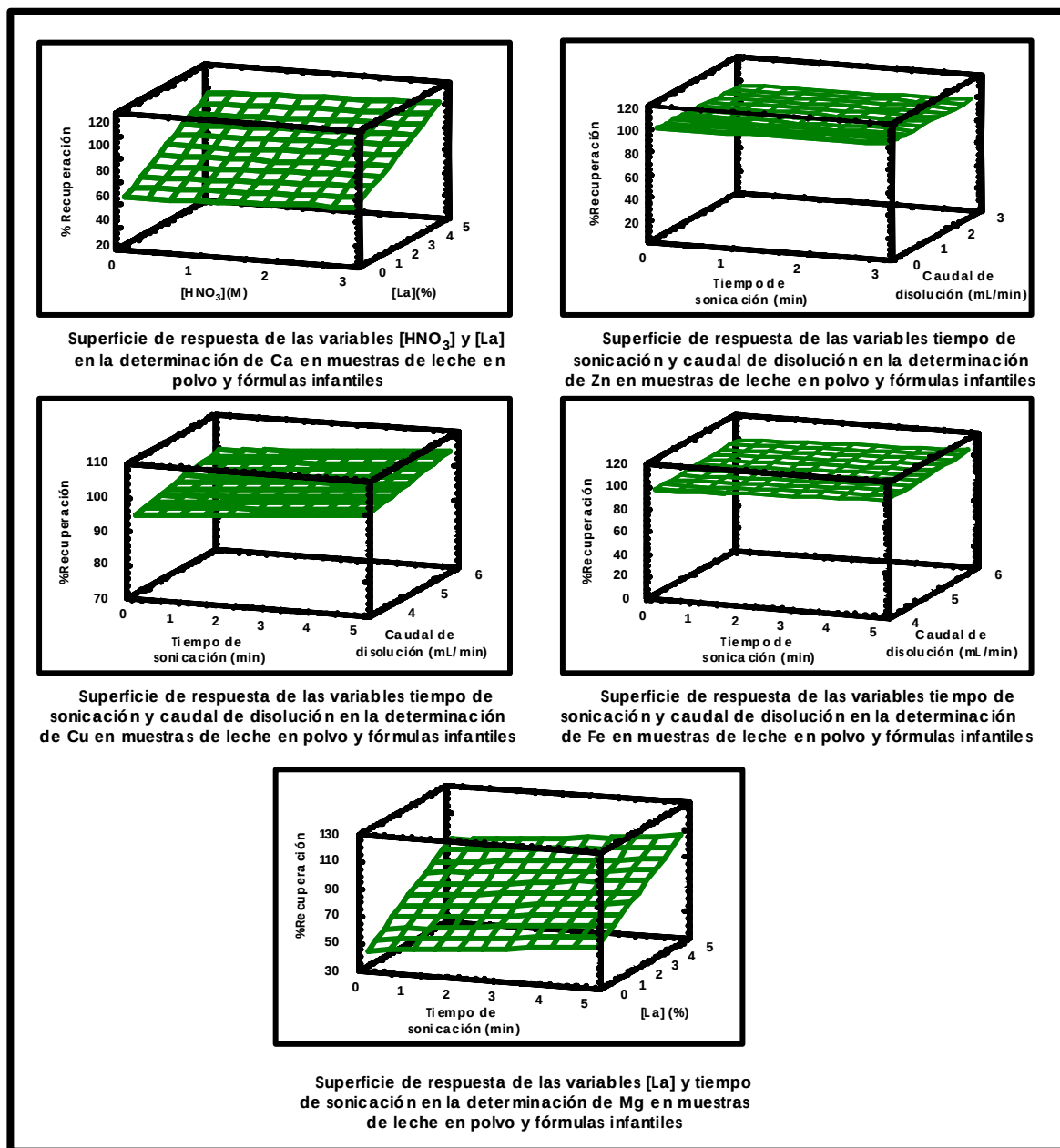


Figura 70. Superficies de respuesta proporcionadas por el diseño de Plackett-Burman para las variables de mayor efecto estimado en la determinación de Ca, Zn, Cu, Fe y Mg en muestras de leche en polvo y fórmulas infantiles (las demás variables toman el valor medio del intervalo de estudio establecido en el diseño)

Las demás variables tienen una mayor o menor influencia sobre el proceso en el intervalo estudiado, pero como se observa en los gráficos obtenidos, no superan el nivel de significación establecido por el método para un 95% de confianza (representado por la línea vertical). Dentro de estas variables no significativas se encuentran las concentraciones de los ácidos HNO_3 y HCl . Estas variables tienen efectos estimados positivos de muy bajo valor absoluto. Tanto es así, que si se tiene presente el experimento número 9 de la matriz de Plackett-Burman (Tabla 178) realizada para este tipo de matriz, se observa que se obtienen %recuperación del 98,4% y 100,0% para el calcio y el magnesio cuando la disolución disolvente es agua ultrapura. Además, si se observan las superficies de respuesta para estas dos variables proporcionadas por el diseño se observa que el %recuperación es en torno al 100% independientemente de los valores que tomen estas variables (Figura 71). Estos datos indican que lo que realmente ocurre en este tipo de matrices lo es la formación de una suspensión acuosa homogénea de la muestra, y no una extracción de los metales, ya que no es necesaria la presencia de ácidos para obtener resultados cuantitativos, siendo el agua ultrapura suficiente para “disolver” la muestra. Con respecto al tiempo de sonicación, al caudal y al volumen de disolución se observa una influencia positiva en el proceso, mientras que la temperatura está afectada por un efecto negativo.

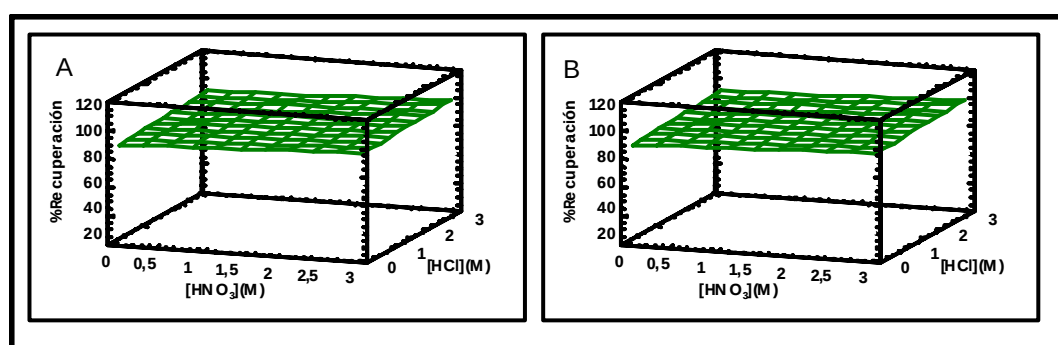


Figura 71. Superficie de respuesta obtenida con el modelo de Plackett-Burman para las variables $[\text{HNO}_3]$ y $[\text{HCl}]$ en el análisis de (A) calcio y (B) magnesio de las muestras de leche en polvo y fórmulas infantiles, donde las demás variables toman el valor medio del intervalo de estudio establecido en el diseño, Tiempo de sonicación=2,75 min; Temperatura de disolución=45°C; Caudal de disolución= 4,75 mL/min; Volumen de disolución=3 mL; $[\text{La}]$ =2,5%

En las cartas Pareto del cinc, el cobre y el hierro la situación es diferente. En estos casos las variables de mayor influencia en el proceso son el caudal de disolución y el tiempo de sonicación, ambas con un efecto positivo en el proceso (Figura 70). Sin embargo, estas dos variables sólo son significativas en los casos del cobre y del hierro. En el caso del cinc no hay ninguna variable significativa.

Con respecto a las variables no significativas, se observa una situación similar a los casos del calcio y el magnesio. Las concentraciones de los ácidos son variables de un efecto estimado muy bajo, llegando en el caso del HCl a ser negativo. El signo negativo esta variable se justifica a partir de los cálculos estadísticos, no tiene un significado químico. Este resultado corrobora de nuevo que el agua ultrapura es suficiente para llevar a cabo la formación de la suspensión de la muestra. Este hecho también se refleja en los %recuperación obtenidos en el experimento número 9 y 10 de la matriz de Plackett-Burman (Tabla 179) donde la disolución utilizada para el proceso es agua ultrapura. Las superficies de respuesta de las concentraciones de los ácidos estudiados para el Zn, Cu y Fe tienen una forma similar a las obtenidas para el Ca y Mg (Figura 71). Con respecto a la temperatura y el volumen de disolución los efectos estimados son de muy bajo valor absoluto. En el caso de la temperatura de disolución su efecto presenta un signo positivo para los tres metales. Sin embargo, el volumen de disolución presenta un signo positivo para el caso del cinc, mientras que para el cobre y el hierro presenta un signo negativo.

Una vez analizados los resultados obtenidos al aplicar el diseño de Plackett-Burman, los valores optimos según el diseño de Screening para cada una de las variables son los recogidos en la Tabla 180.

Tabla 180. Valores óptimos según el diseño de Plackett-Burman para cada una de las variables implicadas en el proceso de “disolución” de las muestras de leche en polvo y fórmulas infantiles

Variables	VALORES ÓPTIMOS PARA CADA UNA DE LAS VARIABLES SEGÚN EL DISEÑO DE PLACKETT-BURMAN				
	Ca	Zn	Cu	Fe	Mg
A (M)	3	3	3	3	3
B (M)	3	0	0	0	3
C (min)	5	5	5	5	5
D (°C)	20	70	70	70	20
E (mL/min)	3,5	6,0	6,0	6,0	6,0
F (mL)	5	3	3	3	5
G (%)	5	-	-	-	5

A, [HNO₃]; B, [HCl]; C, Tiempo sonicación; D, Temperatura de disolución; E, Caudal de disolución; F, Volumen de disolución; G, [La].

Como los resultados proporcionados por el diseño de Plackett-Burman son las tendencias de cada una de las variables hacia el valor óptimo, se realizaron una serie de experimentos fuera del marco del diseño, de acuerdo con los resultados obtenidos por el mismo, para obtener los valores óptimos de cada variable para la determinación de cada metal.

- **Experimentos realizados fuera del marco del diseño**
- **Experimentos realizados para la optimización de la determinación de calcio en la muestras de Leche en Polvo y Fórmulas Infantiles**

En la determinación de calcio en las muestras de leche en polvo y fórmulas infantiles sólo es significativa la variable concentración de La. Las demás variables presentan efectos estimados muy bajos, y por lo tanto, se puede considerar que estas variables dentro de los intervalos estudiados apenas afectan al proceso.

Dentro de estas variables de bajo efecto estimado se encuentran las **concentraciones de los ácidos HNO₃ y HCl**. Estos efectos se ven corroborados con los resultados obtenidos en el análisis, en concreto en el experimento número 9 de la matriz de Plackett-Burman (Tabla 178) donde la disolución utilizada en el proceso es agua ultrapura y el %recuperación es cuantitativo

(98,4%). Este resultado también se refleja en la superficie de respuesta en donde se observa que el %recuperación es en torno al 100% independientemente de los valores que tomen estas dos variables (Figura 71). En consecuencia, los valores considerados como óptimos para estas variables es cero, es decir, el proceso considerado como óptimo es la formación de una suspensión acuosa de la muestra.

La variable **volumen de disolución** un efecto estimado positivo, pero su valor absoluto es muy bajo. Sin embargo, a pesar de ese efecto positivo, se ha observado que 1mL de la misma es suficiente para disolver la muestra de leche en polvo (experimento 9 de la matriz de Plackett-Burman, Tabla 178). Debido a que un volumen pequeño de disolución proporciona resultados más precisos (ya que las señales de absorbancia son más elevadas, 0,097 unidades de absorbancia con 1 mL de disolución frente a 0,020 con 5 mL), además de que así el circuito de disolución no es tan grande, lo que haría más dificultosa la homogeneización completa de la muestra. Por tanto, se ha considerado como valor óptimo de volumen de disolución disolvente 1 mL. Al igual que en los restantes casos, no se ha estudiado la posibilidad de utilizar volúmenes más bajos de disolución porque no lo permiten las características físicas del sistema.

La **temperatura de disolución** es la única variable en este proceso con un efecto estimado negativo, pero hay que tener en cuenta que su valor absoluto es cercano al cero. Teniendo en cuenta este efecto estimado y los experimentos 1 y 11 de la matriz de Plackett-Burman (Tabla 178), donde se obtienen %recuperación cuantitativos a temperatura ambiente, se ha considerado como valor óptimo de esta variable 20°C.

El **tiempo de sonicación** se ha optimizado con el **caudal de disolución**, ya que estas dos variables están relacionadas, con el objetivo de conseguir realizar el análisis en el menor tiempo posible. Así, se ha estudiado el tiempo de sonicación a los dos caudales establecidos en el diseño de Plackett-Burman, 3,5 mL/min y 6,0 mL/min (Figura 72). En los resultados obtenidos se observa que el menor tiempo de análisis con el que se obtiene un %recuperación cuantitativo es 0,5 min a un caudal de disolución de 6,0 mL/min. Por tanto, éstos son los valores establecidos como óptimos para estas dos variables en este proceso.

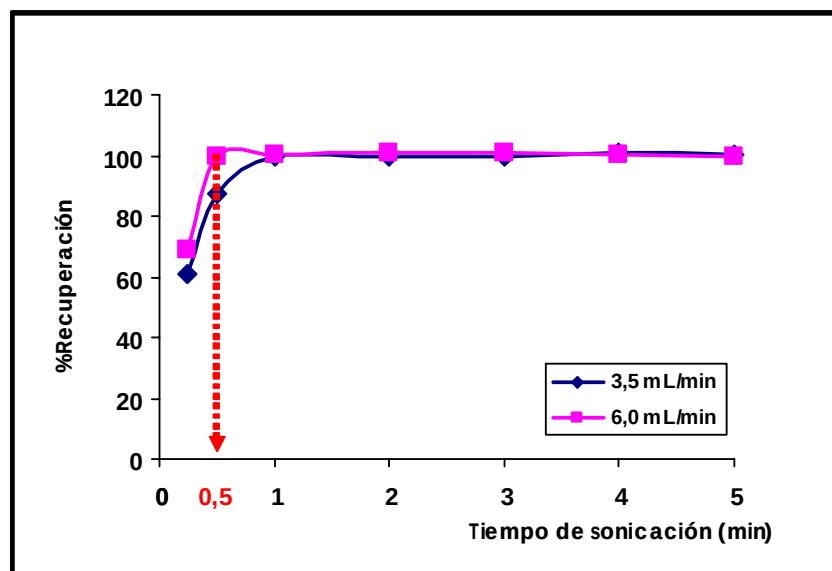


Figura 72. Experimentos realizados para la optimización del tiempo de sonicación a un caudal de extracción de 3,5 mL/min y 6,0 mL/min. $[\text{HNO}_3]=0\text{M}$; $[\text{HCl}]=0\text{M}$; Temperatura de extracción= 20°C ; Volumen de disolución extractante=1mL; $[\text{La}]=5\%$

Además de las variables no significativas, se ha estudiado fuera del marco del diseño la única variable significativa del proceso, la **concentración de lantano**, con el objetivo de disminuir al máximo su concentración (Tabla 181). Se observa que no es necesario utilizar La al 5% para eliminar las interferencias, sino que, La 2% es suficiente para obtener resultados satisfactorios.

Tabla 181. Experimentos realizados para la optimización de la concentración de lantano

[La] (%) ^a	[Ca] $\mu\text{g/g}$ ^b	(%)Recuperación
5	13506 ± 81	100,1
4	13459 ± 81	99,8
3	13552 ± 140	100,5
2	13412 ± 0	99,4
1	12010 ± 140	89,0

a. $[\text{HNO}_3]=0\text{M}$; $[\text{HCl}]=0\text{M}$; Tiempo de sonicación= 0,5 min; Temperatura de disolución= 20°C ; Caudal de disolución=6,0 mL/min; Volumen de disolución=1mL

b. $[\text{Ca}] = \text{Media} \pm \text{desviación estándar (n=3)}$

Los valores óptimos para cada variable implicada en la disolución de las muestras de leche y fórmulas infantiles para la determinación de calcio se indican en la Tabla 182.

Tabla 182. Valores óptimos para cada una de las variables implicadas en el proceso de disolución de las muestras de leche y fórmulas infantiles para la determinación de calcio

VARIABLE	VALORES ÓPTIMOS PARA CADA UNA DE LAS VARIABLES
[HNO ₃]	0M
[HCl]	0M
Tiempo de sonicación	0,5 min
Temperatura de disolución	20°C
Caudal de disolución	6,0 mL/min
Volumen de disolución	1 mL
[La]	2 %

- **Experimentos realizados para la optimización de la determinación de cinc en la muestras de Leche en Polvo y Fórmulas Infantiles**

La determinación de cinc en las muestras de leche en polvo y fórmulas infantiles es un caso bastante particular, pues como indica la carta Pareto correspondiente, en este proceso parece no haber ninguna variable significativa. Las variables que parecen ser las que más podrían afectar al mismo son el caudal de disolución y el tiempo de sonicación.

Con respecto a las demás variables se observa que, **las concentraciones de los ácidos HNO₃ y HCl** tienen un efecto estimado muy bajo, llegando a ser en torno a cero (e incluso negativo debido a la estadística) para el caso del HCl. Así, teniendo en cuenta los experimentos 9 y 10 de la matriz de Plackett-Burman (Tabla 179) se observa que no es necesaria la presencia de los ácidos para obtener %recuperación cuantitativos (101,9% y 100,9%, respectivamente). En consecuencia, la disolución considerada como óptima para el proceso es agua ultrapura.

En lo que respecta al **volumen** y a la **temperatura de disolución**, se observa en la matriz del diseño (experimentos 1 y 3, Tabla 179) que 1 mL de disolución y a temperatura ambiente se obtienen recuperaciones cuantitativas. Debido a que el objetivo es disminuir al máximo los valores de estas dos variables, éstos son los valores considerados como óptimos.

El **tiempo de sonicación** se ha optimizado con el **caudal de disolución**, ya que estas dos variables están relacionadas, con el objetivo de conseguir llevar a cabo el análisis en el menor tiempo posible. Así, se ha estudiado el tiempo de sonicación a los dos caudales establecidos en el diseño de Plackett-Burman, 3,5 mL/min y 6,0 mL/min (Figura 73). En los resultados se observa que el menor tiempo de sonicación para el que se obtiene un %recuperación cuantitativo es 0,5 min (caudal 6mL/min). Por tanto, estos dos son los valores considerados como óptimos en el proceso.

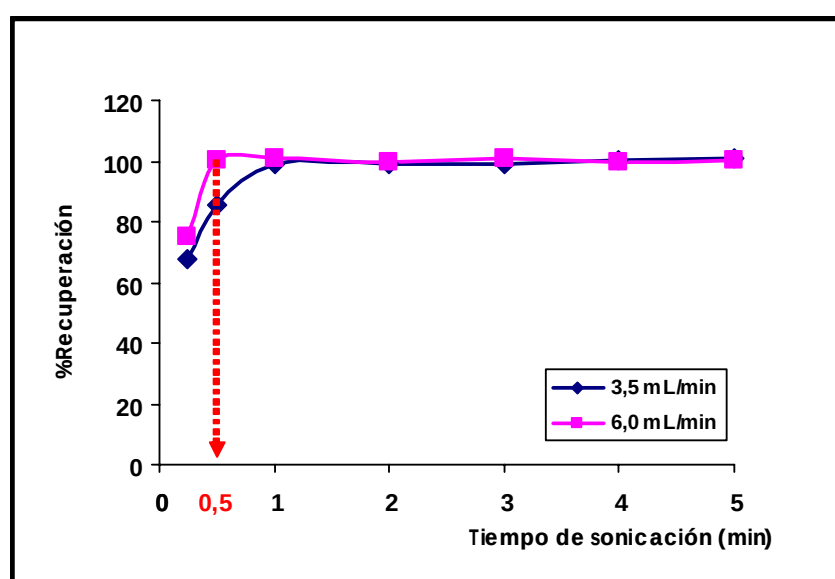


Figura 73. Experimentos realizados para la optimización del tiempo de sonicación a un caudal de extracción de 3,5 mL/min y 6,0 mL/min. $[\text{HNO}_3]=0\text{M}$; $[\text{HCl}]=0\text{M}$; Temperatura de extracción= 20°C ; Volumen de disolución extractante=1mL

Una vez optimizados todos los valores, los valores óptimos para cada variable implicadas en la disolución de las muestras de leche y fórmulas infantiles para la determinación de cinc se indican en la Tabla 183.

Tabla 183. Valores óptimos para cada una de las variables implicadas en el proceso de disolución de las muestras de leche y fórmulas infantiles para la determinación de cinc

VARIABLE	VALORES ÓPTIMOS PARA CADA UNA DE LAS VARIABLES
[HNO ₃]	0M
[HCl]	0M
Tiempo de sonicación	0,5 min
Temperatura de disolución	20°C
Caudal de disolución	6,0 mL/min
Volumen de disolución	1 mL

- **Experimentos realizados para la optimización de la determinación de cobre en la muestras de Leche en Polvo y Fórmulas Infantiles**

La determinación de cobre de las muestras de leche en polvo y fórmulas infantiles está afectada significativamente por las variables caudal de disolución y tiempo de sonicación.

Las demás variables presentan efectos estimados muy bajos. Dentro de estas variables se encuentran **las concentraciones de los ácidos HNO₃ y HCl**, cuyos efectos son en torno a cero (en el caso del HCl llega a ser negativo debido a la estadística). Así, teniendo en cuenta los experimentos 9 y 10 de la matriz de Plackett-Burman (Tabla 179) se observa que no es necesaria la presencia de los ácidos para obtener %recuperación cuantitativos (103,5% y 101,5%, respectivamente). En consecuencia, el proceso considerado como óptimo es la formación de la suspensión de la muestra utilizando agua ultrapura.

En lo que respecta al **volumen** y a la **temperatura de disolución**, se observa en la matriz del diseño (experimentos 1 y 3, Tabla 179) que 1mL de disolución y a temperatura ambiente se obtienen %recuperación cuantitativos. En consecuencia, éstos son los valores considerados como óptimos.

En este caso, como indica la carta Pareto (Figura 69), las variables significativas son el **caudal de disolución** y el **tiempo de sonicación**. Sin embargo, la importancia de estas variables en el proceso es una importancia

relativa, ya que sus efectos estimados son de bajo valor absoluto, además de que, si se analiza la superficie de respuesta (Figura 70) para estas dos variables se observa que para alcanzar un 100% de recuperación no es necesario que estas dos variables tomen los valores máximos establecidos en el intervalo de estudio propuesto en el diseño. Así se ha estudiado el tiempo de sonicación a los dos caudales establecidos en el diseño de Plackett-Burman, 3,5 mL/min y 6,0 mL/min (Figura 74) con el objetivo de disminuir al máximo el tiempo de análisis. A la vista de los resultados los valores óptimos para estas dos variables son 0,5 minutos y 6,0 mL/min, respectivamente, ya que éstos son los valores con los que se obtienen %recuperación cuantitativos y la frecuencia de muestreo más elevada.

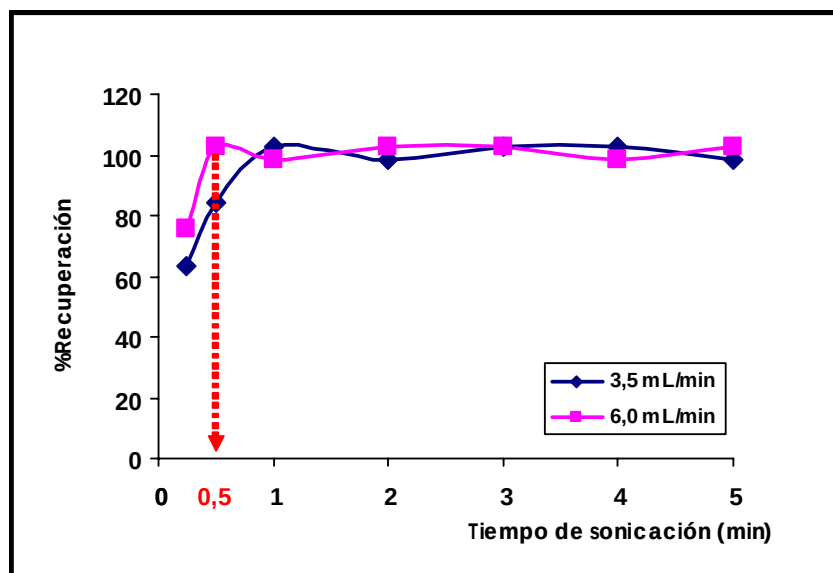


Figura 74. Experimentos realizados para la optimización del tiempo de sonicación a un caudal de extracción de 3,5 mL/min y 6,0 mL/min. $[\text{HNO}_3]=0\text{M}$; $[\text{HCl}]=0\text{M}$; Temperatura de extracción= 20°C ; Volumen de disolución extractante=1mL

Los valores óptimos para cada variable implicada en la disolución de las muestras de leche y fórmulas infantiles para la determinación de cobre se indican en la Tabla 184.

Tabla 184. Valores óptimos para cada una de las variables implicadas en el proceso de disolución de las muestras de leche y fórmulas infantiles para la determinación de cobre

VARIABLE	VALORES ÓPTIMOS PARA CADA UNA DE LAS VARIABLES
[HNO ₃]	0M
[HCl]	0M
Tiempo de sonicación	0,5 min
Temperatura de disolución	20°C
Caudal de disolución	6,0 mL/min
Volumen de disolución	1 mL

- **Experimentos realizados para la optimización de la determinación de hierro en la muestras de Leche en Polvo y Fórmulas Infantiles**

Las variables significativas en el proceso de determinación del hierro en las muestras de leche en polvo y fórmulas infantiles son el tiempo de sonicación y el caudal de disolución. Como ha ocurrido en los estudios previos realizados en esta matriz, las demás variables tienen efectos estimados muy bajos. Dentro de estas variables se encuentran **las concentraciones de los ácidos HNO₃ y HCl**, cuyos efectos son en torno a cero (en el caso del HCl llega a ser negativo debido a la estadística). Así, teniendo en cuenta los experimentos 9 y 10 de la matriz de Plackett-Burman (Tabla 179) se observa que no es necesaria la presencia de los ácidos para obtener %recuperación cuantitativos (103,4% y 103,5%, respectivamente). En consecuencia, el proceso establecido como óptimo es la formación de la suspensión de la muestra utilizando agua ultrapura, es decir, prescindiendo de la presencia de los ácidos.

En lo que respecta a las variables, **volumen y temperatura de disolución**, se observa en la matriz del diseño (experimentos 1 y 3, Tabla 179) que con 1mL de disolución y a temperatura ambiente se obtienen %recuperación cuantitativos (103,4% en ambos casos). Debido a que el objetivo es disminuir al máximo los valores de estas dos variables, éstos son los valores considerados como óptimos.

Las variables significativas son el **tiempo de sonicación** y el **caudal de disolución**, con efectos estimados de 5,8 y 4,5 respectivamente. Sin embargo, la importancia de estas variables en el proceso es una importancia relativa, ya que sus efectos estimados son de bajo valor absoluto, además de que, como ya se ha indicado, si se analiza la superficie de respuesta para estas dos variables se observa que el %recuperación se encuentra en torno al 100%, independientemente de los valores que tomen estas variables. Así, se ha estudiado el tiempo de sonicación a los dos caudales establecidos en el diseño de Plackett-Burman, 3,5 mL/min y 6,0 mL/min (Figura 75) con el objetivo de disminuir al máximo el tiempo de análisis. A la vista de los resultados se han establecido los valores óptimos para estas dos variables, tiempo de sonicación y caudal de disolución respectivamente, en 0,5 minutos y 6,0 mL/min, ya que con estos valores se obtienen %recuperación cuantitativos y la frecuencia de muestreo más elevada.

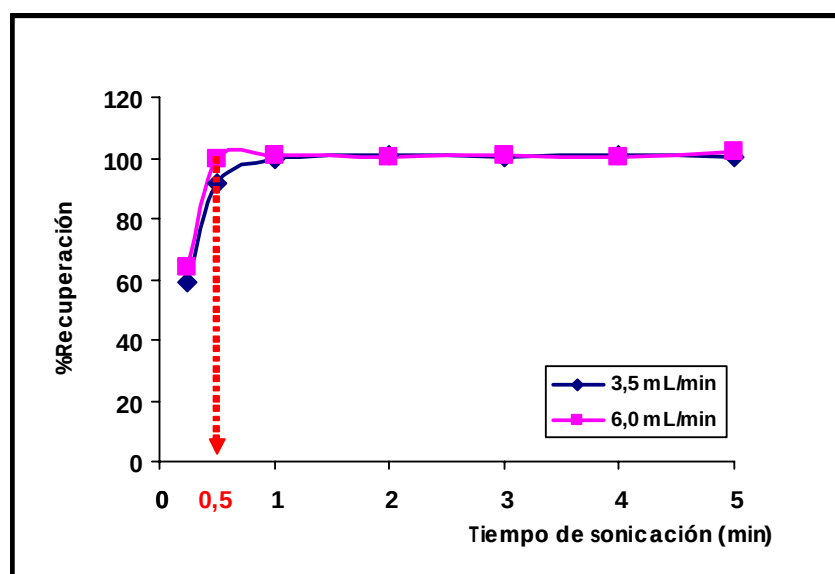


Figura 75. Experimentos realizados para la optimización del tiempo de sonicación a un caudal de extracción de 3,5 mL/min y 6,0 mL/min. $[\text{HNO}_3]=0\text{M}$; $[\text{HCl}]=0\text{M}$; Temperatura de extracción= 20°C ; Volumen de disolución extractante=1mL

Los valores óptimos para cada variable implicada en la disolución de las muestras de leche y fórmulas infantiles para la determinación de hierro se indican en la Tabla 185.

Tabla 185. Valores óptimos para cada una de las variables implicadas en el proceso de disolución de las muestras de leche y fórmulas infantiles para la determinación de hierro

VARIABLE	VALORES ÓPTIMOS PARA CADA UNA DE LAS VARIABLES
[HNO ₃]	0M
[HCl]	0M
Tiempo de sonicación	0,5 min
Temperatura de disolución	20°C
Caudal de disolución	6,0 mL/min
Volumen de disolución	1 mL

- Experimentos realizados para la optimización de la determinación de magnesio en la muestras de Leche en Polvo y Fórmulas Infantiles

El comportamiento de las variables en la determinación de magnesio en las muestras de leche en polvo y fórmulas infantiles es muy similar al caso ya estudiado de la disolución del calcio en esta misma matriz. En este proceso sólo es significativa la variable concentración de La. Las demás variables presentan efectos estimados muy bajos, y por lo tanto, se puede considerar que estas variables dentro de los intervalos estudiados apenas afectan al proceso. Dentro de estas variables se encuentran **las concentraciones de los ácidos HNO₃ y HCl**, cuyos efectos estimados son positivos, aunque muy bajos en valor absoluto. Tanto es así, que teniendo en cuenta el experimentos 9 de la matriz de Plackett-Burman (Tabla 178) se observa que no es necesaria la presencia de los ácidos para obtener %recuperación cuantitativos (100,0%). Este resultado también se refleja en la superficie de respuesta en donde se observa que el %recuperación es en torno al 100%, independientemente de los valores que tomen estas dos variables (Figura 71). En consecuencia, el proceso establecido como óptimo es la formación de la suspensión de la muestra utilizando agua ultrapura y prescindiendo de la presencia de los ácidos.

En lo que respecta a las variables **volumen y temperatura de disolución de disolución**, se observa en la matriz del diseño (experimento 1, Tabla 178) que

utilizando 1mL de disolución y a temperatura ambiente, el %recuperación es cuantitativo (100,0%). Dado que el objetivo es disminuir al máximo los valores de estas dos variables, éstos son los valores considerados como óptimos.

Las variables **tiempo de sonicación** y **caudal de disolución**, presentan efectos estimados positivos pero no llegan tampoco a ser significativas. Así se ha estudiado la combinación de ambas variables que proporcione la frecuencia de muestreo más elevada (Figura 76). En los resultados se observa que el menor tiempo de sonicación para el que se obtiene un %recuperación cuantitativo es de 0,5 min a un caudal de 6mL/min. Por tanto, éstos serán los valores óptimos para estas dos variables.

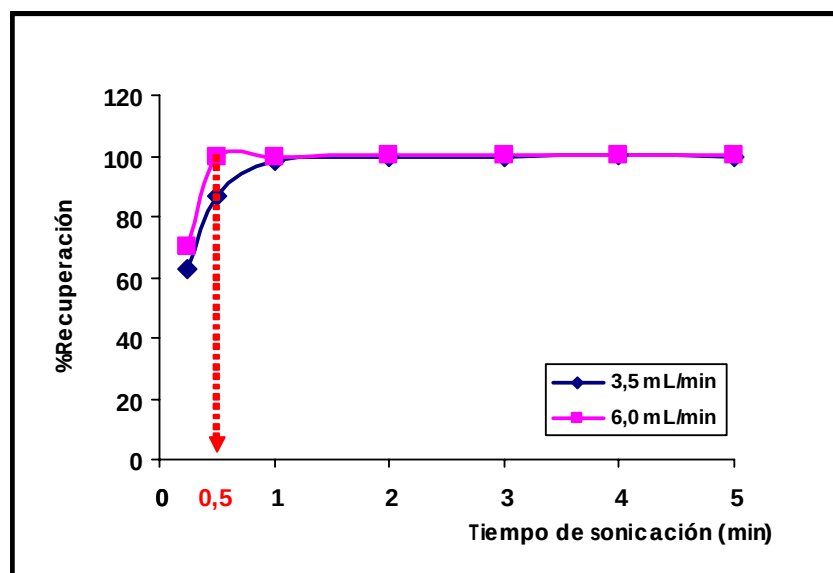


Figura 76. Experimentos realizados para la optimización del tiempo de sonicación a un caudal de extracción de 3,5 mL/min y 6,0 mL/min. $[\text{HNO}_3]=0\text{M}$; $[\text{HCl}]=0\text{M}$; Temperatura de extracción= 20°C ; Volumen de disolución extractante=1mL; $[\text{La}]=5\%$

A pesar de que la concentración de lantano es la variable significativa del proceso y tiene un efecto estimado positivo, se ha estudiado la posibilidad de disminuir la concentración de este reactivo, y se ha observado que, como en todos los casos anteriores, una disolución de La 2% es suficiente para eliminar las interferencias químicas (Tabla 186).

Tabla 186. Experimentos realizados para la optimización de la concentración de lantano

[La] (%) ^a	[Mg] µg/g ^b	(%)Recuperación
5	1267 ± 5	100,3
4	1264 ± 9	100,0
3	1261 ± 5	99,8
2	1267 ± 5	100,3
1	1103 ± 5	87,4

a. [HNO₃]=0M; [HCl]=0M; Tiempo de sonicación= 0,5 min; Temperatura de disolución= 20°C; Caudal de disolución=6,0 mL/min; Volumen de disolución=1mL

b. [Mg] = * Media ± desviación estándar (n=3)

Los valores óptimos para cada variable implicada en la disolución de las muestras de leche y fórmulas infantiles para la determinación de magnesio se indican en la Tabla 187.

Tabla 187. Valores óptimos para cada una de las variables implicadas en el proceso de disolución de las muestras de leche y fórmulas infantiles para la determinación de magnesio

VARIABLE	VALORES ÓPTIMOS PARA CADA UNA DE LAS VARIABLES
[HNO ₃]	0M
[HCl]	0M
Tiempo de sonicación	0,5 min
Temperatura de disolución	20°C
Caudal de disolución	6,0 mL/min
Volumen de disolución	1 mL
La	2%

En la Tabla 188 se muestra un resumen de los valores óptimos para cada una de las variables implicadas en el proceso de disolución de calcio, cinc, cobre, hierro y magnesio en las muestras de leche en polvo y fórmulas infantiles.

Tabla 188. Valores óptimos para cada una de las variables implicadas en el proceso de disolución de las muestras de leche en polvo y fórmulas infantiles para la determinación de los diferentes metales

Variables	VALORES ÓPTIMOS PARA CADA UNA DE LAS VARIABLES IMPLICADAS EN LA DISOLUCIÓN DE LAS MUESTRAS DE LECHE EN POLVO Y FÓRMULAS INFANTILES				
	Ca	Zn	Cu	Fe	Mg
A (M)	0	0	0	0	0
B (M)	0	0	0	0	0
C (min)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
D (°C)	20	20	20	20	20
E (mL/min)	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
F (mL)	1	1	1	1	1
G (%)	2	-	-	-	2

A, [HNO₃]; B, [HCl]; C, Tiempo sonicación; D, Temperatura de disolución; E, Caudal de disolución; F, Volumen de disolución; G, [La].

En los resultados obtenidos se observa que el proceso óptimo de formación de la suspensión acuosa de las muestras de leche en polvo y fórmulas infantiles es idéntico en todos los estudios efectuados en la determinación de cada metal. Así, el proceso óptimo es la formación de una suspensión homogénea utilizando agua ultrapura en donde se determinan los metales (en ningún caso ha sido necesaria la presencia de ácidos para obtener %recuperación cuantitativos). El tiempo de sonicación necesario para la formación de dicha suspensión es de 0,5 min a un caudal de 6mL/min. La temperatura y el volumen de disolución son 20°C y 1 mL, respectivamente. En los casos del calcio y el magnesio, la concentración de La necesaria en ambos casos para eliminar las interferencias químicas de estos metales en la celda de atomización es de 2%.

4.2.1.1 Estudio de la cantidad de muestra

En los estudios realizados previamente en este tipo de muestras se han utilizado las cantidades de muestra indicadas en la Tabla 177. Se ha considerado el estudio de mayores cantidades de muestra para así poder mejorar la sensibilidad de los resultados y poder aplicar el método propuesto a muestras donde la concentración de los metales estudiados sea menor.

En los casos del **calcio** y el **magnesio** se han utilizado 0,0050g de muestra y se ha aplicado una dilución 1:25, debido a las elevadas concentraciones de estos metales en este tipo de muestras. Un aumento de la cantidad de muestra implicaría el tener que aplicar una dilución mayor para que las señales de estos metales estén dentro del intervalo lineal de detección, sobre todo en el caso del magnesio donde este intervalo es especialmente pequeño (0-0,5 $\mu\text{g/mL}$). En esta situación, los resultados no implicarían una mejora en la sensibilidad, que es lo que se pretende al analizar mayores cantidades de muestra, ya que la muestra tendría que ser diluída en una mayor proporción y el resultado obtenido sería idéntico al que se obtendría si se utilizase menor cantidad de muestra. Analizar menores cantidades de muestra, tampoco implicaría una mejora en el proceso, pues se cometería mayor error en la pesada y la sensibilidad de los resultados obtenidos sería menor.

En las determinaciones de **cinc**, **cobre** e **hierro** en este tipo de muestras las cantidades de las mimas utilizadas fueron 0,0100g para el Zn y 0,0300g en los otros dos casos (Tabla 177). El cinc es un metal cuya determinación por espectrofotometría por absorción atómica con llama es muy sensible, y de hecho, su determinación con este tipo de técnica sólo es lineal hasta 1 $\mu\text{g/mL}$. Por ello, debido a esta sensibilidad y a las concentraciones presentes en las muestras, no se pueden utilizar mayores cantidades de muestra que los 0,0100g propuestos en la optimización, sin añadir un canal de dilución al dispositivo FIA. En los casos del cobre y el hierro, no se han podido estudiar mayores cantidades de muestra, ya que cantidades de muestra mayores que 0,0300g provocan presiones elevadas en el sistema FIA que hacen inviables los análisis. Estudiar menores cantidades de muestra no implicaría ninguna mejora en la determinación, porque se obtendrían resultados de menor sensibilidad analítica, y en los casos del cobre y del hierro cuyas concentraciones en la muestra son menores, implicaría tener que hacer uso de un método de preconcentración de la suspensión de la muestra o realizar adiciones del metal objeto de estudio (caso que ya se da para el cobre utilizando 0,0300 g de muestra).

4.2.1.2 Estudio de la influencia del tamaño de partícula de la muestra

En las muestras de leche en polvo y fórmulas infantiles ha sido imposible realizar este estudio debido a que este tipo de muestras tiene un diámetro de partícula estándar.

4.3 Optimización de los parámetros FIA de los sistemas de extracción/disolución (CUES/CUDS)

Las variables que afectan sólo al sistema FIA se han optimizado de modo univariante. Para ello se han utilizado las mismas muestras y la misma cantidad de las mismas que se usaron en la optimización de los procesos continuos de extracción/disolución. Así se optimizaron:

- La longitud del reactor de mezcla
- El volumen del bucle de inyección
- Los caudales del portador, del canal de dilución y de aspiración del nebulizador del espectrofotómetro de absorción atómica con llama

La optimización del canal de dilución sólo se realizó para los metales calcio y magnesio, ya que es en estos dos casos donde se realiza este proceso.

4.3.1 Optimización de los parámetros FIA del CUES

Longitud del reactor de mezcla

El reactor de mezcla del sistema FIA propuesto tiene como función homogeneizar el extracto de la muestra. Se ha demostrado que para conseguir la homogeneización completa del extracto ácido, este reactor como mínimo, ha de tener una longitud tal que contenga el volumen de la disolución extractante utilizada. Por otra parte, no interesa que este reactor tenga una longitud mayor, ya que esto prolongaría el tiempo de análisis y disminuiría la frecuencia de muestreo. Así, debido a que todas las extracciones propuestas, excepto en el caso de la extracción de magnesio en las muestras de moluscos y pescados, el volumen óptimo de disolución extractante es de 1 mL, se ha considerado como valor óptimo para la longitud del reactor de mezcla 199 cm (tubos de 0,8 mm de diámetro interno), longitud correspondiente a un volumen del reactor de 1,0 mL. En el caso de la

extracción de magnesio en muestras de moluscos y pescados la longitud óptima considerada para este reactor fue de 398 cm, ya que el volumen óptimo de disolución extractante es de 2 mL.

En las extracciones del calcio y magnesio se introduce un segundo reactor en el sistema FIA para homogeneizar el extracto después de la dilución con la disolución de lantano. La longitud considerada como óptima para este segundo reactor de mezcla fue de 25 cm (0,13mL), ya que con esta longitud se garantiza una completa homogeneización del extracto diluido con la disolución de La.

Volumen del bucle de inyección

El volumen del bucle de la válvula de inyección que se ha considerado como óptimo es 250 μL para todas las determinaciones objeto de estudio. No se consideraron volúmenes menores porque se disminuiría la sensibilidad en el análisis, porque la dispersión sería mayor (menor pendiente en la recta de calibrado). Tampoco se planteó aumentar el volumen del bucle debido a que es interesante poder realizar al menos dos réplicas del análisis para cada una de las muestras y comprobar la homogeneidad del extracto ácido.

Caudales del portador, del canal de dilución y de aspiración del nebulizador del espectrofotómetro de absorción atómica con llama

En la optimización de estos caudales hay dos situaciones diferentes:

- Los metales en los que no se requiere la dilución del extracto: cinc, cobre, hierro y manganeso
- Los metales que requieren la dilución del extracto: calcio y magnesio

En el caso de los metales que no requieren la dilución en su determinación, los caudales se han optimizado con el objetivo de buscar una combinación de ambos que proporcione la menor dispersión posible del extracto. Para ello se ha realizado diferentes experimentos a diferentes caudales y se ha observado que la menor dispersión ($D=1,1$) se obtiene a un caudal de portador de 3,5

mL/min y aspiración del nebulizador de 4 mL/min, siendo por tanto éstos los valores óptimos para estas variables.

Para el calcio y el magnesio, la optimización de los caudales se realizó en función de lograr una combinación de los mismos que proporcione señales de absorbancia que estén dentro del intervalo lineal de determinación del metal por FAAS. Para ello hay que tener en cuenta que la detección de estos metales por FAAS es lineal en los intervalos de 0-5 µg/mL para el calcio y de 0-0,5 µg/mL para el magnesio. Así, en función de las concentraciones de estos metales en los diferentes tipos de muestras, se han establecido diferentes óptimos (Tablas 189 y 190).

Tabla 189. Óptimos establecidos para los caudales de portador, de la dilución y aspiración del nebulizador del espectrofotómetro de absorción atómica con llama para la determinación de calcio en función del tipo de muestra a analizar

Muestras	Caudal del portador (mL/min)	Caudal de la dilución (mL/min)	Caudal del nebulizador (mL/min)	Dilución aplicada
Moluscos y pescados	0,5	5,0	5,5	1:10
Carnes	1,3	5,0	6,3	1:4
Cereales y derivados	1,3	5,0	6,3	1:4
Frutos secos	1,3	5,0	6,3	1:4
Legumbres	1,3	5,0	6,3	1:4
Verduras, hortalizas y frutas	0,3	5,0	5,3	1:25

Tabla 190. Óptimos establecidos para los caudales de portador, de la dilución y aspiración del nebulizador del espectrofotómetro de absorción atómica con llama para la determinación de magnesio en función del tipo de muestra a analizar

Muestras	Caudal del portador (mL/min)	Caudal de la dilución (mL/min)	Caudal del nebulizador (mL/min)	Dilución aplicada
Moluscos y pescados	0,3	5,0	5,3	1:25
Carnes	0,5	5,0	5,5	1:10
Cereales y derivados	0,5	5,0	5,5	1:10
Frutos secos	0,3	5,0	5,3	1:25
Legumbres	0,3	4,5	4,8	1:15
Verduras, hortalizas y frutas	0,3	5,0	5,3	1:25

4.3.2 Optimización de los parámetros FIA del CUDS

Longitud del reactor de mezcla

Los criterios utilizados para la optimización de la longitud del reactor de mezcla en el CUDS son los mismos que los aplicados en el CUES. Así, como se ha indicado previamente, la longitud considerada como óptima para este reactor es aquella que contenga el volumen de la suspensión de la muestra de leche en polvo o de la fórmula infantil. Debido a que el volumen de disolución utilizada en todos los casos para realizar la disolución de la muestra es de 1 mL, se ha considerado como valor óptimo para la longitud del reactor de mezcla 199 cm (tubos de 0,8 mm de diámetro interno), longitud correspondiente a un volumen del reactor de 1,0 mL.

En los casos del calcio y magnesio se introduce un segundo reactor en el sistema FIA para homogeneizar el la suspensión de la muestra después de la dilución con la disolución de lantano. La longitud considerada como óptima para este segundo reactor de mezcla fue de 25 cm (0,13mL), ya que con esta longitud se garantiza una completa homogeneización de dicha suspensión con la disolución de La.

Volumen del bucle de inyección

El volumen del bucle de la válvula de inyección que se ha considerado como óptimo es 250 μL para todas las determinaciones objeto de estudio. Este volumen óptimo se ha establecido siguiendo los criterios descritos en la optimización de esta variable FIA en el CUES.

Caudales del portador, del canal de dilución y de aspiración del nebulizador del espectrofotómetro de absorción atómica con llama

En la optimización de estos caudales hay dos situaciones diferentes:

- Los metales en los que no se requiere la dilución de la suspensión de la muestra de leche en polvo o de la fórmula infantil: cinc, cobre y hierro
- Los metales que requieren la dilución la suspensión de la muestra de leche en polvo o de la fórmula infantil: calcio y magnesio

En el caso de los metales que no requieren la dilución en su determinación, los caudales se han optimizado con el objetivo de buscar una combinación de ambos que proporcione la menor dispersión posible del extracto. Como ya se ha descrito en la optimización de los caudales en el CUES, se ha observado que la menor dispersión ($D=1,1$) se obtiene a un caudal de portador de 3,5 mL/min y de aspiración del nebulizador de 4 mL/min, siendo por tanto éstos los valores óptimos para estas variables.

En el caso del calcio y el magnesio, la optimización de los caudales se ha realizado en función de encontrar una combinación de los mismos que proporcione señales de absorbancia que estén dentro del intervalo lineal de determinación del metal por FAAS. Para ello se han tenido en cuenta los intervalos lineales de detección de los metales y las concentraciones de los mismos en las muestras de leche en polvo y fórmulas infantiles (Tabla 191).

Tabla 191. Óptimos establecidos para los caudales de portador, de la dilución y aspiración del nebulizador del espectrofotómetro de absorción atómica con llama para la determinación de calcio en función del tipo de muestra a analizar

Metal	Caudal del portador (mL/min)	Caudal de la dilución (mL/min)	Caudal del nebulizador (mL/min)	Dilución aplicada
Ca	0,3	5,0	5,3	1:25
Mg	0,3	5,0	5,3	1:25

5. CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DE LAS METODOLOGÍAS PROPUESTAS PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS METALES DE LAS MUESTRAS SÓLIDAS DE NATURALEZA ALIMENTICIA

Previamente se han calculado las características analíticas relativas al calibrado. Una vez realizadas las optimizaciones de todas las variables involucradas en todos los procesos de extracción ácida de los metales de las muestras sólidas de naturaleza alimenticia y disolución de la muestras de leche en polvo y fórmulas infantiles, se han calculado de nuevo estas características analíticas teniendo en cuenta las cantidades de muestra utilizadas y los volúmenes de disolución extractante y disolvente empleados en estos procesos, así como las diluciones realizadas en los casos en los que éstas se han llevado a cabo.

Además, se han realizado en cada caso, los estudios de precisión y exactitud del método propuesto, así como el cálculo de las frecuencias de muestreo obtenidas al aplicar estos sistemas continuos de extracción/disolución.

5.1 Características analíticas de las metodologías propuestas que utilizan el CUES

5.1.1 Determinación de calcio en las diferentes muestras sólidas de naturaleza alimenticia

Se han calculado los límites de detección, cuantificación, sensibilidad para el 1% de absorción y el intervalo lineal teniendo en cuenta la cantidad de muestra utilizada, el volumen de disolución extractante y la dilución realizada con la disolución de La al 2% en las metodologías propuestas para la

determinación de calcio en las muestras sólidas de naturaleza alimenticia objeto de estudio. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 192.

Tabla 192. Características analíticas de las metodologías propuestas para la determinación de calcio de cada tipo de muestra

Tipo de muestra	Cantidad de muestra (g)	LOD ($\mu\text{g/g}$)	LOQ ($\mu\text{g/g}$)	Sensibilidad para un 1% de absorción ($\mu\text{g/g}$)	Intervalo lineal ($\mu\text{g/g}$)
Moluscos y pescados	0,0100	30,0	120,0	120,0	120,0 - 5500,0
	0,0150	10,0	80,0	80,0	80 - 3666,7
Carnes	0,0100	12,0	48,0	48,0	48,0 - 2200,0
Cereales y derivados	0,0100	12,0	48,0	48,0	48,0 - 2200,0
	0,0200	6,0	24,0	24,0	24,0 - 1100,0
	0,0300	4,0	16,0	16,0	16,0 - 733,3
Frutos secos	0,0100	12,0	48,0	48,0	48,0 - 2200,0
	0,0200	6,0	24,0	24,0	24,0 - 1100,0
Legumbres	0,0100	12,0	48,0	48,0	48,0 - 2200,0
	0,0200	6,0	24,0	24,0	24,0 - 1100,0
Verduras, hortalizas y frutas	0,0100	75,0	300,0	300,0	300,0 - 13750,0

5.1.1.1 Precisión

Previamente se ha calculado la precisión del calibrado. Una vez optimizado el proceso, se ha estudiado también la precisión del proceso global. Para ello, se han realizado para cada tipo de muestra 11 análisis de la misma cantidad y tipo de muestra (las muestras utilizadas en este estudio son las mismas que las utilizadas en la optimización del proceso excepto en el caso de las verduras, hortalizas y frutas que se ha utilizado la muestra de lechuga en lugar del material de referencia de té). De los resultados obtenidos se calculó, al igual que en el estudio de la precisión de los calibrados, la desviación estándar, la desviación estándar media, el coeficiente de variación y el intervalo de confianza obtenido (Tabla 193).

Tabla 193. Estudio de la precisión de las metodologías propuestas para la determinación de calcio de los diferentes tipos de muestras

Tipo de muestra	Cantidad de muestra (g)	[Ca] $\pm \sigma^a$	[Ca] _{media} $\pm \sigma_m t$ ($\mu\text{g/g}$)	Coefficiente de variación (%)
Moluscos y pescados	0,0100	3414,3 $\pm$ 39,0	3425,6 $\pm$ 10,0	0,4
	0,0150		3424,8 $\pm$ 6,7	0,3
Carnes	0,0100	1121,0 $\pm$ 13,8	1126,3 $\pm$ 4,2	0,6
Cereales y derivados	0,0100	479,7 $\pm$ 6,9	477,6 $\pm$ 3,7	1,2
	0,0200		479,8 $\pm$ 1,9	0,6
	0,0300		479,6 $\pm$ 1,12	0,4
Frutos secos	0,0100	831,4 $\pm$ 20,6	830,3 $\pm$ 3,8	0,7
	0,0200		830,3 $\pm$ 2,0	0,4
Legumbres	0,0100	858,4 $\pm$ 20,6	861,3 $\pm$ 7,3	1,3
	0,0200		859,2 $\pm$ 6,1	0,3
Verduras, hortalizas y frutas	0,0100	9130,7 $\pm$ 103,1	9168,0 $\pm$ 49,1	0,5

a. [Ca] certificada en los casos que la muestra es un material de referencia o determinada mediante el método de referencia (pág. 86)

- t, valor del Test t-Student para 11 muestras=2,23

5.1.1.2 Exactitud

La evaluación de la exactitud de las metodologías propuestas se llevó a cabo realizando dos tipos de estudios:

- Recuperación de las metodologías propuestas
- Análisis de materiales de referencia

5.1.1.2.1 Recuperación de las metodologías propuestas

Para realizar este estudio se analizó una muestra de cada tipo de matriz (las muestras y las cantidades de las mismas son las utilizadas en la optimización, excepto en el caso de las verduras, hortalizas y frutas donde se han analizado 0,0100g de una muestra de lechuga). Estos análisis se realizaron por quintuplicado y se desarrollaron en las condiciones óptimas y utilizando una disolución extractante que contenía diferentes concentraciones de calcio en

cada caso. Una vez obtenidos los datos experimentales, se ha calculado el %recuperación del siguiente modo:

$$\% \text{Recuperación} = \frac{A-B}{C} \times 100$$

siendo:

- A: concentración de calcio de la muestra + concentración de calcio añadida (valor experimental)
- B: concentración de calcio de la muestra (valor experimental)
- C: concentración de calcio añadida

Los datos obtenidos para cada una de las muestras y los %recuperación obtenidos se reflejan en la Tabla 194. Los %recuperación son cuantitativos en todos los casos.

Se realizó el ajuste de las rectas de adición por mínimos cuadrados y se observó que las pendientes son idénticas en todos los casos. Además, las rectas de calibrado y de adición son totalmente paralelas para todos los tipos de muestras, como se puede ver para el caso de las muestras de moluscos y pescado en la Figura 77. El paralelismo de estas rectas se comprobó estadísticamente mediante el programa ULC (Univariate Linear Calibration) [167]. Este paralelismo indica que no hay efecto matriz en las determinaciones de calcio realizadas.

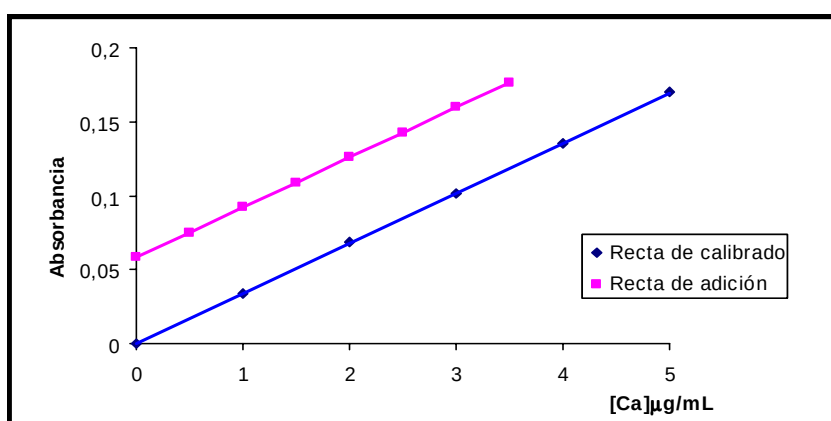


Figura 77. Recta de calibrado del calcio y de adición de este metal sobre las muestras de moluscos y pescados

Tabla 194. Estudio de la recuperación de las metodologías propuestas para la determinación de calcio de los diferentes tipos de muestras de naturaleza alimenticia

Tipo de muestras	Adición	Absorbancia	%Recuperación ^a	Recta de adición		
				Ordenada	Pendiente	Coefficiente de regresión
Moluscos y pescados	0	0,058	100,1 ± 0,8	5,81x10 ⁻²	0,034	0,999
	0,5	0,075	100,2 ± 0,6			
	1,0	0,092	99,5 ± 0,6			
	1,5	0,109	99,7 ± 0,5			
	2,0	0,126	99,9 ± 0,4			
	2,5	0,143	99,8 ± 0,4			
	3	0,160	100,0 ± 0,3			
	3,5	0,176	99,9 ± 0,3			
Carnes	0	0,096	100,9 ± 0,5	9,60x10 ⁻²	0,033	0,999
	0,5	0,113	100,8 ± 0,5			
	1	0,129	99,9 ± 0,4			
	1,5	0,146	99,2 ± 0,6			
	2	0,163	100,0 ± 0,5			
Cereales y derivados	0	0,041	99,2 ± 0,8	2,86x10 ⁻⁴	0,034	0,999
	1,0	0,075	99,5 ± 0,8			
	2,0	0,109	99,8 ± 0,6			
	3,0	0,142	99,3 ± 0,4			
	3,5	0,159	99,2 ± 0,3			
Frutos Secos	0	0,071	100,0 ± 0,4	7,08x10 ⁻²	0,034	0,999
	0,5	0,087	99,8 ± 0,4			
	1	0,105	100,2 ± 0,3			
	1,5	0,122	100,0 ± 0,4			
	2	0,139	100,0 ± 0,3			
	2,5	0,155	99,6 ± 0,3			
Legumbres	0	0,073	100,1 ± 0,6	7,36x10 ⁻²	0,034	0,999
	0,5	0,091	100,5 ± 0,6			
	1	0,107	100,0 ± 0,4			
	1,5	0,124	100,2 ± 0,3			
	2	0,141	100,0 ± 0,3			
	2,5	0,157	99,5 ± 0,3			
Verduras, hortalizas y frutas	0	0,119	99,9 ± 0,4	11,9x10 ⁻²	0,034	0,999
	0,25	0,128	99,6 ± 0,4			
	0,5	0,136	100,4 ± 0,4			
	0,75	0,145	100,4 ± 0,3			
	1,0	0,153	100,1 ± 0,3			
	1,25	0,161	99,7 ± 0,2			

a. La recuperación indicada es la media ± desviación estándar de las cinco determinaciones realizadas en cada caso

5.1.1.2.2 Análisis de materiales de referencia

Para calcular la exactitud del método propuesto, además de realizar el estudio de la recuperación, se han utilizado materiales de referencia para los tipos de matrices en los que existía certificada la concentración de calcio. En este caso sólo se certifica la concentración de este metal para el material de referencia utilizado para las muestras de verduras, hortalizas y frutas. Para llevar a cabo este estudio se han realizado por triplicado los análisis con el método propuesto en las condiciones óptimas. Como se observa en la Tabla 195, los valores obtenidos con el método propuesto se encuentran dentro del intervalo de concentración de calcio certificado. Por lo que se puede decir que las metodologías propuestas son exactas.

Tabla 195. Estudio de la exactitud utilizando materiales de referencia

Tipo de muestra	Material de referencia	[Ca]certificada ($\mu\text{g/g}$)	Cantidad de muestra analizada (g)	[Ca]obtenida ($\mu\text{g/g}$)
Verduras, hortalizas y frutas	Té NCS DC 73351 ^a	4300 $\pm$ 200	0,0100	4345 $\pm$ 41

a. NCS: China National Analysis Center for Iron and Steel

5.1.1.3 Frecuencia de muestreo

Se calculó la frecuencia de muestreo del método propuesto para cada tipo de muestra, considerando el proceso global, desde la extracción a la detección del calcio (Tabla 196). Los resultados indican que las frecuencias de muestreo obtenidas son bastante elevadas, ya que se pueden realizar desde 17 a 55 análisis a la hora.

Tabla 196. Frecuencia de muestreo para cada tipo de muestra estudiada utilizando las metodologías propuestas

Tipo de muestra	Cantidad de muestra (g)	Tiempo de sonicación (min)	Frecuencia de muestreo (muestras/h)
Moluscos y pescados	0,0100	0,5	54
	0,0150		
Carnes	0,0100	0,5	55
Cereales y derivados	0,0100	1	38
	0,0200	2	23
	0,0300	3	17
Frutos secos	0,0100	1	38
	0,0200	3	17
Legumbres	0,0100	1	38
	0,0200	2	23
Verduras, hortalizas y frutas	0,0100	0,5	54

5.1.2 Determinación de cinc en las diferentes muestras sólidas de naturaleza alimenticia

Se han calculado los límites de detección, cuantificación, sensibilidad para el 1% de absorción y el intervalo lineal teniendo en cuenta la cantidad de muestra utilizada y el volumen de disolución extractante indicados en las metodologías propuestas para la determinación de cinc de las muestras sólidas de naturaleza alimenticia objeto de estudio. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 197.

Tabla 197. Características analíticas de las metodologías propuestas para la determinación de cinc de cada tipo de muestra

Tipo de muestra	Cantidad de muestra (g)	LOD ($\mu\text{g/g}$)	LOQ ($\mu\text{g/g}$)	Sensibilidad para un 1% de absorción ($\mu\text{g/g}$)	Intervalo lineal ($\mu\text{g/g}$)
Moluscos y pescados	0,0050	0,8	4,0	4,0	4,0 – 220,0
Carnes	0,0050	0,8	4,0	4,0	4,0 – 220,0
Cereales y derivados	0,0100	0,4	2,0	2,0	2,0 – 110,0
	0,0200	0,2	1,0	1,0	1,0 – 55,0
	0,0300	0,1	0,7	0,7	0,7 – 36,7
Frutos secos	0,0100	0,4	2,0	2,0	2,0 – 110,0
	0,0200	0,2	1,0	1,0	1,0 – 55,0
	0,0300	0,1	0,7	0,7	0,7 – 36,7
Legumbres	0,0100	0,4	2,0	2,0	2,0 – 110,0
	0,0200	0,2	1,0	1,0	1,0 – 55,0
Verduras, hortalizas y frutas	0,0100	0,4	2,0	2,0	2,0 – 110,0

5.1.2.1 Precisión

Previamente se ha calculado la precisión del calibrado. Una vez optimizado el proceso, se ha estudiado también la precisión del proceso global. Para ello, se han realizado para cada tipo de muestra 11 análisis de la misma cantidad y tipo de muestra. Las muestras utilizadas en este estudio son las mismas que las utilizadas en los estudios previos (Tabla 58), excepto en el caso de los frutos secos donde se ha analizado una muestra de castañas, utilizada previamente en el estudio de la cantidad de muestra, para poder estudiar la precisión en función de la misma (si se utilizase la muestra de avellanas utilizada en la optimización sólo se podría estudiar la precisión para 0,0100 g de muestra, debido a la elevada concentración de cinc presente en esta muestra). A partir de los resultados obtenidos se calculó, al igual que en el estudio de la precisión de los calibrados, la desviación estándar, la desviación estándar media, el coeficiente de variación y el intervalo de confianza obtenido (Tabla 198).

Tabla 198. Estudio de la precisión de las metodologías propuestas para la determinación de cinc de los diferentes tipos de muestras

Tipo de muestra	Cantidad de muestra (g)	[Zn] $\pm \sigma^a$	[Zn] _{media} $\pm \sigma_m t$ ($\mu\text{g/g}$)	Coefficiente de variación (%)
Moluscos y pescados	0,0050	188,9 $\pm$ 0,6	189,0 $\pm$ 0,3	0,2
Carnes	0,0050	163,6 $\pm$ 0,9	164,0 $\pm$ 0,3	0,2
Cereales y derivados	0,0100	19,9 $\pm$ 0,3	20,0 $\pm$ 0,2	1,1
	0,0200		20,0 $\pm$ 0,1	0,6
	0,0300		19,8 $\pm$ 0,1	0,5
Frutos secos	0,0100	22,4 $\pm$ 0,7	22,3 $\pm$ 0,2	1,0
	0,0200		22,4 $\pm$ 0,1	0,5
	0,0300		22,4 $\pm$ 0,1	0,3
Legumbres	0,0100	35,2 $\pm$ 0,9	35,2 $\pm$ 0,2	0,6
	0,0200		35,2 $\pm$ 0,1	0,3
Verduras, hortalizas y frutas	0,0100	21,4 $\pm$ 0,4	21,1 $\pm$ 0,2	1,1

a. [Zn] certificada en los casos que la muestra es un material de referencia o determinada mediante el método de referencia (pág. 86)

t, valor del Test t-Student para 11 muestras=2,23

5.1.2.2 Exactitud

La evaluación de la exactitud de las metodologías propuestas se llevó a cabo realizando dos tipos de estudios:

- Recuperación de las metodologías propuestas
- Análisis de materiales de referencia

5.1.2.2.1 Recuperación de las metodologías propuestas

En este estudio realizó el análisis de una muestra de cada tipo de matriz estudiada (las muestras y las cantidades de las mismas son las utilizadas en la optimización, excepto en el caso de los frutos secos donde se ha analizado 0,0100 g de una muestra de castañas). Estos análisis se realizaron por quintuplicado, y se desarrollaron en las condiciones óptimas y utilizando una disolución extractante que contenía diferentes concentraciones de cinc en

cada caso. Una vez obtenidos los datos experimentales, se ha calculado el %recuperación en cada caso (pág. 314).

Los datos obtenidos para cada una de las muestras y los %recuperación obtenidos se reflejan en la Tabla 199. Los %recuperación son cuantitativos en todos los casos.

Se realizó el ajuste de las rectas de adición por mínimos cuadrados y se observó que las pendientes son idénticas en todos los casos. Además, las rectas de calibrado y de adición son totalmente paralelas para todos los tipos de muestras, como se puede ver para el caso de las muestras de frutos secos en la Figura 78. El paralelismo de estas rectas se comprobó estadísticamente mediante el programa ULC (Univariate Linear Calibration) [167]. Este paralelismo indica que no hay efecto matriz en las determinaciones de cinc realizadas.

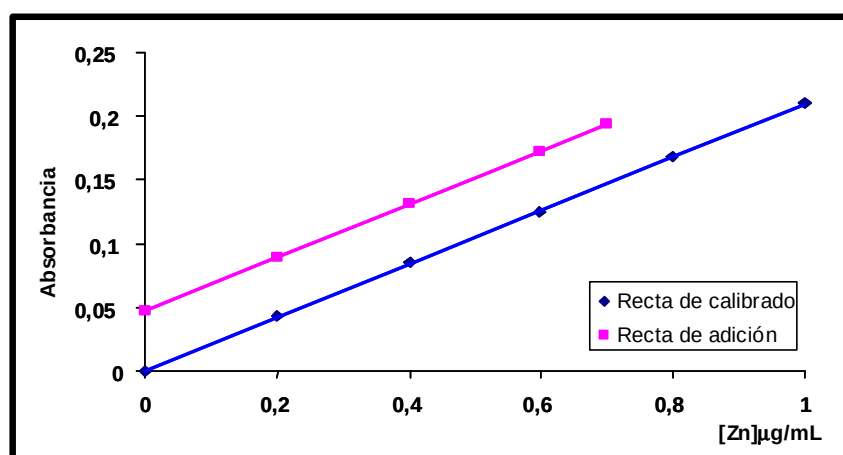


Figura 78. Recta de calibrado del cinc y de adición de este metal sobre las muestras de frutos secos

Tabla 199. Estudio de la recuperación de las metodologías propuestas para la determinación de cinc de los diferentes tipos de muestras alimenticias

Tipo de muestras	Adición	Absorbancia	Recuperación ^a	Recta de adición		
				Ordenada	Pendiente	Coefficiente de regresión
Moluscos y pescados	0	0,198	100,0 ± 0,4	1,98x10 ⁻¹	0,212	0,999
	0,025	0,203	100,1 ± 0,3			
	0,050	0,209	100,1 ± 0,2			
	0,075	0,214	99,9 ± 0,3			
	0,100	0,219	100,0 ± 0,2			
Carnes	0	0,172	100,3 ± 0,4	1,72x10 ⁻¹	0,208	0,999
	0,075	0,188	100,1 ± 0,3			
	0,1	0,193	100,0 ± 0,3			
	0,125	0,198	100,0 ± 0,3			
	0,15	0,203	100,2 ± 0,3			
Cereales y derivados	0	0,042	100,1 ± 0,5	4,22x10 ⁻⁴	0,208	0,999
	0,2	0,084	99,8 ± 0,4			
	0,4	0,126	99,8 ± 0,4			
	0,6	0,167	99,7 ± 0,3			
	0,8	0,209	99,9 ± 0,2			
Frutos Secos	0	0,047	100,0 ± 0,7	4,71x10 ⁻²	0,209	0,999
	0,2	0,089	99,9 ± 0,5			
	0,4	0,131	99,7 ± 0,5			
	0,6	0,172	99,3 ± 0,3			
	0,7	0,194	100,1 ± 0,4			
Legumbres	0	0,074	100,4 ± 0,5	7,40x10 ⁻²	0,209	0,999
	0,1	0,095	99,8 ± 0,4			
	0,3	0,136	99,6 ± 0,4			
	0,5	0,179	99,9 ± 0,3			
	0,6	0,199	99,9 ± 0,3			
Verduras, hortalizas y frutas	0	0,045	100,2 ± 0,4	4,56x10 ⁻²	0,209	0,999
	0,1	0,067	100,6 ± 0,3			
	0,3	0,108	99,5 ± 0,3			
	0,5	0,15	100,2 ± 0,3			
	0,7	0,192	100,0 ± 0,2			

a. La recuperación indicada es la media ± desviación estándar de las cinco determinaciones realizadas en cada caso

5.1.2.2.2 Análisis de materiales de referencia

Para calcular la exactitud del método propuesto, además de realizar el estudio de la recuperación, se han utilizado materiales de referencia para los tipos de matrices en los que existía certificada la concentración de cinc, que son todos los casos excepto para las muestras de frutos secos y legumbres.

Para llevar a cabo este estudio se han realizado por triplicado los análisis con el método propuesto en las condiciones óptimas. Como se observa en la Tabla 200, los valores obtenidos con el método propuesto se encuentran dentro del intervalo de concentración de cinc certificado. Por lo que se puede decir que las metodologías propuestas son exactas.

Tabla 200. Estudio de la exactitud utilizando materiales de referencia

Tipo de muestra	Material de referencia	[Zn]certificada (µg/g)	Cantidad de muestra analizada (g)	[Zn]obtenida (µg/g)
Moluscos y pescados	Hepatopancreas de langosta NRCC-Tort 1 ^a	177 ± 10	0,0050	177 ± 1
	Mejillón CRM 278R ^b	83,1 ± 1,7	0,0050	83,0 ± 0,6
Carnes	Riñón de cerdo BCR-186 ^c	128 ± 3	0,0050	128 ± 1
	Músculo de bovino BCR-184 ^c	166 ± 3	0,0050	166 ± 0,6
Cereales y derivados	Harina integral BCR-189 ^c	56,5 ± 1,7	0,0100	56,5 ± 0,3
Verduras, hortalizas y frutas	Té NCS DC 3351 ^d	26,3 ± 0,9	0,0100	26,4 ± 0,3

a. NRCC: Nacional Research Council of Canada

b. CRM: Certified Reference Material, from Community Bureau of Reference

c. BCR: Community Bureau of Reference

d. NCS: China National Analysis Center for Iron and Steel

5.1.2.3 Frecuencia de muestreo

Se calculó la frecuencia de muestreo de las metodologías propuestas para cada tipo de muestra, considerando el proceso global, desde la extracción a la detección del cinc. Debido a que el tiempo de extracción óptimo y a que el sistema es el mismo en todos los casos, la frecuencia de muestreo es de 70 muestras/hora, excepto en los análisis en los que se utilizan 0,0200 g y 0,0300 g de muestras (frutos secos). En estos dos casos el tiempo de extracción óptimo aumenta, y las frecuencias de muestreo obtenidas son de 32 y 44 muestras/hora, respectivamente.

5.1.3 Determinación de cobre en las diferentes muestras sólidas de naturaleza alimenticia

Se han calculado los límites de detección, cuantificación, sensibilidad para el 1% de absorción y el intervalo lineal teniendo en cuenta la cantidad de muestra utilizada y el volumen de disolución extractante indicados en las metodologías propuestas para la determinación de cobre de las muestras sólidas de naturaleza alimenticia objeto de estudio. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 201.

Tabla 201. Características analíticas de las metodologías propuestas para la determinación de cobre de cada tipo de muestra

Tipo de muestra	Cantidad de muestra (g)	LOD (µg/g)	LOQ (µg/g)	Sensibilidad para un 1% de absorción (µg/g)	Intervalo lineal (µg/g)
Moluscos y pescados	0,0100	1,0	8,0	8,0	8,0 – 540,0
	0,0200	0,5	4,0	4,0	4,0 – 27,0
	0,0300	0,3	2,7	2,7	2,7 – 180,0
Carnes	0,0300	0,3	2,7	2,7	2,7 – 180,0
Cereales y derivados	0,0300	0,3	2,7	2,7	2,7 – 180,0
Frutos secos	0,0300	0,3	2,7	2,7	2,7 – 180,0
Legumbres	0,0300	0,3	2,7	2,7	2,7 – 180,0
Verduras, hortalizas y frutas	0,0300	0,3	2,7	2,7	2,7 – 180,0

5.1.3.1 Precisión

Se ha estudiado la precisión del proceso global. Para ello, se han realizado para cada tipo de muestra 11 análisis de la misma cantidad y tipo de muestra. Las muestras utilizadas en este estudio son las mismas que las utilizadas en los estudios previos (Tabla 103, pág.193). De los resultados obtenidos se calculó, al igual que en el estudio de la precisión de los calibrados, la desviación estándar, la desviación estándar media, el coeficiente de variación y el intervalo de confianza obtenido (Tabla 202).

Tabla 202. Estudio de la precisión de las metodologías propuestas para la determinación de cobre de los diferentes tipos de muestras

Tipo de muestra	Cantidad de muestra (g)	[Cu] $\pm \sigma^a$	[Cu] _{media} $\pm \sigma_m t$ ($\mu\text{g/g}$)	Coefficiente de variación (%)
Moluscos y pescados	0,0100		14,1 $\pm$ 0,6	6,2
	0,0200	13,6 $\pm$ 0,7	13,5 $\pm$ 0,3	3,2
	0,0300		13,2 $\pm$ 0,2	2,4
Carnes	0,0300	14,5 $\pm$ 0,4	14,8 $\pm$ 0,2	2,0
Cereales y derivados	0,0300	11,6 $\pm$ 1,0	11,6 $\pm$ 0,2	2,9
Frutos secos	0,0300	22,2 $\pm$ 0,7	22,1 $\pm$ 0,2	1,5
Legumbres	0,0300	11,4 $\pm$ 1,0	11,6 $\pm$ 0,2	2,9
Verduras, hortalizas y frutas	0,0300	10,9 $\pm$ 0,7	11,3 $\pm$ 0,2	3,0

a. [Cu] certificada en los casos que la muestra es un material de referencia o determinada mediante el método de referencia (pág. 86)

t, valor del Test t-Student para 11 muestras=2,23

En las muestras de moluscos y pescados se observa que cuando se analizan 0,0100 g, debido a la baja concentración de cobre presente, los resultados obtenidos en el análisis son poco sensibles y ello se refleja en el coeficiente de variación que es superior al 5%. Por ello, teniendo en cuenta los resultados obtenidos, cuando se trata de analizar una muestra de este tipo que tiene una baja concentración de cobre, es conveniente utilizar una mayor cantidad de muestra, ya que se obtienen mejores resultados.

5.1.3.2 Exactitud

La evaluación de la exactitud de las metodologías propuestas se llevó a cabo realizando dos tipos de estudios:

- Recuperación de las metodologías propuestas
- Análisis de materiales de referencia

5.1.3.2.1 Recuperación de las metodologías propuestas

En este estudio se realizó el análisis de una muestra de cada tipo de matriz estudiada (las muestras son las mismas que las utilizadas en los estudios previos (Tabla 103, pág.193), y las cantidades de las mismas son 0,0300 g en todos los casos). Estos análisis se realizaron por quintuplicado, y se desarrollaron en las condiciones óptimas y utilizando una disolución extractante que contenía diferentes concentraciones de cobre en cada caso. Una vez obtenidos los datos experimentales, se ha calculado el %recuperación en cada caso (pág. 314). Los datos obtenidos para cada una de las muestras y los %recuperación obtenidos se reflejan en la Tabla 203. Los %recuperación son cuantitativos en todos los casos.

Se realizó el ajuste de las rectas de adición por mínimos cuadrados y se observó que las pendientes son idénticas en todos los casos. Además, las rectas de calibrado y de adición son totalmente paralelas para todos los tipos de muestras, como se puede ver para el caso de las muestras de moluscos y pescados en la Figura 79. El paralelismo de estas rectas se comprobó estadísticamente mediante el programa ULC (Univariate Linear Calibration) [167]. Este paralelismo indica que no hay efecto matriz en las determinaciones de cobre realizadas.

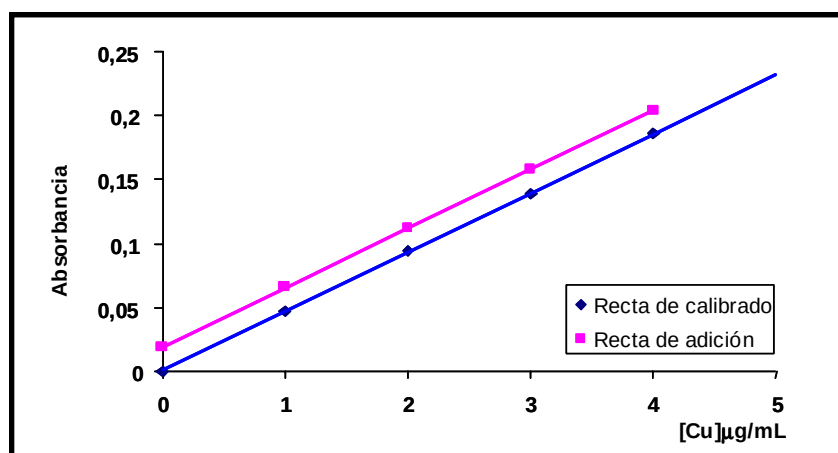


Figura 79. Recta de calibrado del cobre y de adición de este metal sobre las muestras de moluscos y pescados

Tabla 203. Estudio de la recuperación de las metodologías propuestas para la determinación de cobre de los diferentes tipos de muestras alimenticias

Tipo de muestras	Adición	Absorbancia	Recuperación ^a	Recta de adición		
				Ordenada	Pendiente	Coefficiente de regresión
Moluscos y pescados	0	0,019	99,5 ± 3,1	1,94x10 ⁻²	0,046	0,999
	1	0,066	100,2 ± 0,9			
	2	0,112	99,7 ± 0,5			
	3	0,158	99,7 ± 0,4			
	4	0,204	100,0 ± 0,3			
Carnes	0	0,021	99,4 ± 2,7	2,08x10 ⁻²	0,046	0,999
	1	0,067	99,8 ± 1,3			
	2	0,113	100,2 ± 0,7			
	3	0,159	100,0 ± 0,6			
	4	0,206	100,1 ± 0,5			
Cereales y derivados	0	0,017	102,9 ± 3,4	1,70x10 ⁻²	0,046	0,999
	1	0,063	100,4 ± 0,7			
	2	0,109	100,2 ± 0,5			
	3	0,155	100,0 ± 0,4			
	4	0,201	99,9 ± 0,3			
Frutos Secos	0	0,031	99,2 ± 1,8	3,12x10 ⁻²	0,046	0,999
	1	0,078	100,7 ± 0,6			
	2	0,123	99,6 ± 0,4			
	3	0,170	100,2 ± 0,3			
	4	0,216	100,0 ± 0,2			
Legumbres	0	0,016	99,7 ± 3,5	1,64x10 ⁻²	0,046	0,999
	1	0,063	100,9 ± 0,7			
	2	0,109	99,8 ± 0,5			
	3	0,155	99,7 ± 0,4			
	4	0,201	100,0 ± 0,2			
Verduras, hortalizas y frutas	0	0,015	97,2 ± 3,6	1,54x10 ⁻²	0,046	0,999
	1	0,062	99,3 ± 0,9			
	2	0,108	99,8 ± 0,7			
	3	0,154	100,0 ± 0,4			
	4	0,2	99,6 ± 0,2			

a. La recuperación indicada es la media ± desviación estándar de las cinco determinaciones realizadas en cada caso

5.1.3.2.2 Análisis de materiales de referencia

Para calcular la exactitud del método propuesto, además de realizar el estudio de la recuperación, se han utilizado materiales de referencia para los tipos de matrices en los que existía certificada la concentración de cobre, que son todos los casos excepto para las muestras de frutos secos y legumbres. Para llevar a cabo este estudio se han realizado por triplicado los análisis con el

método propuesto en las condiciones óptimas. Como se observa en la Tabla 204, los valores obtenidos con el método propuesto se encuentran dentro del intervalo de concentración de cobre certificado. Por lo que se puede decir que las metodologías propuestas son exactas.

Tabla 204. Estudio de la exactitud utilizando materiales de referencia

Tipo de muestra	Material de referencia	[Cu]certificada (µg/g)	Cantidad de muestra analizada (g)	[Cu]obtenida (µg/g)
Moluscos y pescados	Hepatopaneas de langosta NRCC-Tort 1 ^a	439± 22	0,0100	440 ± 1
	Mejillón CRM 278R ^b	9,45 ± 0,13	0,0300	9,38 ± 0,42
Carnes	Riñón de cerdo BCR-186 ^c	31,9 ± 0,4	0,0300	31,8 ± 0,4
Cereales y derivados	Harina integral BCR-189 ^c	6,4 ± 0,2	0,0300	6,4 ± 0,7
Verduras, hortalizas y frutas	Té NCS DC 3351 ^d	17,3 ± 1,0	0,0300	17,3 ± 0,4

a. NRCC: Nacional Research Council of Canada

b. CRM: Certified Reference Material, from Community Bureau of Reference

c. BCR: Community Bureau of Reference

d. NCS: China National Analysis Center for Iron and Steel

5.1.3.3 Frecuencia de muestreo

Se calculó la frecuencia de muestreo del método propuesto para cada tipo de muestra, considerando el proceso global, desde la extracción a la detección del cobre (Tabla 205). Los resultados indican que las frecuencias de muestreo obtenidas son bastante elevadas, ya que se pueden realizar desde 17 a 70 análisis a la hora.

Tabla 205. Frecuencia de muestreo para cada tipo de muestra estudiada utilizando las metodologías propuestas

Tipo de muestra	Cantidad de muestra (g)	Tiempo de sonicación (min)	Frecuencia de muestreo (muestras/h)
Moluscos y pescados	0,0100	1	44
	0,0200		
	0,0300		
Carnes	0,0300	3	17
Cereales y derivados	0,0300	0,5	70
Frutos secos	0,0300	2	25
Legumbres	0,0300	0,5	70
Verduras, hortalizas y frutas	0,0300	1	44

5.1.4 Determinación de hierro en las diferentes muestras sólidas de naturaleza alimenticia

Se han calculado los límites de detección, cuantificación, sensibilidad para el 1% de absorción y el intervalo lineal teniendo en cuenta la cantidad de muestra utilizada y el volumen de disolución extractante indicados en las metodologías propuestas para la determinación de hierro de las muestras sólidas de naturaleza alimenticia objeto de estudio. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 206.

Tabla 206. Características analíticas de las metodologías propuestas para la determinación de hierro de cada tipo de muestra

Tipo de muestra	Cantidad de muestra (g)	LOD ($\mu\text{g/g}$)	LOQ ($\mu\text{g/g}$)	Sensibilidad para un 1% de absorción ($\mu\text{g/g}$)	Intervalo lineal ($\mu\text{g/g}$)
Moluscos y pescados	0,0100	3,0	13,0	13,0	13,0 – 550,0
	0,0200	1,5	6,5	6,5	6,5 - 275,0
Carnes	0,0100	3,0	13,0	13,0	13,0 – 550,0
	0,0200	1,5	6,5	6,5	6,5 - 275,0
	0,0300	1,0	4,3	4,3	4,3 – 183,3
Cereales y derivados	0,0300	1,0	4,3	4,3	4,3 – 183,3
Frutos secos	0,0300	1,0	4,3	4,3	4,3 – 183,3
Legumbres	0,0300	1,0	4,3	4,3	4,3 – 183,3
Verduras, hortalizas y frutas	0,0100	3,0	13,0	13,0	13,0 – 550,0
	0,0200	1,5	6,5	6,5	6,5 - 275,0
	0,0300	1,0	4,3	4,3	4,3 – 183,3

5.1.4.1 Precisión

Se ha estudiado la precisión del proceso global. Para ello, se han realizado para cada tipo de muestra 11 análisis de la misma cantidad y tipo de muestra. Las muestras utilizadas en este estudio son las mismas que las utilizadas en los estudios previos (Tabla 124, pág. 221). A partir de los resultados obtenidos se calculó, al igual que en el estudio de la precisión de los calibrados, la desviación estándar, la desviación estándar media, el coeficiente de variación y el intervalo de confianza obtenido (Tabla 207).

Tabla 207. Estudio de la precisión de las metodologías propuestas para la determinación de hierro de los diferentes tipos de muestras

Tipo de muestra	Cantidad de muestra (g)	[Fe] $\pm \sigma^a$	[Fe] _{media} $\pm \sigma_m t$ ($\mu\text{g/g}$)	Coefficiente de variación (%)
Moluscos y pescados	0,0100	217,3 $\pm$ 1,1	217,6 $\pm$ 1,1	0,8
	0,0200		217,5 $\pm$ 0,5	0,4
Carnes	0,0100	129,4 $\pm$ 1,0	129,3 $\pm$ 0,9	1,1
	0,0200		129,8 $\pm$ 0,5	0,5
	0,0300		129,4 $\pm$ 0,4	0,4
Cereales y derivados	0,0300	66,9 $\pm$ 2,6	67,1 $\pm$ 0,35	0,8
Frutos secos	0,0300	41,7 $\pm$ 1,8	41,5 $\pm$ 0,4	1,3
Legumbres	0,0300	51,8 $\pm$ 2,1	51,5 $\pm$ 0,4	1,0
Verduras, hortalizas y frutas	0,0100	71,7 $\pm$ 2,0	72,8 $\pm$ 1,1	2,1
	0,0200		72,1 $\pm$ 0,6	1,2
	0,0300		71,5 $\pm$ 0,4	0,7

a. [Fe] certificada en los casos que la muestra es un material de referencia o determinada mediante el método de referencia (pág. 86)

t, valor del Test t-Student para 11 muestras=2,23

5.1.4.2 Exactitud

La evaluación de la exactitud de las metodologías propuestas se llevó a cabo realizando dos tipos de estudios:

- Recuperación de las metodologías propuestas
- Análisis de materiales de referencia

5.1.4.2.1 Recuperación de las metodologías propuestas

En este estudio se realizó el análisis de una muestra de cada tipo de matriz estudiada (las muestras son las mismas que las utilizadas en los estudios previos (Tabla 124, pág. 221). y las cantidades de las mismas son las utilizadas en la optimización (Tabla 104, pág. 194). Estos análisis se realizaron por quintuplicado, y se desarrollaron en las condiciones óptimas y utilizando una disolución extractante que contenía diferentes concentraciones de hierro en cada caso. Una vez obtenidos los datos experimentales, se ha calculado el %recuperación en cada caso (pág. 314). Los datos obtenidos para cada una

de las muestras y los %recuperación obtenidos se reflejan en la Tabla 208. Los %recuperación son cuantitativos en todos los casos.

Se realizó el ajuste de las rectas de adición por mínimos cuadrados y se observó que las pendientes son idénticas en todos los casos. Además, las rectas de calibrado y de adición son totalmente paralelas para todos los tipos de muestras, como se puede ver para el caso de las muestras de moluscos y pescados en la Figura 80. El paralelismo de estas rectas se comprobó estadísticamente mediante el programa ULC (Univariate Linear Calibration) [167]. Este paralelismo indica que no hay efecto matriz en las determinaciones de hierro realizadas.

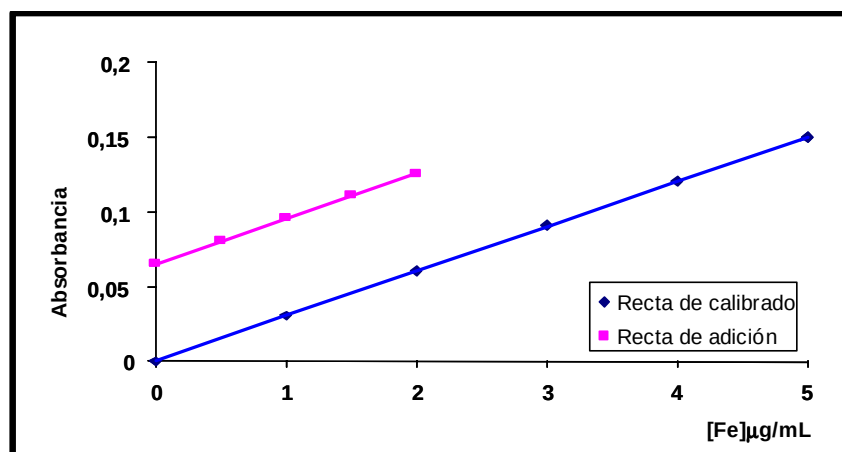


Figura 80. Recta de calibrado del hierro y de adición de este metal sobre las muestras de moluscos y pescados

Tabla 208. Estudio de la recuperación de las metodologías propuestas para la determinación de hierro de los diferentes tipos de muestras alimenticias

Tipo de muestras	Adición	Absorbancia	Recuperación ^a	Recta de adición		
				Ordenada	Pendiente	Coefficiente de regresión
Moluscos y pescados	0	0,065	99,8 ± 0,8	1,57x10 ⁻²	0,030	0,999
	0,5	0,081	100,1 ± 0,7			
	1	0,096	100,1 ± 0,6			
	1,5	0,111	100,1 ± 0,5			
	2	0,126	100,1 ± 0,4			
	2,5	0,141	100,1 ± 0,4			
	3	0,155	99,6 ± 0,3			
Carnes	0,0	0,039	100,0 ± 1,1	3,91x10 ⁻²	0,030	0,999
	0,5	0,054	99,3 ± 0,8			
	1,0	0,069	100,4 ± 0,8			
	1,5	0,084	100,3 ± 0,7			
	2,0	0,099	100,3 ± 0,6			
	2,5	0,114	100,3 ± 0,5			
	3,0	0,128	99,3 ± 0,3			
Cereales y derivados	0	0,021	100,3 ± 2,7	2,06x10 ⁻²	0,030	0,999
	1	0,05	99,5 ± 0,9			
	2	0,08	100,0 ± 0,7			
	3	0,11	99,9 ± 0,4			
	4	0,14	99,9 ± 0,3			
Frutos Secos	0	0,038	99,2 ± 1,4	3,78x10 ⁻²	0,030	0,999
	0,5	0,053	99,5 ± 1,0			
	1	0,067	99,6 ± 0,8			
	1,5	0,083	99,7 ± 0,7			
	2	0,099	100,8 ± 0,6			
	2,5	0,113	100,0 ± 0,4			
	3	0,128	99,9 ± 0,4			
Legumbres	0	0,016	98,8 ± 2,9	1,62x10 ⁻²	0,030	0,999
	1	0,046	99,3 ± 1,2			
	2	0,076	99,9 ± 0,5			
	3	0,105	99,6 ± 0,5			
	4	0,135	99,7 ± 0,4			
Verduras, hortalizas y frutas	0	0,022	98,4 ± 2,5	2,22x10 ⁻²	0,030	0,999
	1	0,052	99,4 ± 1,1			
	2	0,082	99,7 ± 0,7			
	3	0,112	100,0 ± 0,4			
	4	0,141	99,8 ± 0,4			

a. La recuperación indicada es la media ± desviación estándar de las cinco determinaciones realizadas en cada caso

5.1.4.3 Análisis de materiales de referencia

Para calcular la exactitud del método propuesto, además de realizar el estudio de la recuperación, se han utilizado materiales de referencia para los tipos de matrices en los que existía certificada la concentración de hierro, que son todos los casos excepto para las muestras de frutos secos y legumbres. Para llevar a cabo este estudio se han realizado por triplicado los análisis con el método propuesto en las condiciones óptimas. Como se observa en la Tabla 209, los valores obtenidos con el método propuesto se encuentran dentro del intervalo de concentración de hierro certificado. Por lo que se puede decir que las metodologías propuestas son exactas.

Tabla 209. Estudio de la exactitud utilizando materiales de referencia

Tipo de muestra	Material de referencia	[Fe]certificada (µg/g)	Cantidad de muestra analizada (g)	[Fe]obtenida (µg/g)
Moluscos y pescados	Hepatopancreas de langosta NRCC-Tort 1 ^a	186 ± 11	0,0100	187 ± 2
Carnes	Riñón de cerdo BCR-186 ^c	299 ± 10	0,0100	300 ± 2
	Músculo de bovino BCR-184 ^b	79 ± 2	0,0300	79 ± 1
Cereales y derivados	Harina integral BCR-189 ^c	68,3 ± 1,9	0,0300	68,1 ± 0,6
Verduras, hortalizas y frutas	Té NCS DC 3351 ^d	264 ± 10	0,0100	263 ± 2

a. NRCC: Nacional Research Council of Canada

b. CRM: Certified Reference Material, from Community Bureau of Reference

c. BCR: Community Bureau of Reference

d. NCS: China National Analysis Center for Iron and Steel

5.1.4.3 Frecuencia de muestreo

Se calculó la frecuencia de muestreo del método propuesto para cada tipo de muestra, considerando el proceso global, desde la extracción a la detección del hierro (Tabla 210). Los resultados indican que las frecuencias de muestreo obtenidas son bastante elevadas, ya que se pueden realizar desde 11 a 70 análisis a la hora.

Tabla 210. Frecuencia de muestreo para cada tipo de muestra estudiada utilizando las metodologías propuestas

Tipo de muestra	Cantidad de muestra (g)	Tiempo de sonicación (min)	Frecuencia de muestreo (muestras/h)
Moluscos y pescados	0,0100	1	44
	0,0200		
Carnes	0,0100	5	11
	0,0200	5	11
	0,0300	5	11
Cereales y derivados	0,0300	2	25
Frutos secos	0,0300	2	25
Legumbres	0,0300	3	17
Verduras, hortalizas y frutas	0,0100	1	44
	0,0200	1,5	32
	0,0300	2	25

5.1.5 Determinación de magnesio diferentes muestras sólidas de naturaleza alimenticia

Se han calculado los límites de detección, cuantificación, sensibilidad para el 1% de absorción y el intervalo lineal teniendo en cuenta la cantidad de muestra utilizada, el volumen de disolución extractante y la dilución realizada con la disolución de La al 2% en las metodologías propuestas para la determinación de magnesio en las muestras sólidas de naturaleza alimenticia objeto de estudio. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 211.

Tabla 211. Características analíticas de las metodologías propuestas para la determinación de magnesio de cada tipo de muestra

Tipo de muestra	Cantidad de muestra (g)	LOD ($\mu\text{g/g}$)	LOQ ($\mu\text{g/g}$)	Sensibilidad para un 1% de absorción ($\mu\text{g/g}$)	Intervalo lineal ($\mu\text{g/g}$)
Moluscos y pescados	0,0050	21,0	81,0	81,0	81,0 – 6000,0
Carnes	0,0050	4,2	16,4	16,4	16,4 – 1200,0
Cereales y derivados	0,0100	2,1	8,2	8,2	8,2 – 600,0
Frutos secos	0,0050	10,5	41,0	41,0	41,0 – 3000,0
Legumbres	0,0050	6,3	24,6	24,6	24,6 – 1800,0
Verduras, hortalizas y frutas	0,0050	10,5	41,0	41,0	41,0 – 3000,0

5.1.5.1 Precisión

Se ha estudiado la precisión del proceso global. Para ello, se han realizado para cada tipo de muestra 11 análisis de la misma cantidad y tipo de muestra (las muestras y las cantidades de las mismas utilizadas en este estudio son las mismas que las utilizadas en la optimización del proceso (Tabla 125, pág. 223) excepto en el caso de las verduras, hortalizas y frutas que se ha utilizado una muestra de grelo en lugar del material de referencia de té). De los resultados obtenidos se calculó, al igual que en el estudio de la precisión de los calibrados, la desviación estándar, la desviación estándar media, el coeficiente de variación y el intervalo de confianza obtenido (Tabla 212).

Tabla 212. Estudio de la precisión de las metodologías propuestas para la determinación de magnesio de los diferentes tipos de muestras

Tipo de muestra	Cantidad de muestra (g)	[Mg] $\pm \sigma^a$	[Mg] _{media} $\pm \sigma_m t$ ($\mu\text{g/g}$)	Coefficiente de variación (%)
Moluscos y pescados	0,0050	4839,7 $\pm$ 35,6	4890,8 $\pm$ 6,7	0,2
Carnes	0,0050	772,5 $\pm$ 7,1	780,5 $\pm$ 2,1	0,4
Cereales y derivados	0,0100	288,9 $\pm$ 2,7	290,1 $\pm$ 0,6	0,3
Frutos secos	0,0050	1444,4 $\pm$ 13,6	1436,6 $\pm$ 2,9	0,3
Legumbres	0,0050	1186,2 $\pm$ 13,6	1183,5 $\pm$ 2,4	0,3
Verduras, hortalizas y frutas	0,0050	2183,6 $\pm$ 13,6	2177,5 $\pm$ 3,3	0,2

a. [Mg] certificada en los casos que la muestra es un material de referencia determinada mediante el método de referencia (pág. 86)

- t, valor del Test t-Student para 11 muestras=2,23

5.1.5.2 Exactitud

La evaluación de la exactitud de las metodologías propuestas se llevó a cabo realizando dos tipos de estudios:

- Recuperación de las metodologías propuestas
- Análisis de materiales de referencia

5.1.5.2.1 Recuperación de las metodologías propuestas

En este estudio se realizó el análisis de una muestra de cada tipo de matriz estudiada (las muestras y las cantidades de las mismas son las indicadas en la optimización (Tabla 125, pág. 223), excepto en el caso de las verduras, hortalizas y frutas que se ha utilizado una muestra de grelo en lugar del material de referencia de té). Estos análisis se realizaron por quintuplicado, y se desarrollaron en las condiciones óptimas y utilizando una disolución extractante que contenía diferentes concentraciones de magnesio en cada caso. Una vez obtenidos los datos experimentales, se han calculado los %recuperación (pág. 314). Los datos obtenidos para cada una de las muestras

y los %recuperación obtenidos se reflejan en la Tabla 213. Los %recuperación son cuantitativos en todos los casos.

Se realizó el ajuste de las rectas de adición por mínimos cuadrados y se observó que las pendientes son idénticas en todos los casos. Además, las rectas de calibrado y de adición son totalmente paralelas para todos los tipos de muestras, como se puede ver para el caso de las muestras de moluscos y pescados en la Figura 81. El paralelismo de estas rectas se comprobó estadísticamente mediante el programa ULC (Univariate Linear Calibration) [167]. Este paralelismo indica que no hay efecto matriz en las determinaciones de magnesio realizadas.

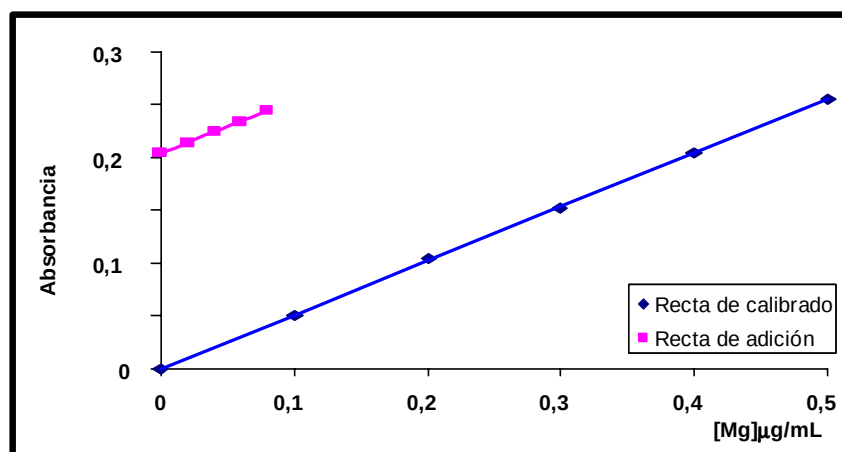


Figura 81. Recta de calibrado del magnesio y de adición de este metal sobre las muestras de moluscos y pescados

Tabla 213. Estudio de la recuperación de las metodologías propuestas para la determinación de magnesio de los diferentes tipos de muestras de naturaleza alimenticia

Tipo de muestras	Adición ^a	Absorbancia	Recuperación ^b	Recta de adición		
				Ordenada	Pendiente	Coefficiente de regresión
Moluscos y pescados	0	0,204	100,3 ± 0,2	2,04x10 ⁻¹	0,510	0,999
	0,02	0,214	100,2 ± 0,2			
	0,04	0,225	100,2 ± 0,2			
	0,06	0,234	99,7 ± 0,2			
	0,08	0,245	99,9 ± 0,2			
Carnes	0	0,197	99,9 ± 0,3	1,97x10 ⁻¹	0,513	0,999
	0,02	0,207	99,8 ± 0,3			
	0,04	0,217	99,4 ± 0,2			
	0,06	0,227	99,6 ± 0,2			
	0,08	0,238	100,0 ± 0,2			
	0,1	0,248	99,4 ± 0,2			
Cereales y derivados	0	0,148	100,3 ± 0,3	1,48x10 ⁻¹	0,510	0,999
	0,05	0,173	100,2 ± 0,3			
	0,1	0,199	100,4 ± 0,2			
	0,15	0,224	100,0 ± 0,2			
	0,2	0,25	100,0 ± 0,2			
Frutos Secos	0	0,149	100,9 ± 0,3	1,49x10 ⁻¹	0,516	0,999
	0,04	0,169	100,7 ± 0,3			
	0,08	0,19	101,1 ± 0,3			
	0,12	0,211	101,5 ± 0,2			
	0,16	0,231	101,1 ± 0,2			
	0,2	0,252	101,2 ± 0,2			
Legumbres	0	0,203	100,4 ± 0,3	2,03x10 ⁻¹	0,500	0,999
	0,01	0,208	100,4 ± 0,3			
	0,02	0,213	100,2 ± 0,3			
	0,03	0,219	100,5 ± 0,2			
	0,04	0,223	100,3 ± 0,2			
	0,05	0,228	99,9 ± 0,2			
	0,06	0,233	100,1 ± 0,2			
Verduras, hortalizas y frutas	0	0,222	99,5 ± 0,2	2,22x10 ⁻¹	0,519	0,999
	0,02	0,233	99,9 ± 0,2			
	0,03	0,238	99,5 ± 0,2			
	0,04	0,243	99,7 ± 0,2			
	0,05	0,248	99,8 ± 0,2			

a. En estos valores de la adición se ha tenido en cuenta la dilución pertinente en cada caso

b. La recuperación indicada es la media ± desviación estándar de las cinco determinaciones realizadas en cada caso

5.1.5.2.2 Análisis de materiales de referencia

Para calcular la exactitud del método propuesto, además de realizar el estudio de la recuperación, se han utilizado materiales de referencia para los tipos de matrices en los que existía certificada la concentración de magnesio. En este caso sólo se certifica la concentración de este metal para el material de referencia utilizado para las muestras de verduras, hortalizas y frutas. Para llevar a cabo este estudio se han realizado por triplicado los análisis con el método propuesto en las condiciones óptimas. Como se observa en la Tabla 214, los valores obtenidos con el método propuesto se encuentran dentro del intervalo de concentración de magnesio certificado. Por lo que se puede decir que las metodologías propuestas son exactas.

Tabla 214. Estudio de la exactitud utilizando materiales de referencia

Tipo de muestra	Material de referencia	[Mg]certificada (µg/g)	Cantidad de muestra analizada (g)	[Mg]obtenida (µg/g)
Verduras, hortalizas y frutas	Té NCS DC 73351 ^a	1700 ± 100	0,0050	1698 ± 9

a. NCS: China National Analysis Center for Iron and Steel

5.1.5.3 Frecuencia de muestreo

Se calculó la frecuencia de muestreo del método propuesto para cada tipo de muestra, considerando el proceso global, desde la extracción a la detección del calcio (Tabla 215). Los resultados indican que las frecuencias de muestreo obtenidas son bastante elevadas, ya que se pueden realizar desde 21 a 57 análisis a la hora.

Tabla 215. Frecuencia de muestreo para cada tipo de muestra estudiada utilizando las metodologías propuestas

Tipo de muestra	Cantidad de muestra (g)	Tiempo de sonicación (min)	Frecuencia de muestreo (muestras/h)
Moluscos y pescados	0,0050	2	21
Carnes	0,0050	0,5	57
Cereales y derivados	0,0100	0,5	57
Frutos secos	0,0050	2	23
Legumbres	0,0050	1	38
Verduras, hortalizas y frutas	0,0050	0,5	57

5.1.6 Determinación de manganeso en las diferentes muestras sólidas de naturaleza alimenticia

Se han calculado los límites de detección, cuantificación, sensibilidad para el 1% de absorción y el intervalo lineal teniendo en cuenta la cantidad de muestra utilizada y el volumen de disolución extractante indicados en las metodologías propuestas para la determinación de manganeso de las muestras sólidas de naturaleza alimenticia objeto de estudio. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 216.

Tabla 216. Características analíticas de las metodologías propuestas para la determinación de manganeso de cada tipo de muestra

Tipo de muestra	Cantidad de muestra (g)	LOD ($\mu\text{g/g}$)	LOQ ($\mu\text{g/g}$)	Sensibilidad para un 1% de absorción ($\mu\text{g/g}$)	Intervalo lineal ($\mu\text{g/g}$)
Moluscos y pescados	0,0300	0,7	2,3	2,3	2,3 – 73,3
Carnes	0,0300	0,7	2,3	2,3	2,3 – 73,3
Cereales y derivados	0,0100	2,0	7,0	7,0	7,0 – 220,0
	0,0200	1,0	3,5	3,5	3,5 – 110,0
	0,0300	0,7	2,3	2,3	2,3 – 73,3
Frutos secos	0,0200	1,0	3,5	3,5	3,5 – 110,0
	0,0300	0,7	2,3	2,3	2,3 – 73,3
Legumbres	0,0300	0,7	2,3	2,3	2,3 – 73,3
Verduras, hortalizas y frutas	0,0300	0,7	2,3	2,3	2,3 – 73,3

5.1.6.1 Precisión

Se ha estudiado también la precisión del proceso global. Para ello, se han realizado para cada tipo de muestra 11 análisis de la misma cantidad y tipo de muestra. Las muestras utilizadas en este estudio son las utilizadas en los estudios previos (Tabla 174, pág. 277). Las cantidades de muestra utilizadas son las propuestas en los estudios de optimización (Tabla 152, pág. 252). Una vez obtenidos los resultados se calculó, al igual que en el estudio de la precisión de los calibrados, la desviación estándar, la desviación estándar media, el coeficiente de variación y el intervalo de confianza obtenido (Tabla 217).

Tabla 217. Estudio de la precisión de las metodologías propuestas para la determinación de manganeso de los diferentes tipos de muestras

Tipo de muestra	Cantidad de muestra (g)	[Mn] $\pm \sigma^a$	[Mn] _{media} $\pm \sigma_m$ t ($\mu\text{g/g}$)	Coefficiente de variación (%)
Moluscos y pescados	0,0300	15,6 $\pm$ 0,5	16,0 $\pm$ 0,2	1,4
Carnes	0,0300	8,4 $\pm$ 0,5 ^b	8,5 $\pm$ 0,2 ^b	3,0
Cereales y derivados	0,0100		12,9 $\pm$ 0,4	5,1
	0,0200	12,4 $\pm$ 0,8	12,3 $\pm$ 0,3	3,3
	0,0300		12,4 $\pm$ 0,2	2,0
Frutos secos	0,0200		42,1 $\pm$ 0,3	0,9
	0,0300	42,3 $\pm$ 0,8	42,1 $\pm$ 0,2	0,5
Legumbres	0,0300	19,4 $\pm$ 0,8	19,5 $\pm$ 0,2	1,3
Verduras, hortalizas y frutas	0,0100	35,3 $\pm$ 0,5	35,6 $\pm$ 0,2	0,7

a. [Mn] determinada mediante el método de referencia (pág. 86)

b: Se ha realizado una adición de 1 $\mu\text{g/mL}$ a la muestra debido la baja [Mn] presente
t, valor del Test t-Student para 11 muestras=2,23

5.1.6.2 Exactitud

La evaluación de la exactitud de las metodologías propuestas se llevó a cabo realizando dos tipos de estudios:

- Recuperación de las metodologías propuestas
- Análisis de materiales de referencia

5.1.6.2.1 Recuperación de las metodologías propuestas

En este estudio se realizó el análisis de una muestra de cada tipo de matriz estudiada. Las muestras utilizadas en este estudio son las utilizadas en los estudios previos (Tabla 152, pág. 252), y las cantidades de las mismas fueron 0,0300 g en todos los casos dadas las bajas concentraciones del metal presentes en los diferentes tipos de muestras. Estos análisis se realizaron por quintuplicado, y se desarrollaron en las condiciones óptimas y utilizando una disolución extractante que contenía diferentes concentraciones de manganeso en cada caso. Una vez obtenidos los datos experimentales, se ha calculado el %recuperación (pág. 314). Los datos obtenidos para cada una

de las muestras y los %recuperación obtenidos se reflejan en la Tabla 218. Los %recuperación son cuantitativos en todos los casos.

Se realizó el ajuste de las rectas de adición por mínimos cuadrados y se observó que las pendientes son idénticas en todos los casos. Además, las rectas de calibrado y de adición son totalmente paralelas para todos los tipos de muestras, como se puede ver para el caso de las muestras de moluscos y pescados en la Figura 82. El paralelismo de estas rectas se comprobó estadísticamente mediante el programa ULC (Univariate Linear Calibration) [167]. Este paralelismo indica que no hay efecto matriz en las determinaciones de manganeso realizadas.

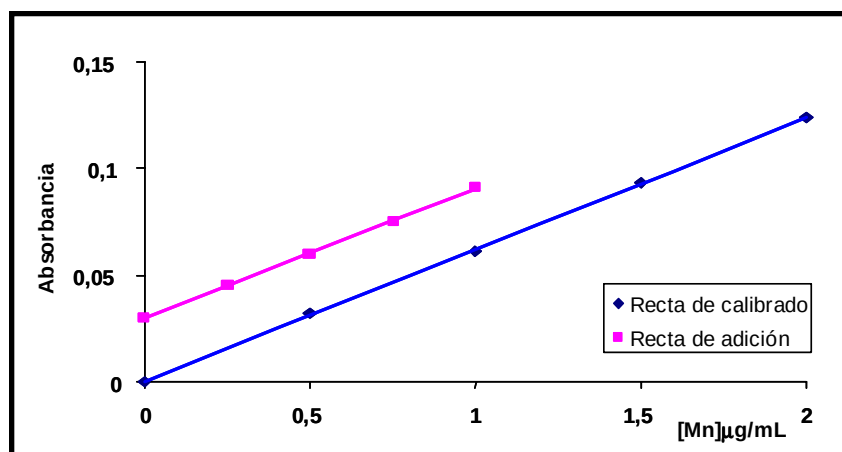


Figura 82. Recta de calibrado del manganeso y de adición de este metal sobre las muestras de moluscos y pescados

Tabla 218. Estudio de la recuperación de las metodologías propuestas para la determinación de manganeso de los diferentes tipos de muestras alimenticias

Tipo de muestras	Adición	Absorbancia	Recuperación ^a	Recta de adición		
				Ordenada	Pendiente	Coefficiente de regresión
Moluscos y pescados	0	0,03	101,5 ± 1,5	2,96x10 ⁻²	0,061	0,999
	0,25	0,045	99,9 ± 1,2			
	0,5	0,06	100,2 ± 0,7			
	0,75	0,075	99,8 ± 0,7			
	1	0,091	99,8 ± 0,5			
	1,25	0,106	100,0 ± 0,6			
	1,5	0,122	99,9 ± 0,5			
Carnes	0	0,016	100,6 ± 3,5	1,58x10 ⁻²	0,062	0,999
	0,25	0,031	100,2 ± 1,4			
	0,5	0,047	100,0 ± 1,2			
	0,75	0,062	99,6 ± 0,7			
	1	0,078	100,1 ± 0,6			
	1,25	0,093	99,6 ± 0,5			
	1,5	0,109	100,2 ± 0,4			
Cereales y derivados	0	0,023	100,4 ± 2,4	2,31x10 ⁻²	0,062	0,999
	0,3	0,042	99,9 ± 1,3			
	0,6	0,06	100,0 ± 0,7			
	0,9	0,079	99,8 ± 0,7			
	1,2	0,097	100,1 ± 0,6			
	1,5	0,116	100,3 ± 0,4			
Frutos Secos	0	0,079	99,9 ± 0,7	7,88x10 ⁻²	0,062	0,999
	0,2	0,091	100,1 ± 0,6			
	0,3	0,097	99,9 ± 0,5			
	0,4	0,103	100,0 ± 0,5			
	0,5	0,11	100,0 ± 0,5			
	0,6	0,116	99,8 ± 0,6			
	0,7	0,122	99,8 ± 0,5			
Legumbres	0	0,036	100,6 ± 1,5	3,59x10 ⁻²	0,062	0,999
	0,2	0,048	99,7 ± 1,1			
	0,4	0,061	99,8 ± 0,7			
	0,6	0,073	99,4 ± 0,6			
	0,8	0,086	100,0 ± 0,6			
	1	0,098	100,0 ± 0,7			
	1,2	0,11	100,1 ± 0,5			
	1,4	0,123	99,9 ± 0,4			
Verduras, hortalizas y frutas	0	0,066	101,2 ± 0,9	6,58x10 ⁻²	0,061	0,999
	0,2	0,078	99,7 ± 0,6			
	0,4	0,09	99,8 ± 0,5			
	0,6	0,103	100,1 ± 0,4			
	0,8	0,115	100,1 ± 0,4			
	0,9	0,121	100,1 ± 0,5			

a. La recuperación indicada es la media ± desviación estándar de las cinco determinaciones realizadas en cada caso

5.1.5.2.2 Análisis de materiales de referencia

Para calcular la exactitud del método propuesto, además de realizar el estudio de la recuperación, se han utilizado materiales de referencia para los tipos de matrices en los que existía certificada la concentración de manganeso, que son todos los casos excepto para las muestras de frutos secos y legumbres. Para llevar a cabo este estudio se han realizado por triplicado los análisis con el método propuesto en las condiciones óptimas. Como se observa en la Tabla 219, los valores obtenidos con el método propuesto se encuentran dentro del intervalo de concentración de manganeso certificado. Por lo que se puede decir que las metodologías propuestas son exactas.

Tabla 219. Estudio de la exactitud utilizando materiales de referencia

Tipo de muestra	Material de referencia	[Mn]certificada (µg/g)	Cantidad de muestra analizada (g)	[Mn]obtenida (µg/g)
Moluscos y pescados	Hepatopancreas de langosta NRCC-Tort 1 ^a	23,4 ± 1,0	0,0300	23,4 ± 0,3
	Mejillón CRM 278R ^b	7,69 ± 0,23	0,0300	7,62 ± 0,31
Carnes	Riñón de cerdo BCR-186 ^c	8,5 ± 0,3	0,0300	8,5 ± 0,3
	Músculo de bovino BCR-184 ^b	334 ± 28	0,0050	334 ± 2
Cereales y derivados	Harina integral BCR-189 ^c	63,3 ± 1,6	0,0300	63,4 ± 0,3
Verduras, hortalizas y frutas	Té NCS DC 3351 ^d	1237 ± 40	0,0050	1237 ± 9 ^e

a. NRCC: Nacional Research Council of Canada

b. CRM: Certified Reference Material, from Community Bureau of Reference

c. BCR: Community Bureau of Reference

d. NCS: China National Analysis Center for Iron and Steel

e. Se ha utilizado un volumen de disolución extractante de 5 mL para que la señal no se salga del intervalo lineal del manganeso en FAAS (0,1-2,2 µg/mL)

5.1.6.3 Frecuencia de muestreo

Se calculó la frecuencia de muestreo de la metodología propuesta para cada tipo de muestra, considerando el proceso global, desde la extracción a la detección del manganeso (Tabla 220). Los resultados indican que las frecuencias de muestreo obtenidas se encuentran entre 17 y 70 análisis a la hora.

Tabla 220. Frecuencia de muestreo para cada tipo de muestra estudiada utilizando las metodologías propuestas

Tipo de muestra	Cantidad de muestra (g)	Tiempo de sonicación (min)	Frecuencia de muestreo (muestras/h)
Moluscos y pescados	0,0300	0,5	70
Carnes	0,0100	0,5	70
Cereales y derivados	0,0100	1	44
	0,0200	2	25
	0,0300	2	25
Frutos secos	0,0200	2	25
	0,0300	2	25
Legumbres	0,0300	3	17
Verduras, hortalizas y frutas	0,0300	0,5	70

5.2 Características analíticas de las metodologías propuestas que utilizan el CUDS

5.2.1 Determinación de calcio, cinc, cobre, hierro y magnesio en las muestras de leche en polvo y fórmulas infantiles

Se han calculado los límites de detección, cuantificación, sensibilidad para el 1% de absorción y el intervalo lineal teniendo en cuenta la cantidad de muestra utilizada y el volumen de disolución utilizado para realizar la suspensión en las metodologías propuestas para la determinación de calcio, cinc, cobre, hierro y magnesio en las muestras de leche en polvo y fórmulas infantiles. En los casos del calcio y del magnesio, también se han tenido en cuenta las diluciones realizadas con la disolución de La al 2%. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 221.

Tabla 221. Características analíticas de las metodologías propuestas para la determinación de Ca, Zn, Cu, Fe y Mg de las muestras de leche en polvo y fórmulas infantiles

Metal	Cantidad de muestra (g)	LOD (µg/g)	LOQ (µg/g)	Sensibilidad para un 1% de absorción (µg/g)	Intervalo lineal (µg/g)
Ca	0,0050	150,0	600,0	600,0	600,0 – 27500,0
Zn	0,0100	0,4	2,0	2,0	2,0 – 110,0
Cu	0,0300	0,3	2,7	2,7	2,7 – 183,3
Fe	0,0300	1,0	4,3	4,3	4,3 – 183,3
Mg	0,0050	10,5	41,0	41,0	41,0 – 3000,0

5.2.1.1 Precisión

Previamente se ha calculado la precisión del calibrado para cada metal. Una vez optimizado el proceso, se ha estudiado también la precisión del proceso global. Para ello, se han realizado 11 análisis de cada metal de los mismos materiales de referencia y cantidad de los mismos utilizados en la optimización de las variables del proceso llevado a cabo en el CUDS (Tabla 177, pág. 281).

De los resultados obtenidos se calculó, al igual que en el estudio de la precisión de los calibrados, la desviación estándar, la desviación estándar media, el coeficiente de variación y el intervalo de confianza obtenido (Tabla 222).

Tabla 222. Estudio de la precisión de las metodologías propuestas para la determinación de Ca, Zn, Cu, Fe y Mg de las muestras de leche en polvo y fórmulas infantiles

Tipo de muestra	Cantidad de muestra (g)	[Me] $\pm \sigma$ ^a	[Me] _{media} $\pm \sigma_m$ t ($\mu\text{g/g}$)	Coeficiente de variación (%)
Ca	0,0050	13490 $\pm$ 100	13489 $\pm$ 65	0,7
Zn	0,0100	49,0 $\pm$ 0,6	49,1 $\pm$ 0,1	0,4
Cu	0,0300	5,23 $\pm$ 0,08	5,28 $\pm$ 0,20 ^b	5,5
Fe	0,0300	50,1 $\pm$ 1,3	50,3 $\pm$ 0,4	1,1
Mg	0,0050	1263 $\pm$ 24	1262 $\pm$ 3	0,3

a. Concentración del metal correspondiente certificada en los casos que la muestra es un material de referencia o determinada mediante el método de referencia (pág. 86)

b. Se realizó una adición de 1 $\mu\text{g/mL}$ a la muestra debido a las bajas [Cu] existente

- t, valor del Test t-Student para 11 muestras=2,23

5.2.1.2 Exactitud

La evaluación de la exactitud de las metodologías propuestas se llevó a cabo realizando dos tipos de estudios:

- Recuperación de las metodologías propuestas
- Análisis de materiales de referencia

5.2.1.2.1 Recuperación de las metodologías propuestas

Para realizar este estudio se analizaron los materiales de referencia y las cantidades de los mismos propuestos para cada metal en la optimización (Tabla 177, pág 281). Estos análisis se realizaron por quintuplicado y se desarrollaron en las condiciones óptimas y utilizando una disolución extractante que contenía diferentes concentraciones de del metal objeto de estudio en cada caso. Una vez obtenidos los datos experimentales, se ha calculado el %recuperación en cada caso (como se indica en la pág. 314). Los datos obtenidos para cada una de las muestras y los %recuperación

obtenidos se reflejan en la Tabla 223. Los %recuperación son cuantitativos en todos los casos.

Se realizó el ajuste de las rectas de adición por mínimos cuadrados. Además, las rectas de calibrado y de adición para cada metal son totalmente paralelas, como se puede ver en la Figura 83. El paralelismo de estas rectas se comprobó estadísticamente mediante el programa ULC (Univariate Linear Calibration) [167]. Este paralelismo indica que no hay efecto matriz en las determinaciones de los metales estudiados en las muestras de leche en polvo y fórmulas infantiles.

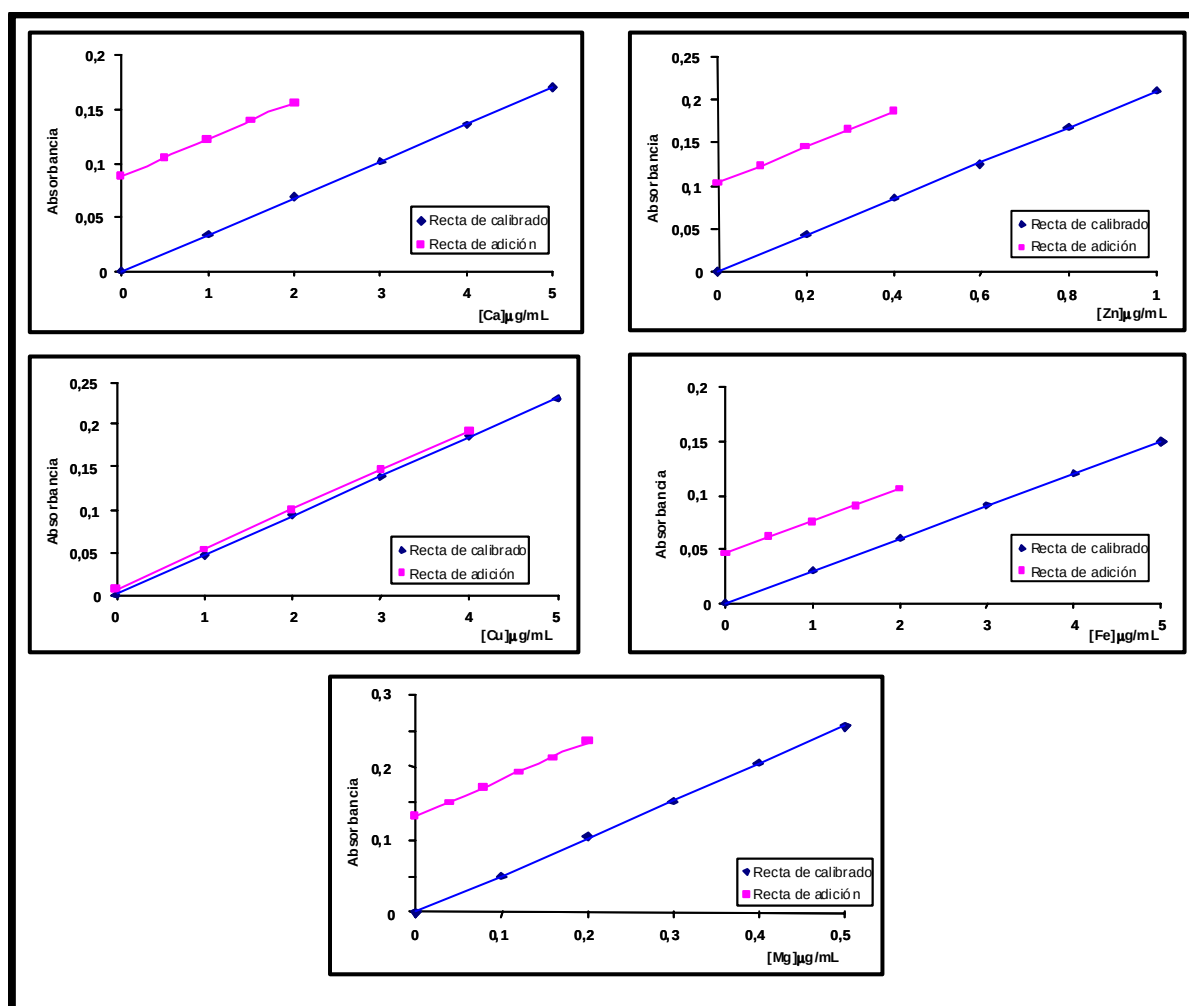


Figura 83. Rectas de calibrado y adición de los metales Ca, Zn, Cu, Fe y Mg en las muestras de leche en polvo y fórmulas infantiles

Tabla 223. Estudio de la recuperación de las metodologías propuestas para la determinación de Ca, Zn, Cu, Fe y Mg de las muestras de leche en polvo y fórmulas infantiles

Tipo de muestras	Adición ^a	Absorbancia	Recuperación ^b	Recta de adición		
				Ordenada	Pendiente	Coefficiente de regresión
Ca	0	0,088	99,9 ± 0,5	2,86x10 ⁻⁴	0,034	0,999
	0,5	0,105	100,0 ± 0,5			
	1,0	0,122	100,1 ± 0,4			
	1,5	0,139	100,1 ± 0,3			
	2,0	0,156	100,2 ± 0,4			
Zn	0	0,103	100,1 ± 0,5	1,03x10 ⁻¹	0,209	0,999
	0,1	0,124	100,3 ± 0,4			
	0,2	0,145	100,3 ± 0,4			
	0,3	0,166	99,7 ± 0,3			
	0,4	0,187	100,0 ± 0,2			
Cu	0	0,008	98,5 ± 6,1	7,80x10 ⁻³	0,046	0,999
	1	0,054	100,5 ± 1,0			
	2	0,100	100,1 ± 0,5			
	3	0,147	100,1 ± 0,4			
	4	0,193	99,9 ± 0,3			
Fe	0	0,046	100,2 ± 1,2	4,64x10 ⁻²	0,030	0,999
	0,5	0,062	101,9 ± 0,9			
	1	0,076	100,2 ± 0,7			
	1,5	0,091	100,5 ± 0,5			
	2	0,106	100,2 ± 0,5			
	2,5	0,121	100,4 ± 0,4			
	3	0,136	100,2 ± 0,4			
Mg	0	0,132	101,2 ± 0,5	1,31x10 ⁻¹	0,514	0,999
	0,04	0,151	99,9 ± 0,3			
	0,08	0,173	101,0 ± 0,3			
	0,12	0,192	99,3 ± 0,2			
	0,16	0,213	100,0 ± 0,2			
	0,2	0,235	100,8 ± 0,2			

a. En los casos del calcio y magnesio se ha tenido en cuenta la dilución pertinente

b. La recuperación indicada es la media ± desviación estándar de las cinco determinaciones realizadas en cada caso

5.2.1.2.2 Análisis de materiales de referencia

Para calcular la exactitud del método propuesto, además de realizar el estudio de la recuperación, se han analizado materiales de referencia de leche en polvo en los que se certifica la concentración de los metales objeto de estudio. Así, se han utilizado los dos materiales de referencia indicados en la

Tabla 224. Para llevar a cabo este estudio se han realizado por triplicado los análisis con el método propuesto en las condiciones óptimas. Como se observa en la Tabla 224, los valores obtenidos con el método propuesto se encuentran dentro del intervalo de concentración certificado para cada metal. Por lo que se puede decir que las metodologías propuestas son exactas. Sólo, en el caso del cobre se observa que el valor de concentración obtenido aplicando el método propuesto se encuentra en el extremo del intervalo certificado, además de presentar una desviación estándar bastante elevada con respecto a este valor de concentración. Esto se debe a las bajas concentraciones de cobre presentes en el material de referencia.

Tabla 224. Estudio de la exactitud utilizando materiales de referencia

Metal	Material de referencia	[Me] certificada ($\mu\text{g/g}$)	Cantidad de muestra analizada (g)	[Me] obtenida ($\mu\text{g/g}$)
Ca	Leche en polvo desnatada BCR-063 R ^a	13490 ± 100	0,0050	13506 ± 81
Zn	Leche en polvo desnatada BCR-063 R ^a	$49,0 \pm 0,6$	0,0100	$49,1 \pm 0,3$
Cu	Leche en polvo desnatada BCR-151 ^a	$5,23 \pm 0,08$	0,0300	$5,15 \pm 0,72$
Fe	Leche en polvo desnatada BCR-151 ^a	$50,1 \pm 1,3$	0,0300	$50,3 \pm 0,6$
Mg	Leche en polvo desnatada BCR-151 ^a	1263 ± 24	0,0050	1261 ± 5

[Me]: Concentración del metal objeto de estudio

a. CRM: Certified Reference Material, from Community Bureau of Reference

5.2.1.3 Frecuencia de muestreo

Se calculó la frecuencia de muestreo del método propuesto para cada metal estudiado en las muestras de leche en polvo y fórmulas infantiles, considerando el proceso global, desde la formación de la suspensión de la muestra hasta la detección del metal (Tabla 225). Los resultados indican que las frecuencias de muestreo obtenidas son bastante elevadas. A pesar de que los tiempos de sonicación sean idénticos en todos los casos, en los resultados se observa que para el calcio y el magnesio la frecuencia de muestreo es menor. Esto se debe a que en ambos casos la suspensión de la muestra es diluída en línea con la disolución de La.

Tabla 225. Frecuencia de muestreo para cada tipo metal estudiado en las muestras de leche en polvo y fórmulas infantiles utilizando las metodologías propuestas

Metal	Cantidad de muestra (g)	Tiempo de sonicación (min)	Frecuencia de muestreo (muestras/h)
Ca	0,0050	0,5	54
Zn	0,0100	0,5	70
Cu	0,0300	0,5	70
Fe	0,0300	0,5	70
Mg	0,0050	0,5	54

6. APLICACIÓN DE LAS METODOLOGÍAS PROPUESTAS:

Análisis de muestras reales de los diferentes tipos de matrices alimenticias estudiadas aplicando los sistemas FIA propuestos

Las metodologías propuestas se han aplicado a muestras reales de todos los tipos estudiados. Con dichas muestras se han realizado por una parte la determinación de los diferentes metales estudiados utilizando el método de referencia (descrito en la pág. 86), y por otra, el análisis de las mismas utilizando las metodologías propuestas. En todos los casos se han realizado los análisis por triplicado, con lo que los resultados se expresan como la media $\pm$ desviación estándar. Además, se calcularon los %eficacia en la extracción/recuperación obtenidos con los métodos propuestos con respecto al método de referencia. En todos los casos estos %eficacia en la extracción/recuperación son cuantitativos. También se aplicó el t-test de parejas a estos dos grupos de datos experimentales, y los resultados obtenidos indican que a un nivel de confianza del 95%, las diferencias entre ambos grupos de datos experimentales no son estadísticamente significativas, ya que en ningún caso el valor de la t calculada excede el valor de la t crítica. Así, las metodologías propuestas pueden ser aplicadas para la determinación de los diferentes metales estudiados en muestras reales de modo satisfactorio.

6.1 Aplicación del sistema continuo CUES/FAAS para la extracción y determinación de los metales en diferentes muestras sólidas reales de naturaleza alimenticia

6.1.1 Extracción y determinación de calcio

Extracción y determinación de calcio en muestras de moluscos y pescados

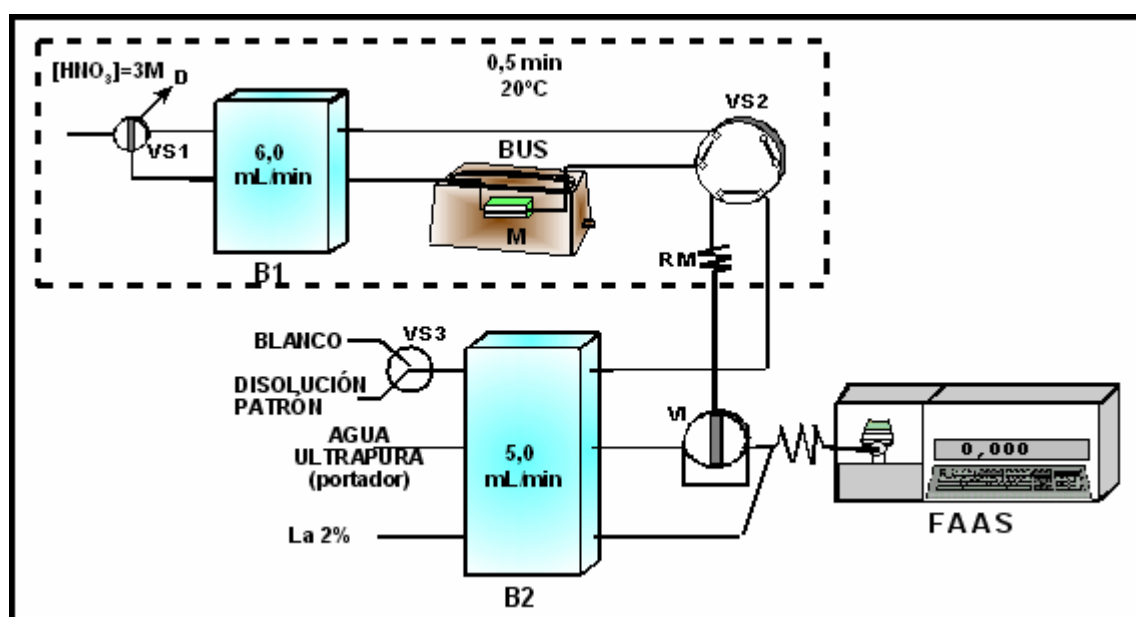


Figura 84. Sistema FIA utilizado para la determinación de calcio en moluscos y pescados indicando los valores óptimos de las variables implicadas en el proceso. B1 y B2, bombas peristálticas; BUS, baño de ultrasonidos; M, minicolumna; RM, reactor de mezcla; D, desecho; VS1, VS2 y VS3, válvulas de selección; VI, válvula de inyección y FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con llama.

Tabla 226. Características analíticas del método propuesto para la determinación de calcio en moluscos y pescados

Tipo de muestra	Cantidad de muestra (g)	LOD ($\mu\text{g/g}$)	LOQ ($\mu\text{g/g}$)	Sensibilidad para un 1% de absorción ($\mu\text{g/g}$)	Intervalo lineal ($\mu\text{g/g}$)
Moluscos y pescados	0,0100	30,0	120,0	120,0	120,0 - 5500,0
	0,0150	10,0	80,0	80,0	80 - 3666,7

Tabla 227. Resultados obtenidos en la determinación de calcio en muestras reales de moluscos y pescados. Aplicación del t-Test de parejas a los resultados obtenidos

Tipo de muestras	Muestras	[Ca] ($\mu\text{g/g}$, peso seco) ^a		(%)Eficacia en la extracción
		Método de referencia	Método propuesto	
Moluscos y Pescados	Mejillón 1	5487,4 $\pm$ 39,0	5468,9 $\pm$ 34,1	99,7
	Mejillón 2	3661,9 $\pm$ 39,0	3662,2 $\pm$ 34,1	100,0
	Mejillón 3	3234,3 $\pm$ 67,5	3249,0 $\pm$ 34,1	100,5
	Mejillón 4	4832,2 $\pm$ 39,0	4842,6 $\pm$ 34,1	100,2
	Mejillón 5	3414,4 $\pm$ 39,0	3426,1 $\pm$ 34,1	100,3
	Mejillón 6	3954,5 $\pm$ 39,0	3917,9 $\pm$ 34,1	99,1
	Mejillón 7	3796,9 $\pm$ 39,0	3799,9 $\pm$ 34,1	100,1
	Mejillón 8	4022,0 $\pm$ 39,0	4016,3 $\pm$ 34,1	99,9
	Mejillón 9	3391,9 $\pm$ 39,0	3386,7 $\pm$ 34,1	99,8
	Mejillón 10	4067,0 $\pm$ 39,0	4075,3 $\pm$ 34,1	100,2
	Atún	1546,4 $\pm$ 67,5	1576,7 $\pm$ 59,0	102,0
	Sardina	6767,6 $\pm$ 39,0 ^b	6731,3 $\pm$ 34,1	99,5
	Merluza	1749,0 $\pm$ 67,5	1753,8 $\pm$ 59,0	100,3
	Cangrejo	4472,1 $\pm$ 39,0	4449,1 $\pm$ 34,1	99,5
	Langostino	6857,6 $\pm$ 39,0	6849,3 $\pm$ 34,1	99,9
	Navajas	3459,4 $\pm$ 39,0	3445,8 $\pm$ 34,1	99,6
	Zamburiñas	2356,6 $\pm$ 67,5	2344,0 $\pm$ 59,0	99,5
	Berberechos	2626,7 $\pm$ 67,5	2619,4 $\pm$ 34,1	99,7
	Almeja1	4269,6 $\pm$ 39,0	4272,1 $\pm$ 34,1	100,1
	Almeja 2	3999,5 $\pm$ 39,0	3977,0 $\pm$ 34,1	99,4
t-test de parejas	$\bar{X}$ de las diferencias	σ de las diferencias	t _{calculada}	t _{crítica}
	5,2	17,0	1,36	2,09

a. [Ca] = Media $\pm$ desviación estándar (n=3)

b. Se utilizó 0,0050 g de muestra debido a la elevada concentración de calcio presente

Extracción y determinación de calcio en muestras de carne

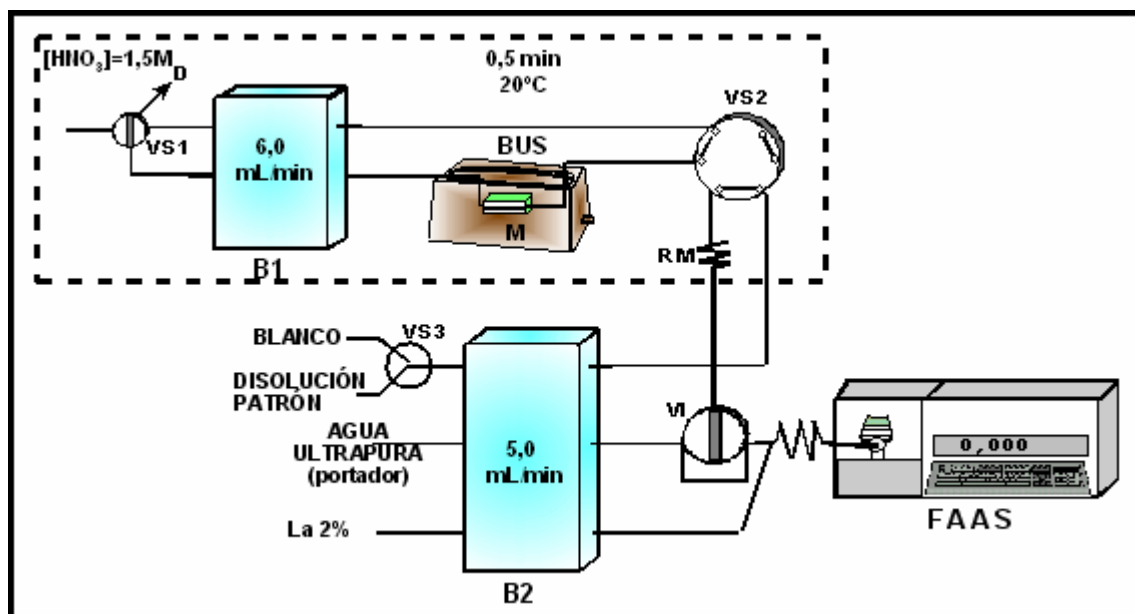


Figura 85. Sistema FIA utilizado para la determinación de calcio en muestras de carne indicando los valores óptimos de las variables implicadas en el proceso. B1 y B2, bombas peristálticas; BUS, baño de ultrasonidos; M, minicolumna; RM, reactor de mezcla; D, desecho; VS1, VS2 y VS3, válvulas de selección; VI, válvula de inyección y FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con llama.

Tabla 228. Características analíticas del método propuesto para la determinación de calcio en muestras de carne

Tipo de muestra	Cantidad de muestra (g)	LOD ($\mu g/g$)	LOQ ($\mu g/g$)	Sensibilidad para un 1% de absorción ($\mu g/g$)	Intervalo lineal ($\mu g/g$)
Carnes	0,0100	12,0	48,0	48,0	48,0 - 2200,0

Tabla 229. Resultados obtenidos en la determinación de calcio en muestras reales de carne. Aplicación del t-Test de parejas a los resultados obtenidos

Tipo de muestras	Muestras	[Ca] ($\mu\text{g/g}$, peso seco) ^a		(%)Eficacia en la extracción
		Método de referencia	Método propuesto	
Carnes	Riñones de cordero	611,3 $\pm$ 9,0	618,0 $\pm$ 6,8	101,1
	Hígado de conejo	410,2 $\pm$ 13,8	410,3 $\pm$ 11,8	100,0
	Pollo	1121,4 $\pm$ 13,8	1131,3 $\pm$ 6,8	100,9
	Ternera	863,3 $\pm$ 9,0	860,9 $\pm$ 6,8	99,7
	Cerdo	479,2 $\pm$ 13,8	469,1 $\pm$ 11,8	97,9
	Cordero	563,3 $\pm$ 13,8	563,1 $\pm$ 11,8	100,0
	Pavo	815,3 $\pm$ 5,2	821,7 $\pm$ 0,0	100,8
t-test de parejas	$\bar{X}$ de las diferencias	σ de las diferencias	t _{calculada}	t _{crítica}
	-1,46	6,8	0,57	2,45

a. [Ca] = Media $\pm$ desviación estándar (n=3)

Extracción y determinación de calcio en muestras de cereales y derivados

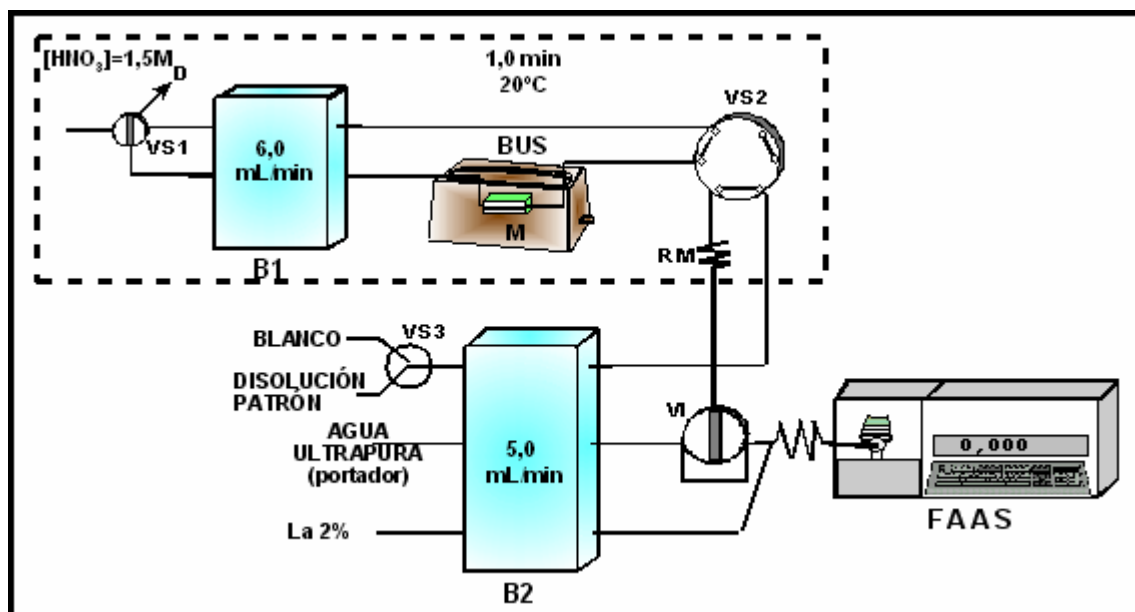


Figura 86. Sistema FIA utilizado para la determinación de calcio en muestras de cereales y derivados indicando los valores óptimos de las variables implicadas en el proceso. B1 y B2, bombas peristálticas; BUS, baño de ultrasonidos; M, minicolumna; RM, reactor de mezcla; D, desecho; VS1, VS2 y VS3, válvulas de selección; VI, válvula de inyección y FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con llama.

Tabla 230. Características analíticas del método propuesto para la determinación de calcio en cereales y derivados

Tipo de muestra	Cantidad de muestra (g)	LOD ($\mu\text{g/g}$)	LOQ ($\mu\text{g/g}$)	Sensibilidad para un 1% de absorción ($\mu\text{g/g}$)	Intervalo lineal ($\mu\text{g/g}$)
Cereales y derivados	0,0100	12,0	48,0	48,0	48,0 - 2200,0
	0,0200	6,0	24,0	24,0	24,0 - 1100,0
	0,0300	4,0	16,0	16,0	16,0 - 733,3

Tabla 231. Resultados obtenidos en la determinación de calcio en muestras reales de cereales y derivados. Aplicación del t-Test de parejas a los resultados obtenidos

Tipo de muestras	Muestras	[Ca] ($\mu\text{g/g}$, peso seco) ^a		(%)Eficacia en la extracción
		Método de referencia	Método propuesto	
Cereales y derivados	Harina de Trigo	479,7 $\pm$ 6,9	480,3 $\pm$ 2,3	100,1
	Sémola de Trigo	317,6 $\pm$ 6,9	317,0 $\pm$ 3,9	99,8
	Harina Integral	449,7 $\pm$ 4,5	445,0 $\pm$ 2,3	99,0
	Harina Fina de Maíz	128,6 $\pm$ 6,9	128,9 $\pm$ 3,9	100,3
	Pan Rallado	563,7 $\pm$ 6,9	566,5 $\pm$ 2,3	100,5
	Obleas de helado	491,7 $\pm$ 5,2	486,8 $\pm$ 2,3	99,0
	Arroz	232,1 $\pm$ 6,9	230,8 $\pm$ 3,9	99,4
	Galletas	443,7 $\pm$ 6,9	441,1 $\pm$ 2,3	99,4
	Fideos sopa	442,2 $\pm$ 9,4	437,2 $\pm$ 6,0	98,9
	Spaguetty	449,7 $\pm$ 4,5	446,3 $\pm$ 0,0	99,3
	Tallarín	460,2 $\pm$ 6,9	460,7 $\pm$ 2,3	100,1
	Cereales de desayuno	218,6 $\pm$ 9,4	223,0 $\pm$ 3,9	102,0
	Cereales con cacao	1183,1 $\pm$ 10,3	1178,3 $\pm$ 6,8	99,6
t-test de parejas	$\bar{X}$ de las diferencias	σ de las diferencias	t _{calculada}	t _{crítica}
	1,44	3,10	1,68	2,18

a. [Ca] = Media $\pm$ desviación estándar (n=3)

Extracción y determinación de calcio en muestras de frutos secos

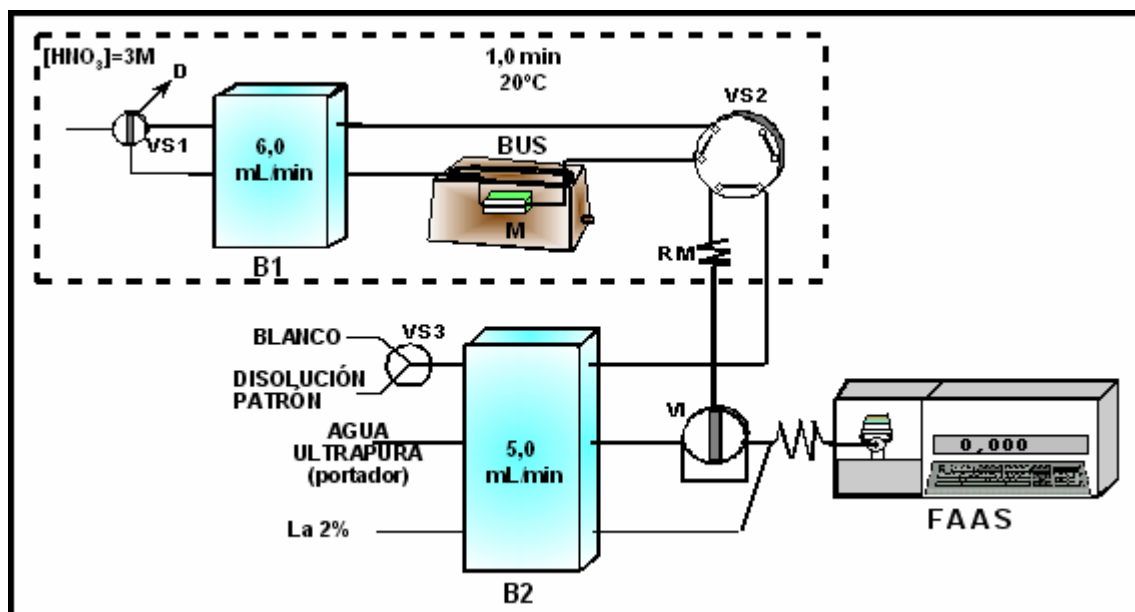


Figura 87. Sistema FIA utilizado para la determinación de calcio en muestras de frutos secos indicando los valores óptimos de las variables implicadas en el proceso. B1 y B2, bombas peristálticas; BUS, baño de ultrasonidos; M, minicolumna; RM, reactor de mezcla; D, desecho; VS1, VS2 y VS3, válvulas de selección; VI, válvula de inyección y FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con llama.

Tabla 232. Características analíticas del método propuesto para la determinación de calcio en frutos secos

Tipo de muestra	Cantidad de muestra (g)	LOD ($\mu\text{g/g}$)	LOQ ($\mu\text{g/g}$)	Sensibilidad para un 1% de absorción ($\mu\text{g/g}$)	Intervalo lineal ($\mu\text{g/g}$)
Frutos Secos	0,0100	12,0	48,0	48,0	48,0 - 2200,0
	0,0200	6,0	24,0	24,0	24,0 - 1100,0

Tabla 233. Resultados obtenidos en la determinación de calcio en muestras reales de frutos secos. Aplicación del t-Test de parejas a los resultados obtenidos

Tipo de muestras	Muestras	[Ca] ($\mu\text{g/g}$, peso seco) ^a		(% Eficacia en la extracción)
		Método de referencia	Método propuesto	
Frutos Secos	Castañas	831,4 $\pm$ 20,6	833,5 $\pm$ 11,8	100,2
	Pistachos	1416,5 $\pm$ 13,5	1409,5 $\pm$ 0,0	99,5
	Cacahuetes	813,4 $\pm$ 7,8	813,9 $\pm$ 6,8	100,1
	Nueces	1335,5 $\pm$ 13,5	1335,0 $\pm$ 6,8	100,0
	Almendras	1322,0 $\pm$ 13,5	1331,1 $\pm$ 6,8	100,7
	Avellanas	637,9 $\pm$ 20,6	633,6 $\pm$ 11,8	99,3
t-test de parejas	$\bar{X}$ de las diferencias	σ de las diferencias	t _{calculada}	t _{crítica}
	3,17x10 ⁻²	5,57	1,39x10 ⁻²	2,57

a. [Ca] = Media $\pm$ desviación estándar (n=3)

Extracción y determinación de calcio en muestras de legumbres

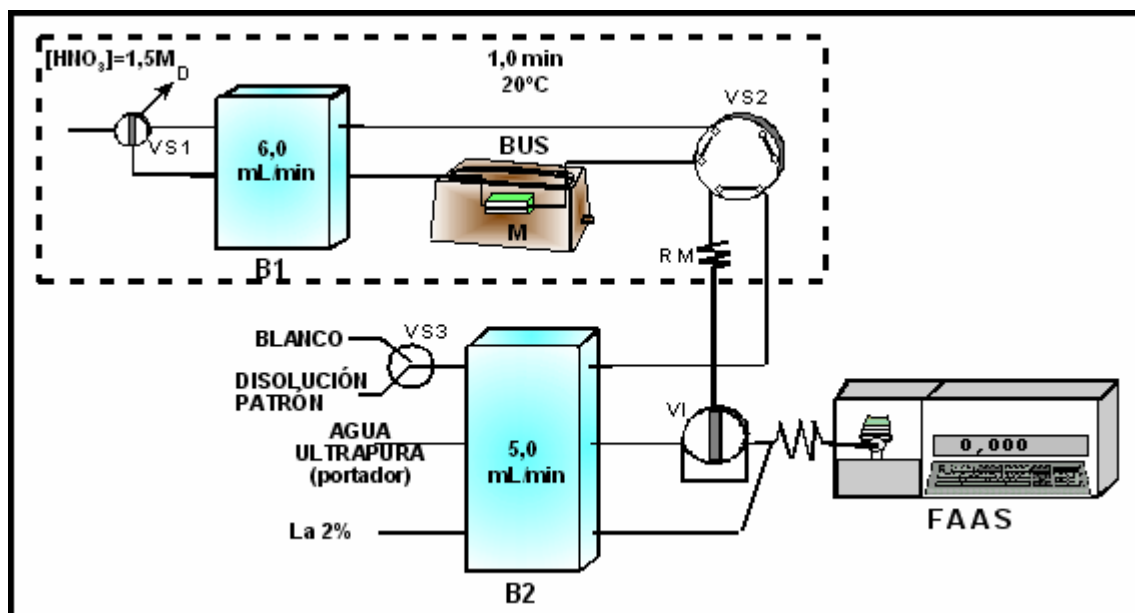


Figura 88. Sistema FIA utilizado para la determinación de calcio en muestras de legumbres indicando los valores óptimos de las variables implicadas en el proceso. B1 y B2, bombas peristálticas; BUS, baño de ultrasonidos; M, minicolumna; RM, reactor de mezcla; D, desecho; VS1, VS2 y VS3, válvulas de selección; VI, válvula de inyección y FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con llama.

Tabla 234. Características analíticas del método propuesto para la determinación de calcio en legumbres

Tipo de muestra	Cantidad de muestra (g)	LOD ($\mu\text{g/g}$)	LOQ ($\mu\text{g/g}$)	Sensibilidad para un 1% de absorción ($\mu\text{g/g}$)	Intervalo lineal ($\mu\text{g/g}$)
Legumbres	0,0100	12,0	48,0	48,0	48,0 - 2200,0
	0,0200	6,0	24,0	24,0	24,0 - 1100,0

Tabla 235. Resultados obtenidos en la determinación de calcio en muestras reales de legumbres. Aplicación del t-Test de parejas a los resultados obtenidos

Tipo de muestras	Muestras	[Ca] ($\mu\text{g/g}$, peso seco) ^a		(%)Eficacia en la extracción
		Método de referencia	Método propuesto	
Legumbres	Lentejas 1	1106,0 $\pm$ 13,5	1103,8 $\pm$ 0,0	99,8
	Lentejas 2	1070,0 $\pm$ 20,6	1076,4 $\pm$ 6,8	100,6
	Habas 1	858,4 $\pm$ 20,6	857,0 $\pm$ 11,8	99,8
	Habas 2	871,9 $\pm$ 20,6	868,7 $\pm$ 11,8	99,7
	Garbanzos 1	471,3 $\pm$ 13,5	476,9 $\pm$ 6,8	101,2
	Garbanzos 2	475,8 $\pm$ 20,6	480,8 $\pm$ 11,8	101,1
t-test de parejas	$\bar{X}$ de las diferencias	σ de las diferencias	t _{calculada}	t _{crítica}
	-1,72	4,40	0,96	2,57

a. [Ca] = Media $\pm$ desviación estándar (n=3)

Extracción y determinación de calcio en muestras de verduras, hortalizas y frutas

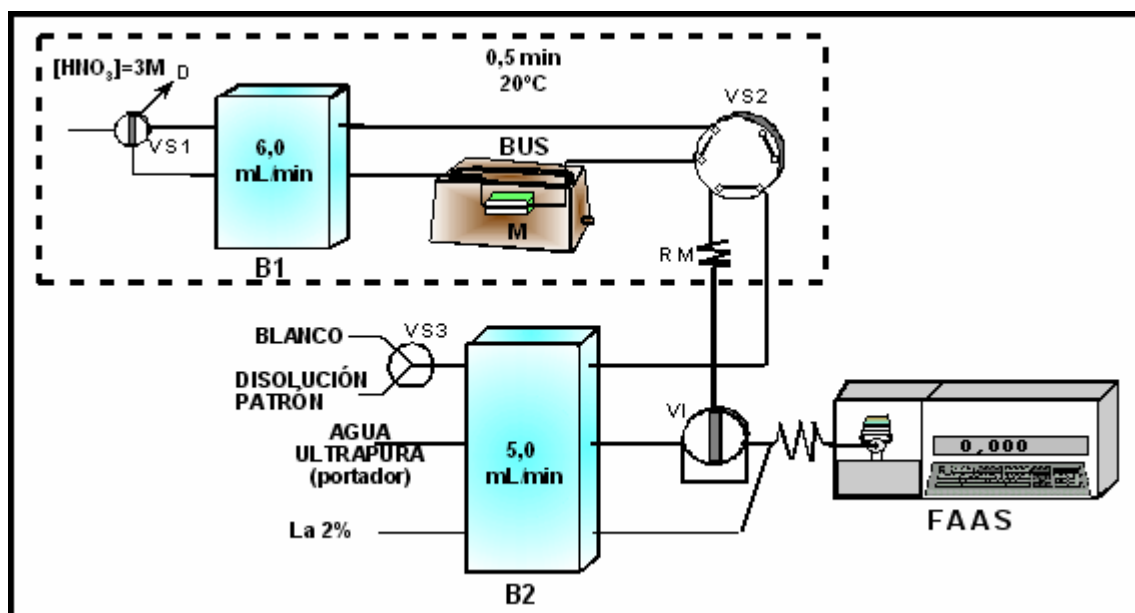


Figura 89. Sistema FIA utilizado para la determinación de calcio en muestras de verduras, hortalizas y frutas indicando los valores óptimos de las variables implicadas en el proceso. B1 y B2, bombas peristálticas; BUS, baño de ultrasonidos; M, minicolumna; RM, reactor de mezcla; D, desecho; VS1, VS2 y VS3, válvulas de selección; VI, válvula de inyección y FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con llama.

Tabla 236. Características analíticas del método propuesto para la determinación de calcio en verduras, hortalizas y frutas

Tipo de muestra	Cantidad de muestra (g)	LOD ($\mu\text{g/g}$)	LOQ ($\mu\text{g/g}$)	Sensibilidad para un 1% de absorción ($\mu\text{g/g}$)	Intervalo lineal ($\mu\text{g/g}$)
Verduras, Hortalizas y Frutas	0,0100	75,0	300,0	300,0	300,0 -13750,0

Tabla 237. Resultados obtenidos en la determinación de calcio en muestras reales de verduras, hortalizas y frutas. Aplicación del t-Test de parejas a los resultados obtenidos

Tipo de muestras	Muestras	[Ca] ($\mu\text{g/g}$, peso seco) ^a		(% Eficacia en la extracción)
		Método de referencia	Método propuesto	
Verduras, hortalizas y frutas	Acelga	10053 $\pm$ 68	10097 $\pm$ 40	100,4
	Repollo	9513 $\pm$ 68	9489 $\pm$ 40	99,7
	Lombarda	8703 $\pm$ 68	8694 $\pm$ 40	99,9
	Lechuga	9131 $\pm$ 103	9162 $\pm$ 70	100,3
	Grelo	11516 $\pm$ 103	11546 $\pm$ 70	100,3
	Tila	9378 $\pm$ 68	9395 $\pm$ 40	100,2
	Manzanilla	9648 $\pm$ 68	9629 $\pm$ 40	99,8
	Té 1	3909 $\pm$ 68	3878 $\pm$ 40	99,2
	Té 2 (Inglés)	9603 $\pm$ 103	9606 $\pm$ 40	100,0
	Té 3 (Rojo)	7960 $\pm$ 68	7876 $\pm$ 40	98,9
	Té 4	12304 $\pm$ 103	12411 $\pm$ 40	100,9
	Escaramujo	10706 $\pm$ 103	10775 $\pm$ 7	100,6
	Manzana	871 $\pm$ 68	908 $\pm$ 40	104,3
	Zanahoria	5597 $\pm$ 68	5561 $\pm$ 40	99,4
	Calabacín	4180 $\pm$ 68	4158 $\pm$ 40	99,5
	Pera	3032 $\pm$ 68	2943 $\pm$ 40	97,1
	Albaricoque	3369 $\pm$ 68	3387 $\pm$ 40	100,5
	Plátano	2627 $\pm$ 68	2639 $\pm$ 40	100,5
	Patata	1479 $\pm$ 68	1493 $\pm$ 40	101,0
t-test de parejas	$\bar{X}$ de las diferencias	σ de las diferencias	t _{calculada}	t _{crítica}
	-3,49	47,79	0,32	2,10

a. [Ca] = Media $\pm$ desviación estándar (n=3)

6.1.2 Extracción y determinación de cinc

Extracción y determinación de cinc en muestras de moluscos y pescados

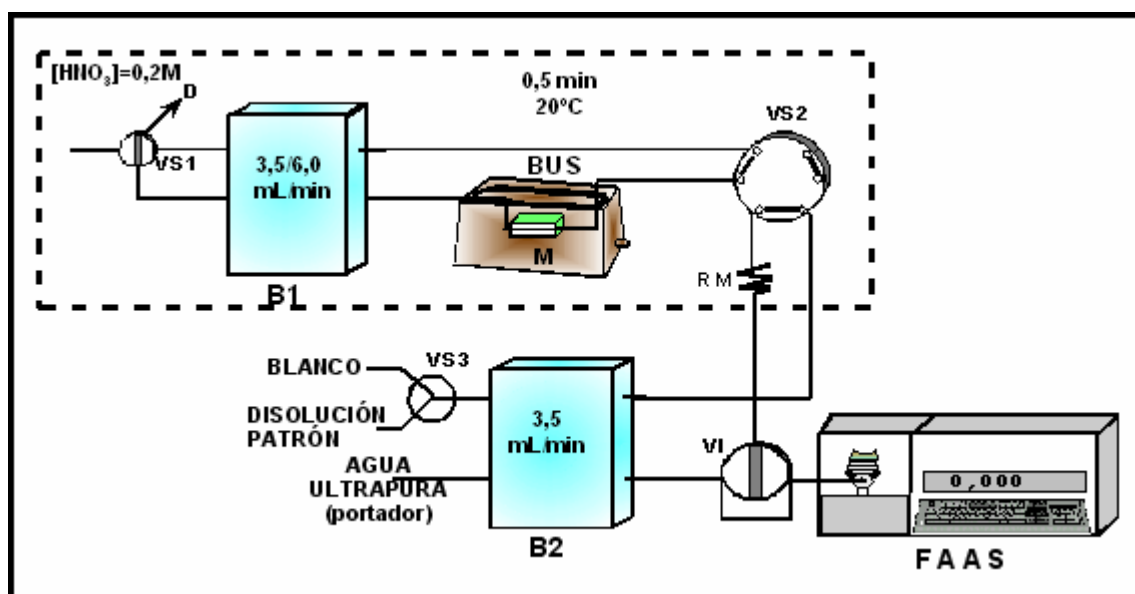


Figura 90. Sistema FIA utilizado para la determinación de cinc en muestras de moluscos y pescados indicando los valores óptimos de las variables implicadas en el proceso. B1 y B2, bombas peristálticas; BUS, baño de ultrasonidos; M, minicolumna; RM, reactor de mezcla; D, desecho; VS1, VS2 y VS3, válvulas de selección; VI, válvula de inyección y FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con llama.

Tabla 238. Características analíticas del método propuesto para la determinación de cinc en moluscos y pescados

Tipo de muestra	Cantidad de muestra (g)	LOD ($\mu\text{g/g}$)	LOQ ($\mu\text{g/g}$)	Sensibilidad para un 1% de absorción ($\mu\text{g/g}$)	Intervalo lineal ($\mu\text{g/g}$)
Moluscos y pescados	0,0050	0,8	4,0	4,0	4,0 – 220,0

Tabla 239. Resultados obtenidos en la determinación de cinc en muestras reales de moluscos y pescados. Aplicación del t-Test de parejas a los resultados obtenidos

Tipo de muestras	Muestras	[Zn] ($\mu\text{g/g}$, peso seco) ^a		(%)Eficacia en la extracción
		Método de referencia	Método propuesto	
Moluscos y Pescados	Mejillón 1	139,7 $\pm$ 0,6	140,6 $\pm$ 0,6	100,7
	Mejillón 2	141,5 $\pm$ 1,1	141,3 $\pm$ 0,6	99,8
	Mejillón 3	219,0 $\pm$ 0,6	218,7 $\pm$ 0,6	99,9
	Mejillón 4	188,9 $\pm$ 0,6	189,0 $\pm$ 0,6	100,1
	Mejillón 5	188,5 $\pm$ 0,6	188,4 $\pm$ 0,6	99,9
	Mejillón 6	131,7 $\pm$ 1,1	131,1 $\pm$ 0,6	99,5
	Mejillón 7	216,8 $\pm$ 0,6	217,1 $\pm$ 0,6	100,1
	Mejillón 8	215,0 $\pm$ 0,6	215,2 $\pm$ 0,6	100,1
	Mejillón 9	201,6 $\pm$ 0,6	202,4 $\pm$ 0,6	100,4
	Mejillón 10	217,2 $\pm$ 0,6	217,7 $\pm$ 0,6	100,3
	Atún	100,2 $\pm$ 1,1	100,5 $\pm$ 0,6	100,3
	Sardina	127,0 $\pm$ 0,6	127,2 $\pm$ 0,6	100,2
	Merluza	78,5 $\pm$ 1,1	78,2 $\pm$ 0,6	99,6
	Cangrejo	60,0 $\pm$ 1,1	59,7 $\pm$ 1,0	99,5
	Langostino	125,9 $\pm$ 0,6	125,3 $\pm$ 0,6	99,5
	Navajas	109,6 $\pm$ 0,6	109,7 $\pm$ 0,6	100,1
	Zamburiñas	170,4 $\pm$ 0,6	170,2 $\pm$ 0,6	99,9
	Berberechos	145,8 $\pm$ 1,1	146,0 $\pm$ 0,6	100,1
	Almeja 1	199,4 $\pm$ 0,6	199,5 $\pm$ 0,6	100,1
	Almeja 2	193,3 $\pm$ 0,6	192,9 $\pm$ 0,6	99,8
t-test de parejas	$\bar{X}$ de las diferencias	σ de las diferencias	t _{calculada}	t _{crítica}
	-3,50x10 ⁻²	0,41	0,38	2,09

a. [Zn] = Media $\pm$ desviación estándar (n=3)

Extracción y determinación de cinc en muestras de carne

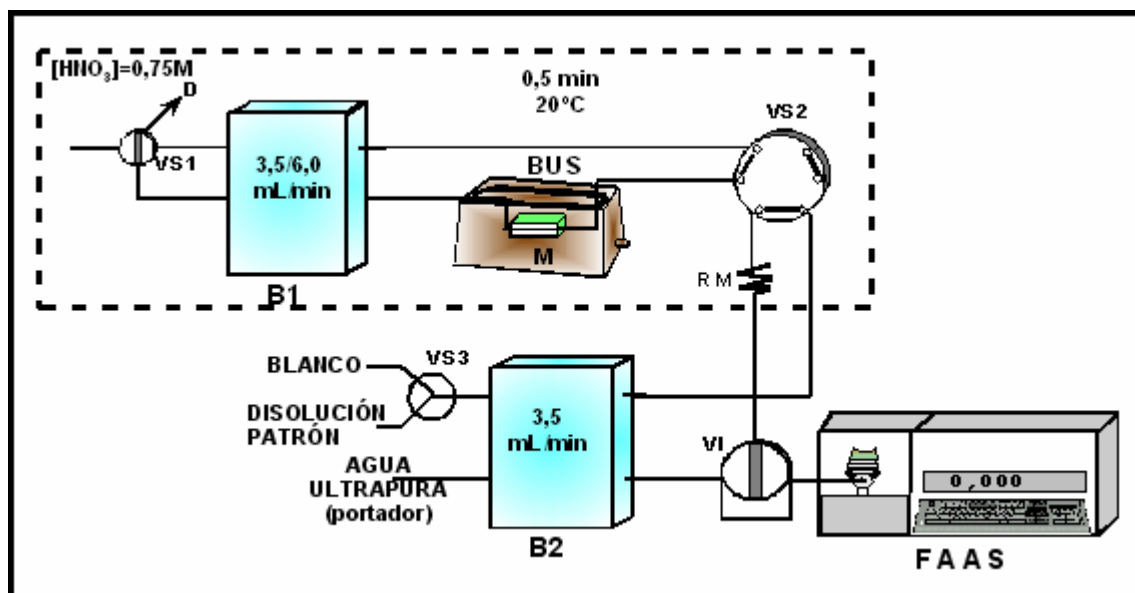


Figura 91. Sistema FIA utilizado para la determinación de cinc en muestras de carne indicando los valores óptimos de las variables implicadas en el proceso. B1 y B2, bombas peristálticas; BUS, baño de ultrasonidos; M, minicolumna; RM, reactor de mezcla; D, desecho; VS1, VS2 y VS3, válvulas de selección; VI, válvula de inyección y FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con llama.

Tabla 240. Características analíticas del método propuesto para la determinación de cinc en muestras de carne

Tipo de muestra	Cantidad de muestra (g)	LOD ($\mu\text{g/g}$)	LOQ ($\mu\text{g/g}$)	Sensibilidad para un 1% de absorción ($\mu\text{g/g}$)	Intervalo lineal ($\mu\text{g/g}$)
Carne	0,0050	0,8	4,0	4,0	4,0 – 220,0

Tabla 241. Resultados obtenidos en la determinación de cinc en muestras reales de carne. Aplicación del t-Test de parejas a los resultados obtenidos

Tipo de muestras	Muestras	[Zn] ($\mu\text{g/g}$, peso seco) ^a		(%)Eficacia en la extracción
		Método de referencia	Método propuesto	
Carnes	Riñones de cordero	102,8 $\pm$ 0,9	103,0 $\pm$ 0,6	100,3
	Hígado de conejo	163,6 $\pm$ 0,9	164,2 $\pm$ 0,6	100,4
	Pollo	58,4 $\pm$ 1,7	58,7 $\pm$ 1,0	100,5
	Ternera	156,6 $\pm$ 0,9	156,5 $\pm$ 0,6	99,9
	Cerdo	94,4 $\pm$ 1,3	94,1 $\pm$ 1,0	99,7
	Cordero	195,7 $\pm$ 0,9	195,7 $\pm$ 0,6	100,0
	Pavo	76,4 $\pm$ 1,3	76,9 $\pm$ 1,0	100,7
t-test de parejas	$\bar{X}$ de las diferencias	σ de las diferencias	t _{calculada}	t _{crítica}
	- 0,20	0,32	1,62	2,45

a. [Zn] = Media $\pm$ desviación estándar (n=3)

Extracción y determinación de cinc en muestras de cereales y derivados

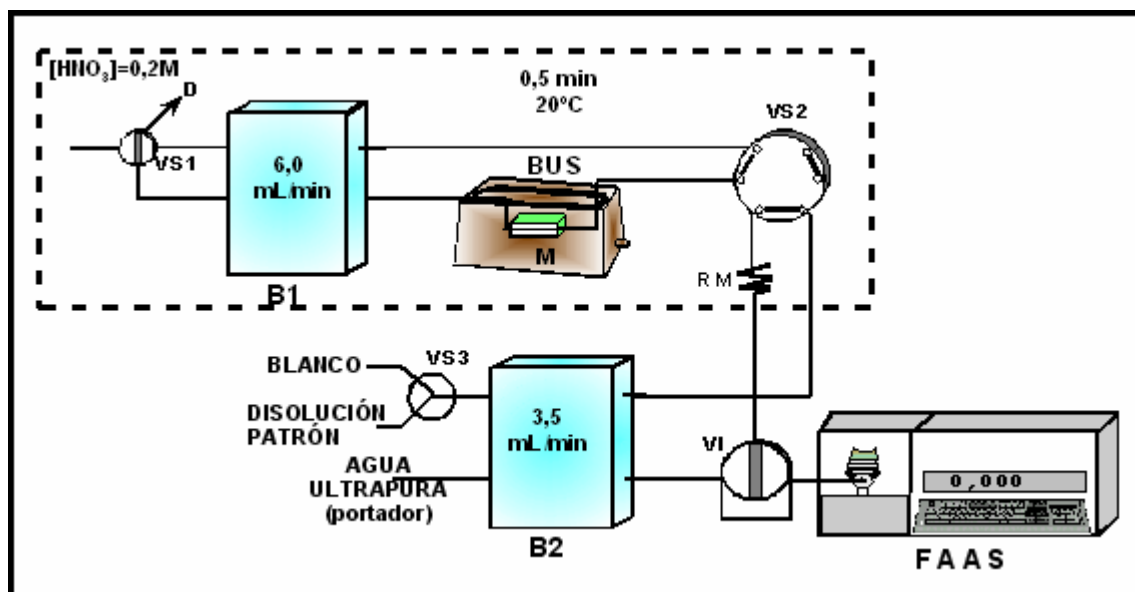


Figura 92. Sistema FIA utilizado para la determinación de cinc en muestras de cereales y derivados indicando los valores óptimos de las variables implicadas en el proceso. B1 y B2, bombas peristálticas; BUS, baño de ultrasonidos; M, minicolumna; RM, reactor de mezcla; D, desecho; VS1, VS2 y VS3, válvulas de selección; VI, válvula de inyección y FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con llama.

Tabla 242. Características analíticas del método propuesto para la determinación de cinc en muestras de cereales y derivados

Tipo de muestra	Cantidad de muestra (g)	LOD ($\mu\text{g/g}$)	LOQ ($\mu\text{g/g}$)	Sensibilidad para un 1% de absorción ($\mu\text{g/g}$)	Intervalo lineal ($\mu\text{g/g}$)
Cereales y derivados	0,0100	0,4	2,0	2,0	2,0 – 110,0
	0,0200	0,2	1,0	1,0	1,0 – 55,0
	0,0300	0,1	0,7	0,7	0,7 – 36,7

Tabla 243. Resultados obtenidos en la determinación de cinc en muestras reales de cereales y derivados. Aplicación del t-Test de parejas a los resultados obtenidos

Tipo de muestras	Muestras	[Zn] ($\mu\text{g/g}$, peso seco) ^a		(%)Eficacia en la extracción
		Método de referencia	Método propuesto	
Cereales y derivados	Harina de Trigo	9,5 $\pm$ 0,2	9,6 $\pm$ 0,2	100,9
	Sémola de Trigo	12,4 $\pm$ 0,3	12,4 $\pm$ 0,1	100,0
	Harina Integral	18,5 $\pm$ 0,2	18,5 $\pm$ 0,1	100,1
	Harina Fina de Maiz	2,3 $\pm$ 0,3	2,4 $\pm$ 0,2	102,4
	Pan Rallado	11,8 $\pm$ 0,3	11,7 $\pm$ 0,2	99,5
	Obleas de helado	9,8 $\pm$ 0,2	9,8 $\pm$ 0,2	99,6
	Arroz	16,4 $\pm$ 0,2	16,4 $\pm$ 0,1	100,1
	Galletas	6,6 $\pm$ 0,3	6,6 $\pm$ 0,1	99,3
	Fideos sopa	13,6 $\pm$ 0,3	13,6 $\pm$ 0,2	99,7
	Spaguetty	13,7 $\pm$ 0,2	13,6 $\pm$ 0,0	99,4
	Tallarín	13,6 $\pm$ 0,2	13,5 $\pm$ 0,1	99,3
	Cereales de desayuno	3,4 $\pm$ 0,4	3,5 $\pm$ 0,2	101,7
	Cereales con cacao	19,9 $\pm$ 0,3	19,8 $\pm$ 0,1	99,5
t-test de parejas	$\bar{X}$ de las diferencias	σ de las diferencias	t _{calculada}	t _{crítica}
	1,92x10 ⁻²	6,42x10 ⁻²	1,08	2,18

a. [Zn] = Media $\pm$ desviación estándar (n=3)

Extracción y determinación de cinc en muestras de frutos secos

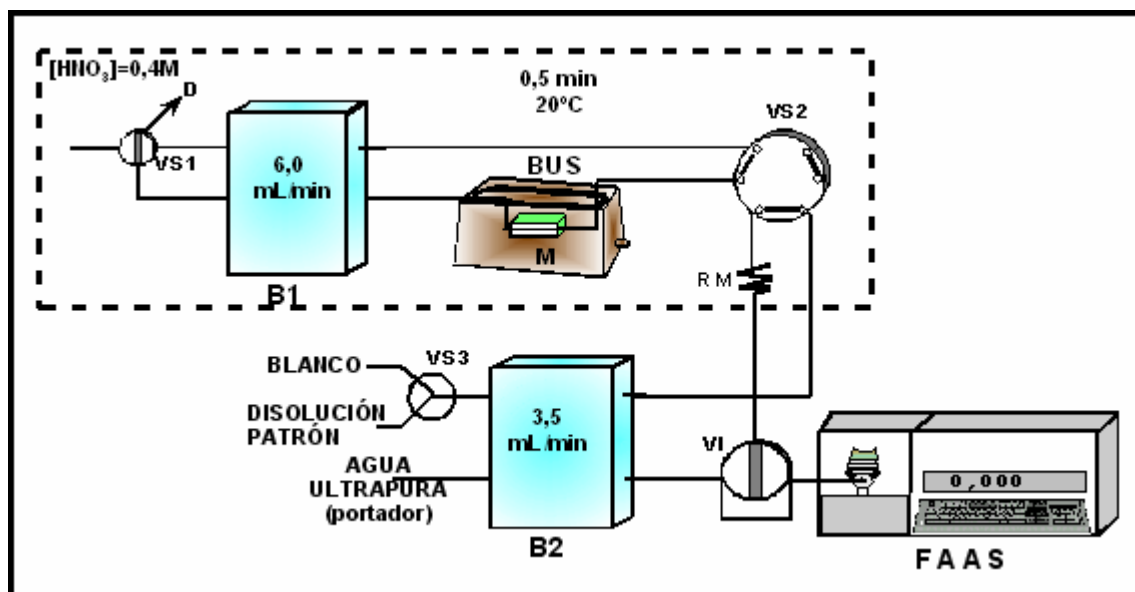


Figura 93. Sistema FIA utilizado para la determinación de cinc en muestras de frutos secos indicando los valores óptimos de las variables implicadas en el proceso. B1 y B2, bombas peristálticas; BUS, baño de ultrasonidos; M, minicolumna; RM, reactor de mezcla; D, desecho; VS1, VS2 y VS3, válvulas de selección; VI, válvula de inyección y FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con llama.

Tabla 244. Características analíticas del método propuesto para la determinación de cinc en muestras de frutos secos

Tipo de muestra	Cantidad de muestra (g)	LOD ($\mu\text{g/g}$)	LOQ ($\mu\text{g/g}$)	Sensibilidad para un 1% de absorción ($\mu\text{g/g}$)	Intervalo lineal ($\mu\text{g/g}$)
Frutos Secos	0,0100	0,4	2,0	2,0	2,0 – 110,0
	0,0200	0,2	1,0	1,0	1,0 – 55,0
	0,0300	0,1	0,7	0,7	0,7 – 36,7

Tabla 245. Resultados obtenidos en la determinación de cinc en muestras reales de frutos secos. Aplicación del t-Test de parejas a los resultados obtenidos

Tipo de muestras	Muestras	[Zn] ($\mu\text{g/g}$, peso seco) ^a		)(%)Eficacia en la extracción
		Método de referencia	Método propuesto	
Frutos Secos	Castañas	22,4 $\pm$ 0,7	22,8 $\pm$ 0,3	101,94
	Pistachos	24,4 $\pm$ 0,9	24,3 $\pm$ 0,3	99,35
	Cacahuètes	33,6 $\pm$ 0,4	34,0 $\pm$ 0,3	101,29
	Nueces	33,6 $\pm$ 0,9	33,7 $\pm$ 0,5	100,34
	Almendras	87,4 $\pm$ 0,9	87,2 $\pm$ 0,5	99,71
	Avellanas	55,9 $\pm$ 0,7	56,3 $\pm$ 0,3	100,76
t-test de parejas	$\bar{X}$ de las diferencias	σ de las diferencias	t _{calculada}	t _{crítica}
	-0,16	0,31	1,28	2,57

a. [Zn] = Media $\pm$ desviación estándar (n=3)

Extracción y determinación de cinc en muestras de legumbres

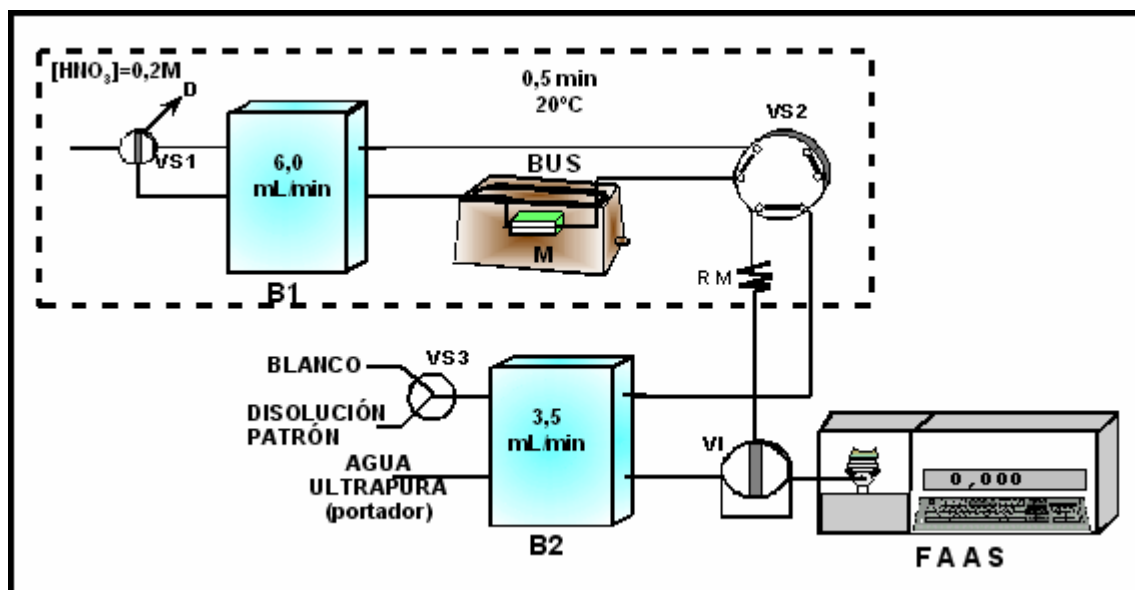


Figura 94. Sistema FIA utilizado para la determinación de cinc en muestras de legumbres indicando los valores óptimos de las variables implicadas en el proceso. B1 y B2, bombas peristálticas; BUS, baño de ultrasonidos; M, minicolumna; RM, reactor de mezcla; D, desecho; VS1, VS2 y VS3, válvulas de selección; VI, válvula de inyección y FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con llama.

Tabla 246. Características analíticas del método propuesto para la determinación de cinc en muestras de legumbres

Tipo de muestra	Cantidad de muestra (g)	LOD ($\mu\text{g/g}$)	LOQ ($\mu\text{g/g}$)	Sensibilidad para un 1% de absorción ($\mu\text{g/g}$)	Intervalo lineal ($\mu\text{g/g}$)
Frutos Secos	0,0100	0,4	2,0	2,0	2,0 – 110,0
	0,0200	0,2	1,0	1,0	1,0 – 55,0

Tabla 247. Resultados obtenidos en la determinación de cinc en muestras reales de legumbres. Aplicación del t-Test de parejas a los resultados obtenidos

Tipo de muestras	Muestras	[Zn] ($\mu\text{g/g}$, peso seco) ^a		(% Eficacia en la extracción)
		Método de referencia	Método propuesto	
Legumbres	Lentejas 1	43,6 $\pm$ 0,9	44,3 $\pm$ 0,3	101,8
	Lentejas 2	43,8 $\pm$ 0,9	44,0 $\pm$ 0,3	100,4
	Habas 1	35,2 $\pm$ 0,9	35,3 $\pm$ 0,3	100,3
	Habas 2	36,2 $\pm$ 0,9	36,1 $\pm$ 0,5	99,7
	Garbanzos 1	27,6 $\pm$ 0,7	27,9 $\pm$ 0,5	101,2
	Garbanzos 2	33,7 $\pm$ 0,7	33,5 $\pm$ 0,3	99,4
t-test de parejas	$\bar{X}$ de las diferencias	σ de las diferencias	t _{calculada}	t _{crítica}
	- 0,16	0,37	0,18	2,57

a. [Zn] = Media $\pm$ desviación estándar (n=3)

Extracción y determinación de cinc en muestras de verduras, hortalizas y frutas

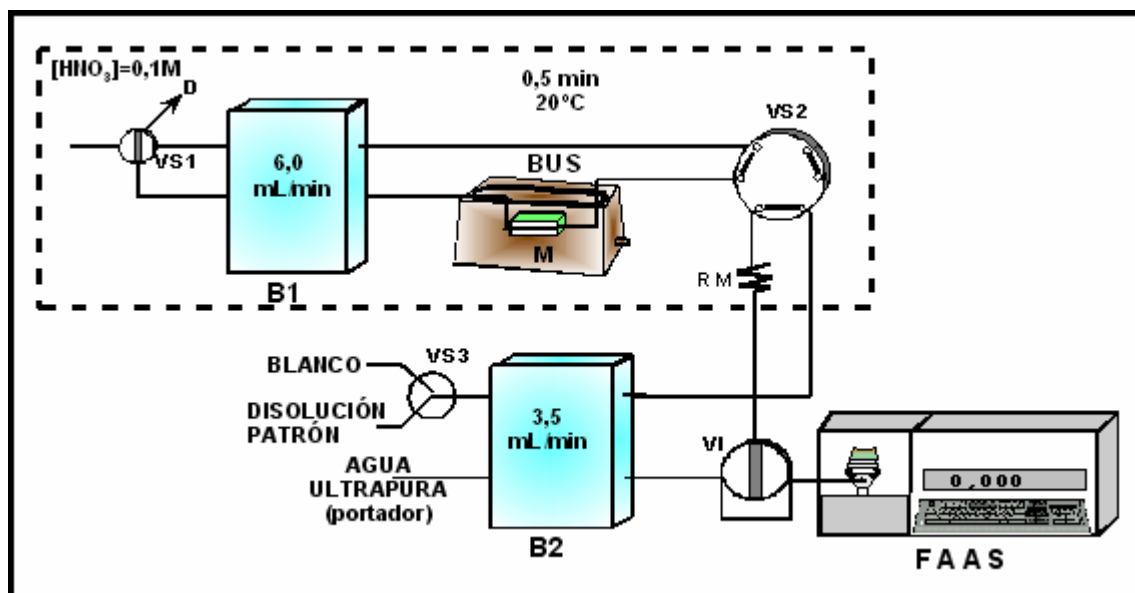


Figura 95. Sistema FIA utilizado para la determinación de cinc en muestras de verduras, hortalizas y frutas indicando los valores óptimos de las variables implicadas en el proceso. B1 y B2, bombas peristálticas; BUS, baño de ultrasonidos; M, minicolumna; RM, reactor de mezcla; D, desecho; VS1, VS2 y VS3, válvulas de selección; VI, válvula de inyección y FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con llama.

Tabla 248. Características analíticas del método propuesto para la determinación de cinc en muestras de verduras, hortalizas y frutas

Tipo de muestra	Cantidad de muestra (g)	LOD ($\mu\text{g/g}$)	LOQ ($\mu\text{g/g}$)	Sensibilidad para un 1% de absorción ($\mu\text{g/g}$)	Intervalo lineal ($\mu\text{g/g}$)
Verduras, hortalizas y frutas	0,0100	0,4	2,0	2,0	2,0 – 110,0

Tabla 249. Resultados obtenidos en la determinación de cinc en muestras reales de verduras, hortalizas y frutas. Aplicación del t-Test de parejas a los resultados obtenidos

Tipo de muestras	Muestras	[Zn] ($\mu\text{g/g}$, peso seco) ^a		(%)Eficacia en la extracción
		Método de referencia	Método propuesto	
Verduras, hortalizas y frutas	Acelga ^b	806,3 $\pm$ 6,6	800,2 $\pm$ 4,8	99,2
	Repollo ^c	444,4 $\pm$ 3,3	444,7 $\pm$ 3,6	100,1
	Lombarda	39,1 $\pm$ 0,7	39,1 $\pm$ 0,3	100,1
	Lechuga ^c	399,5 $\pm$ 3,3	399,3 $\pm$ 2,8	99,9
	Grelo ^d	267,3 $\pm$ 2,2	266,7 $\pm$ 1,6	99,8
	Tila	38,5 $\pm$ 0,7	38,0 $\pm$ 0,5	98,7
	Manzanilla	29,7 $\pm$ 0,4	29,1 $\pm$ 0,3	98,0
	Té 1	38,6 $\pm$ 0,7	39,1 $\pm$ 0,3	101,2
	Té 2 (Inglés)	3,1 $\pm$ 0,4	3,3 $\pm$ 0,3	103,5
	Té 3 (Rojo)	19,4 $\pm$ 0,7	19,3 $\pm$ 0,5	99,9
	Té 4	10,7 $\pm$ 0,7	10,6 $\pm$ 0,3	99,1
	Escaramujo	7,3 $\pm$ 0,5	7,2 $\pm$ 0,3	98,5
	Manzana	7,6 $\pm$ 0,7	7,6 $\pm$ 0,3	98,9
	Zanahoria	14,7 $\pm$ 0,7	14,6 $\pm$ 0,5	98,8
	Calabacín	52,0 $\pm$ 0,7	52,8 $\pm$ 0,5	101,6
	Pera	12,8 $\pm$ 0,7	12,8 $\pm$ 0,3	99,7
	Albaricoque	14,9 $\pm$ 0,4	14,9 $\pm$ 0,3	100,0
	Plátano	9,5 $\pm$ 0,7	9,6 $\pm$ 0,3	101,1
	Patata	21,4 $\pm$ 0,4	21,1 $\pm$ 0,3	98,6
t-test de parejas	$\bar{X}$ de las diferencias	σ de las diferencias	t _{calculada}	t _{crítica}
	0,37	1,43	1,14	2,10

a. [Zn] = Media $\pm$ desviación estándar (n=3)

b. Se utilizó 0,0010 g de muestra debido a la elevada concentración de Zn presente

c. Se utilizó 0,0020 g de muestra debido a la elevada concentración de Zn presente

d. Se utilizó 0,0030 g de muestra debido a la elevada concentración de Zn presente

6.1.3 Extracción y determinación de cobre

Extracción y determinación de cobre en muestras de moluscos y pescados

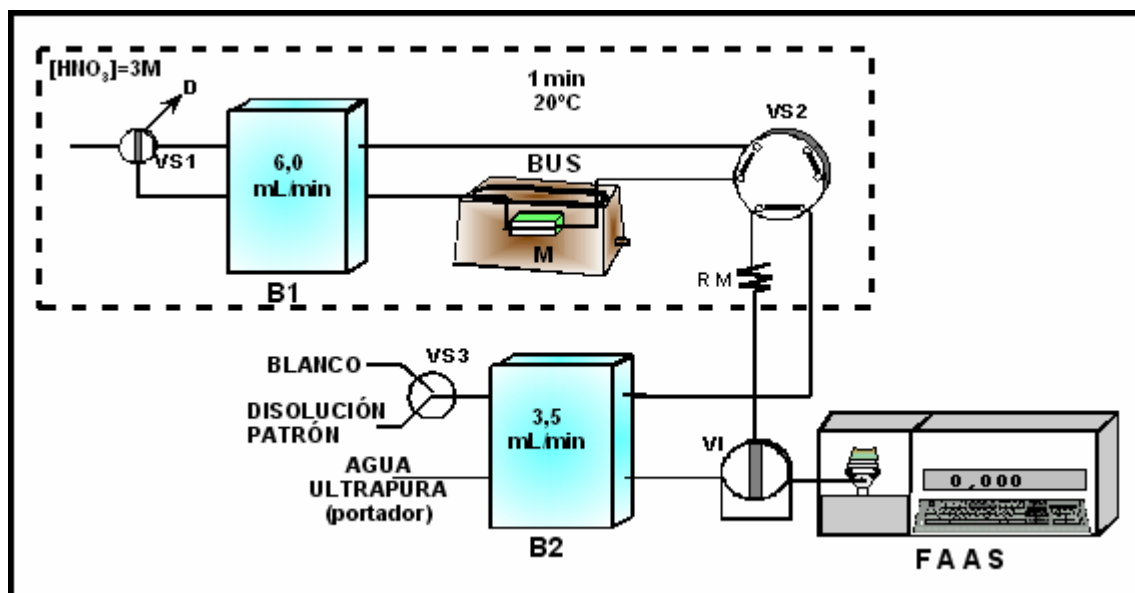


Figura 96. Sistema FIA utilizado para la determinación de cobre en moluscos y pescados indicando los valores óptimos de las variables implicadas en el proceso. B1 y B2, bombas peristálticas; BUS, baño de ultrasonidos; M, minicolumna; RM, reactor de mezcla; D, desecho; VS1, VS2 y VS3, válvulas de selección; VI, válvula de inyección y FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con llama.

Tabla 250. Características analíticas del método propuesto para la determinación de cobre en moluscos y pescados

Tipo de muestra	Cantidad de muestra (g)	LOD ($\mu\text{g/g}$)	LOQ ($\mu\text{g/g}$)	Sensibilidad para un 1% de absorción ($\mu\text{g/g}$)	Intervalo lineal ($\mu\text{g/g}$)
Moluscos y pescados	0,0100	1,0	8,0	8,0	8,0 – 540,0
	0,0200	0,5	4,0	4,0	4,0 – 27,0
	0,0300	0,3	2,7	2,7	2,7 – 180,0

Tabla 251. Resultados obtenidos en la determinación de cobre en muestras reales de moluscos y pescados. Aplicación del t-Test de parejas a los resultados obtenidos

Tipo de muestras	Muestras	[Cu] ($\mu\text{g/g}$, peso seco) ^a		(%)Eficacia en la extracción
		Método de referencia	Método propuesto	
Moluscos y Pescados	Mejillón 1	13,6 $\pm$ 0,7	13,8 $\pm$ 0,5	101,2
	Mejillón 2	12,9 $\pm$ 0,7	12,8 $\pm$ 0,5	99,2
	Mejillón 3	13,4 $\pm$ 0,4	13,1 $\pm$ 0,5	98,2
	Mejillón 4	10,9 $\pm$ 0,7	11,3 $\pm$ 0,5	102,9
	Mejillón 5	13,1 $\pm$ 0,4	13,1 $\pm$ 0,5	99,9
	Mejillón 6	11,2 $\pm$ 0,4	11,6 $\pm$ 0,0	103,6
	Mejillón 7	16,2 $\pm$ 0,7	15,9 $\pm$ 0,5	98,2
	Mejillón 8	18,2 $\pm$ 0,7	18,8 $\pm$ 0,5	102,9
	Mejillón 9	13,6 $\pm$ 0,7	13,1 $\pm$ 0,5	96,6
	Mejillón 10	14,0 $\pm$ 0,4	14,4 $\pm$ 0,0	102,5
	Atún	10,9 $\pm$ 0,7	11,3 $\pm$ 0,5	102,9
	Sardina	12,3 $\pm$ 0,7	12,2 $\pm$ 0,5	99,4
	Merluza	5,9 $\pm$ 0,4	5,9 $\pm$ 0,0	101,3
	Cangrejo	6,3 $\pm$ 0,7	6,3 $\pm$ 0,5	99,2
	Langostino	9,0 $\pm$ 0,7	9,4 $\pm$ 0,5	104,7
	Navajas	7,0 $\pm$ 0,7	6,9 $\pm$ 0,0	98,7
	Zamburiñas	10,3 $\pm$ 0,7	10,3 $\pm$ 0,5	100,4
	Berberechos	8,3 $\pm$ 0,7	8,4 $\pm$ 0,5	101,8
	Almeja 1	10,9 $\pm$ 0,7	10,9 $\pm$ 0,5	100,0
	Almeja 2	12,9 $\pm$ 0,7	13,1 $\pm$ 0,5	101,6
t-test de parejas	$\bar{X}$ de las diferencias	σ de las diferencias	t _{calculada}	t _{crítica}
	8,30x10 ⁻²	0,26	1,41	2,09

a. [Cu] = Media $\pm$ desviación estándar (n=3)

Extracción y determinación de cobre en muestras de carne

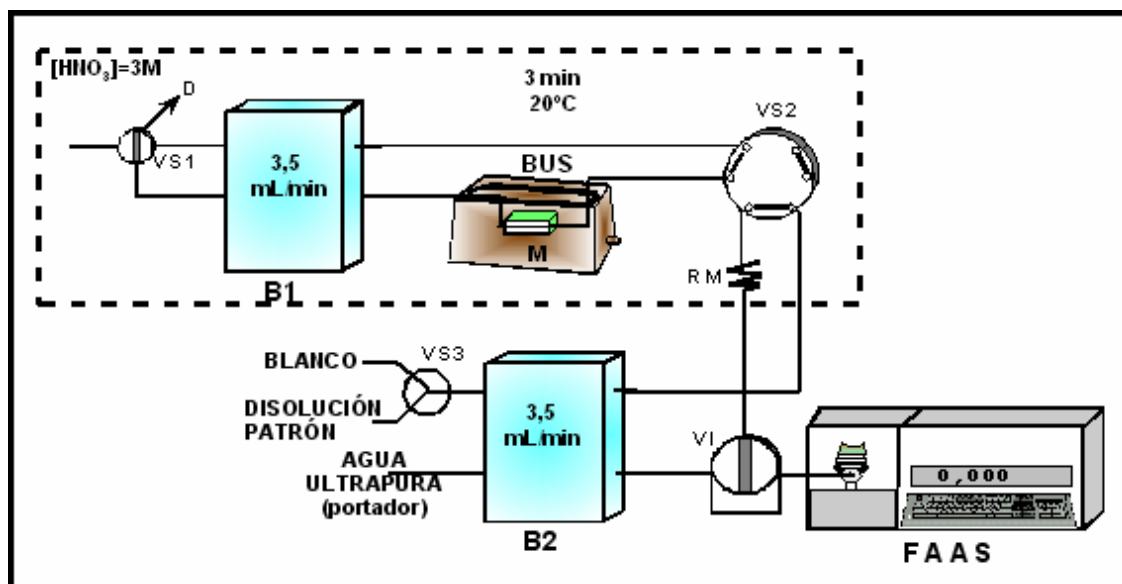


Figura 97. Sistema FIA utilizado para la determinación de cobre en muestras de carne indicando los valores óptimos de las variables implicadas en el proceso. B1 y B2, bombas peristálticas; BUS, baño de ultrasonidos; M, minicolumna; RM, reactor de mezcla; D, desecho; VS1, VS2 y VS3, válvulas de selección; VI, válvula de inyección y FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con llama.

Tabla 252. Características analíticas del método propuesto para la determinación de cobre en muestras de carne

Tipo de muestra	Cantidad de muestra (g)	LOD ($\mu\text{g/g}$)	LOQ ($\mu\text{g/g}$)	Sensibilidad para un 1% de absorción ($\mu\text{g/g}$)	Intervalo lineal ($\mu\text{g/g}$)
Carne	0,0300	0,3	2,7	2,7	2,7 – 180,0

Tabla 253. Resultados obtenidos en la determinación de cobre en muestras reales de carne. Aplicación del t-Test de parejas a los resultados obtenidos

Tipo de muestras	Muestras	[Cu] ($\mu\text{g/g}$, peso seco) ^a		(%)Eficacia en la extracción
		Método de referencia	Método propuesto	
Carnes	Riñones de cordero	14,5 $\pm$ 0,4	14,7 $\pm$ 0,0	101,4
	Hígado de conejo	12,3 $\pm$ 0,7	12,3 $\pm$ 0,4	100,0
	Pollo	2,8 $\pm$ 0,7	2,7 $\pm$ 0,4	99,0
	Ternera	5,4 $\pm$ 0,7	5,4 $\pm$ 0,4	99,5
	Cerdo	4,1 $\pm$ 0,7	4,2 $\pm$ 0,4	102,3
	Cordero	4,8 $\pm$ 0,7	4,7 $\pm$ 0,4	98,1
	Pavo	4,8 $\pm$ 0,7	4,9 $\pm$ 0,4	103,2
t-test de parejas	$\bar{X}$ de las diferencias	σ de las diferencias	t _{calculada}	t _{crítica}
	-0,04	0,11	1,10	2,45

a. [Cu] = Media $\pm$ desviación estándar (n=3)

Extracción y determinación de cobre en muestras de cereales y derivados

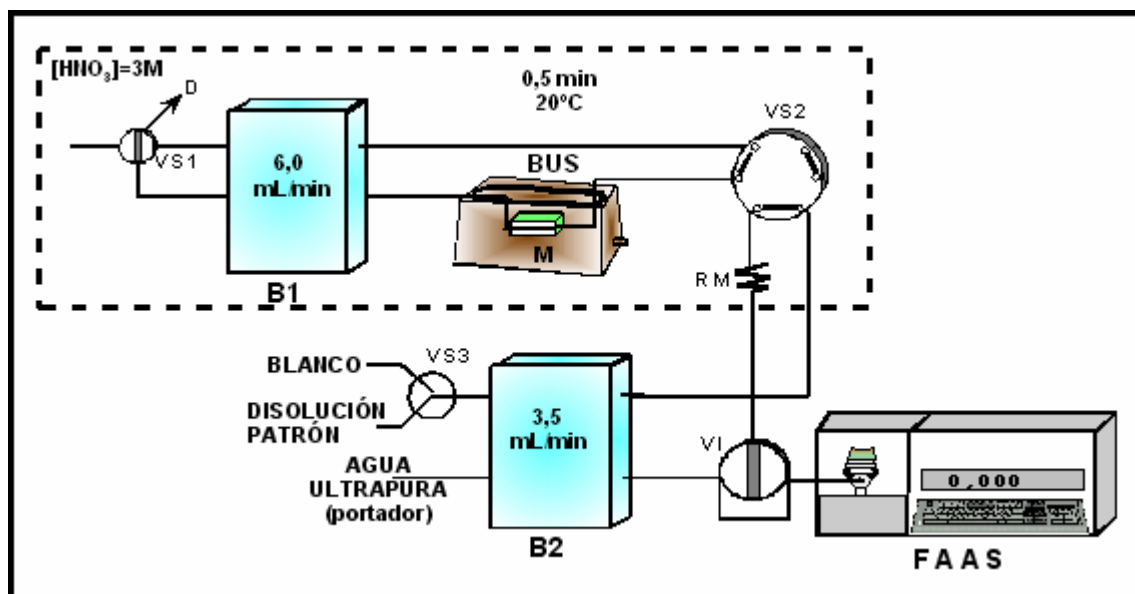


Figura 98. Sistema FIA utilizado para la determinación de cobre en muestras de cereales y derivados indicando los valores óptimos de las variables implicadas en el proceso. B1 y B2, bombas peristálticas; BUS, baño de ultrasonidos; M, minicolumna; RM, reactor de mezcla; D, desecho; VS1, VS2 y VS3, válvulas de selección; VI, válvula de inyección y FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con llama.

Tabla 254. Características analíticas del método propuesto para la determinación de cobre en muestras de cereales y derivados

Tipo de muestra	Cantidad de muestra (g)	LOD ($\mu\text{g/g}$)	LOQ ($\mu\text{g/g}$)	Sensibilidad para un 1% de absorción ($\mu\text{g/g}$)	Intervalo lineal ($\mu\text{g/g}$)
Cereales y derivados	0,0300	0,3	2,7	2,7	2,7 – 180,0

Tabla 255. Resultados obtenidos en la determinación de cobre en muestras reales de cereales y derivados. Aplicación del t-Test de parejas a los resultados obtenidos

Tipo de muestras	Muestras	[Cu] ($\mu\text{g/g}$, peso seco) ^a		(%)Eficacia en la extracción
		Método de referencia	Método propuesto	
Cereales y derivados	Harina de Trigo	$4,3 \pm 1,0$	$4,3 \pm 0,7$	99,4
	Sémola de Trigo	$6,7 \pm 1,0$	$6,7 \pm 0,4$	99,3
	Harina Integral	$7,0 \pm 1,4$	$6,7 \pm 0,4$	96,1
	Harina Fina de Maiz	ND	ND	-
	Pan Rallado	$5,0 \pm 1,0$	$5,0 \pm 0,7$	100,7
	Obleas de helado	$5,2 \pm 0,7$	$5,2 \pm 0,4$	101,0
	Arroz	$4,7 \pm 1,0$	$5,0 \pm 0,7$	105,3
	Galletas	$5,4 \pm 1,0$	$5,7 \pm 0,7$	105,8
	Fideos sopa	$6,7 \pm 1,0$	$6,7 \pm 0,4$	99,3
	Spaguetty	$6,5 \pm 0,7$	$6,2 \pm 0,4$	95,3
	Tallarín	$7,4 \pm 1,0$	$7,4 \pm 0,4$	100,1
	Cereales de desayuno	$4,7 \pm 1,0$	$5,0 \pm 0,7$	105,3
	Cereales con cacao	$11,6 \pm 1,0$	$11,7 \pm 0,4$	101,3
t-test de parejas	$\bar{X}$ de las diferencias	σ de las diferencias	t _{calculada}	t _{crítica}
	$-2,99 \times 10^{-2}$	0,19	1,54	2,18

a. [Cu] = Media $\pm$ desviación estándar (n=3)

ND. No detectado

Extracción y determinación de cobre en muestras de frutos secos

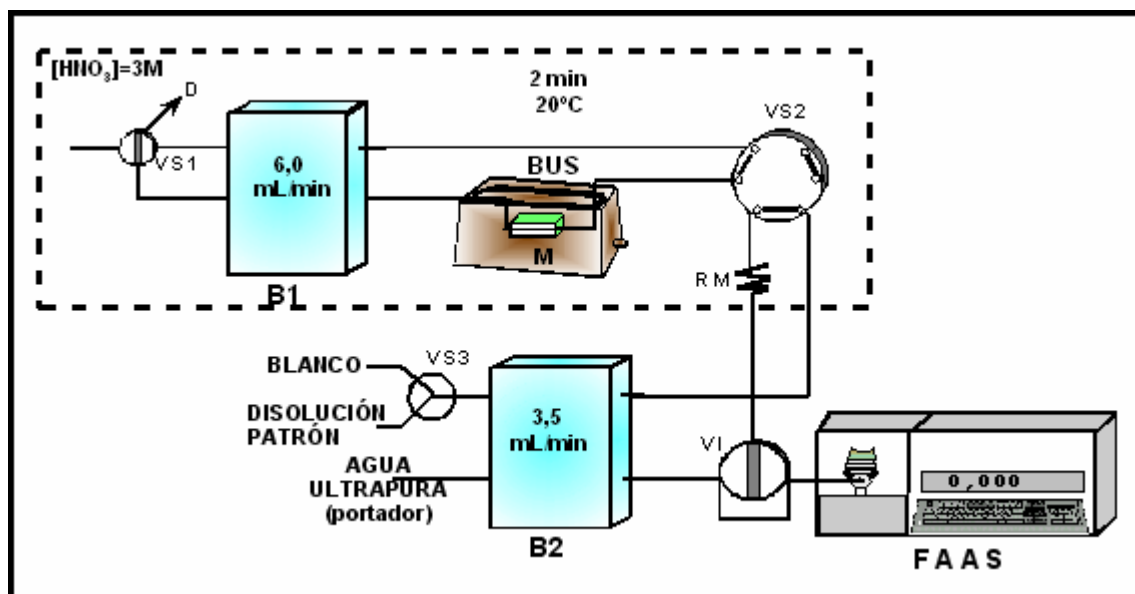


Figura 99. Sistema FIA utilizado para la determinación de cobre en muestras de frutos secos indicando los valores óptimos de las variables implicadas en el proceso. B1 y B2, bombas peristálticas; BUS, baño de ultrasonidos; M, minicolumna; RM, reactor de mezcla; D, desecho; VS1, VS2 y VS3, válvulas de selección; VI, válvula de inyección y FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con llama.

Tabla 256. Características analíticas del método propuesto para la determinación de cobre en muestras de frutos secos

Tipo de muestra	Cantidad de muestra (g)	LOD ($\mu\text{g/g}$)	LOQ ($\mu\text{g/g}$)	Sensibilidad para un 1% de absorción ($\mu\text{g/g}$)	Intervalo lineal ($\mu\text{g/g}$)
Frutos secos	0,0300	0,3	2,7	2,7	2,7 – 180,0

Tabla 257. Resultados obtenidos en la determinación de cobre en muestras reales de frutos secos. Aplicación del t-Test de parejas a los resultados obtenidos

Tipo de muestras	Muestras	[Cu] ($\mu\text{g/g}$, peso seco) ^a		(% Eficacia en la extracción)
		Método de referencia	Método propuesto	
Frutos Secos	Castañas	$12,5 \pm 1,0$	$12,3 \pm 0,4$	98,2
	Pistachos	$12,5 \pm 1,0$	$12,7 \pm 0,4$	102,1
	Cacahuètes	$12,5 \pm 1,4$	$12,5 \pm 0,7$	100,2
	Nueces	$22,2 \pm 0,7$	$22,1 \pm 0,4$	99,7
	Almendras	$10,5 \pm 0,4$	$10,3 \pm 0,0$	98,5
	Avellanas	$10,5 \pm 1,0$	$10,6 \pm 0,4$	100,8
t-test de parejas	$\bar{X}$ de las diferencias	σ de las diferencias	t _{calculada}	t _{crítica}
	$1,50 \times 10^{-2}$	0,17	0,21	2,57

a. [Cu] = Media $\pm$ desviación estándar (n=3)

Extracción y determinación de cobre en muestras de legumbres

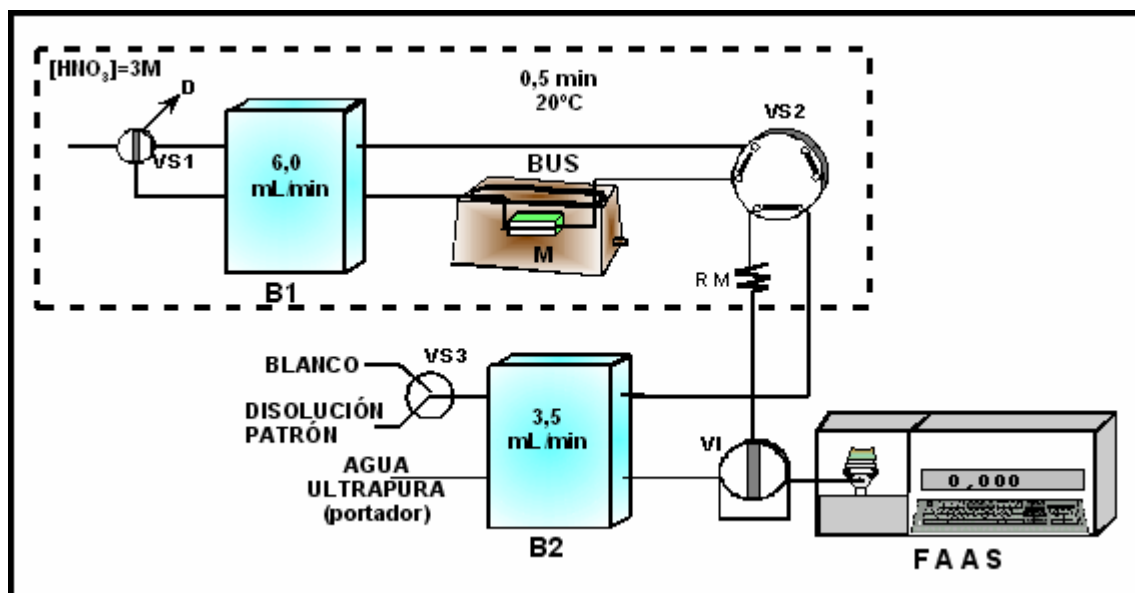


Figura 100. Sistema FIA utilizado para la determinación de cobre en muestras de legumbres indicando los valores óptimos de las variables implicadas en el proceso. B1 y B2, bombas peristálticas; BUS, baño de ultrasonidos; M, minicolumna; RM, reactor de mezcla; D, desecho; VS1, VS2 y VS3, válvulas de selección; VI, válvula de inyección y FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con llama.

Tabla 258. Características analíticas del método propuesto para la determinación de cobre en muestras de legumbres

Tipo de muestra	Cantidad de muestra (g)	LOD ($\mu\text{g/g}$)	LOQ ($\mu\text{g/g}$)	Sensibilidad para un 1% de absorción ($\mu\text{g/g}$)	Intervalo lineal ($\mu\text{g/g}$)
Legumbres	0,0300	0,3	2,7	2,7	2,7 – 180,0

Tabla 259. Resultados obtenidos en la determinación de cobre en muestras reales de legumbres. Aplicación del t-Test de parejas a los resultados obtenidos

Tipo de muestras	Muestras	[Cu] ($\mu\text{g/g}$, peso seco) ^a		(% Eficacia en la extracción)
		Método de referencia	Método propuesto	
Legumbres	Lentejas 1	12,3 $\pm$ 0,7	12,3 $\pm$ 0,4	100,0
	Lentejas 2	12,5 $\pm$ 1,0	12,5 $\pm$ 0,7	100,2
	Habas 1	11,4 $\pm$ 1,0	11,5 $\pm$ 0,4	101,4
	Habas 2	12,9 $\pm$ 0,7	12,7 $\pm$ 0,4	98,6
	Garbanzos 1	10,3 $\pm$ 0,7	10,1 $\pm$ 0,4	98,3
	Garbanzos 2	11,8 $\pm$ 1,0	11,8 $\pm$ 0,7	99,7
t-test de parejas	$\bar{X}$ de las diferencias	σ de las diferencias	t _{calculada}	t _{crítica}
	3,67 $\times 10^{-2}$	0,13	0,69	2,57

a. [Cu] = Media $\pm$ desviación estándar (n=3)

Extracción y determinación de cobre en muestras de verduras, hortalizas y frutas

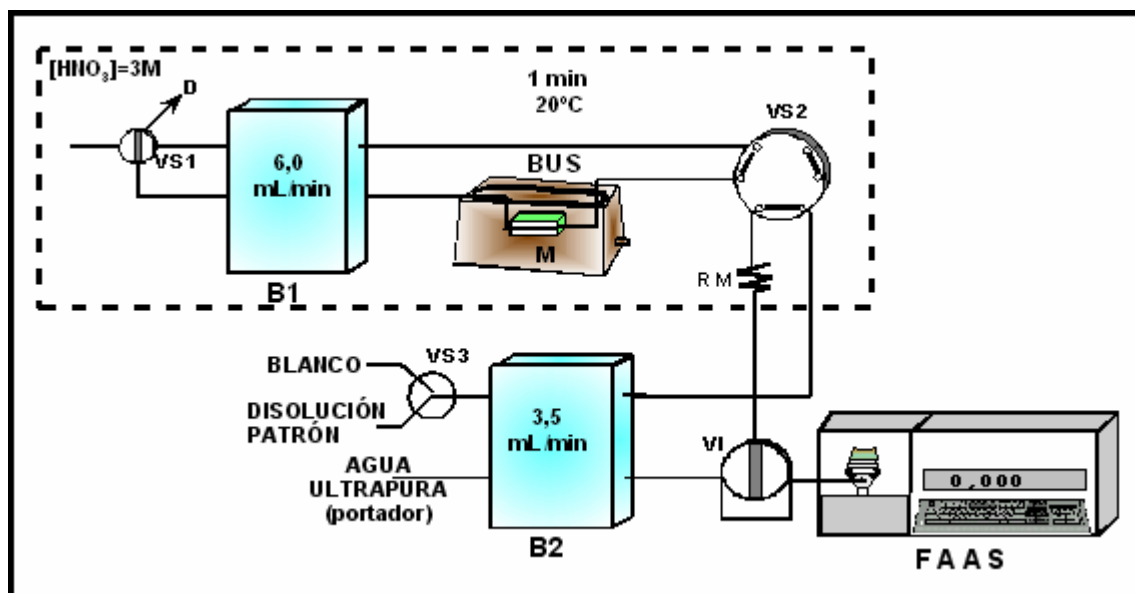


Figura 101. Sistema FIA utilizado para la determinación de cobre en muestras de verduras, hortalizas y frutas indicando los valores óptimos de las variables implicadas en el proceso. B1 y B2, bombas peristálticas; BUS, baño de ultrasonidos; M, minicolumna; RM, reactor de mezcla; D, desecho; VS1, VS2 y VS3, válvulas de selección; VI, válvula de inyección y FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con llama.

Tabla 260. Características analíticas del método propuesto para la determinación de cobre en muestras de verduras, hortalizas y frutas

Tipo de muestra	Cantidad de muestra (g)	LOD ($\mu\text{g/g}$)	LOQ ($\mu\text{g/g}$)	Sensibilidad para un 1% de absorción ($\mu\text{g/g}$)	Intervalo lineal ($\mu\text{g/g}$)
Verduras, hortalizas y frutas	0,0300	0,3	2,7	2,7	2,7 – 180,0

Tabla 261. Resultados obtenidos en la determinación de cobre en muestras reales de verduras, hortalizas y frutas. Aplicación del t-Test de parejas a los resultados obtenidos

Tipo de muestras	Muestras	[Cu] ($\mu\text{g/g}$, peso seco) ^a		(%)Eficacia en la extracción
		Método de referencia	Método propuesto	
Verduras, hortalizas y frutas	Acelga	19,5 $\pm$ 0,7	19,2 $\pm$ 0,4	98,4
	Repollo	6,3 $\pm$ 0,7	6,5 $\pm$ 0,4	103,0
	Lombarda	7,6 $\pm$ 0,7	7,7 $\pm$ 0,4	100,9
	Lechuga	10,9 $\pm$ 0,7	11,3 $\pm$ 0,4	103,3
	Grelo	10,7 $\pm$ 1,0	10,6 $\pm$ 0,4	98,7
	Tila	9,6 $\pm$ 0,7	9,9 $\pm$ 0,4	102,5
	Manzanilla	11,6 $\pm$ 0,7	11,5 $\pm$ 0,4	99,5
	Té 1	19,1 $\pm$ 1,0	19,0 $\pm$ 0,7	99,4
	Té 2 (Inglés)	3,7 $\pm$ 0,7	3,6 $\pm$ 0,4	98,6
	Té 3 (Rojo)	19,8 $\pm$ 1,0	19,7 $\pm$ 0,7	99,8
	Té 4	10,3 $\pm$ 0,7	10,6 $\pm$ 0,4	103,0
	Escaramujo	7,0 $\pm$ 0,7	7,2 $\pm$ 0,4	103,5
	Manzana	6,1 $\pm$ 0,7	6,1 $\pm$ 0,4	100,5
	Zanahoria	5,9 $\pm$ 0,4	5,9 $\pm$ 0,0	100,2
	Calabacín	9,2 $\pm$ 1,0	9,5 $\pm$ 0,7	103,3
	Pera	4,8 $\pm$ 0,7	4,7 $\pm$ 0,4	98,1
	Albaricoque	8,7 $\pm$ 0,7	8,5 $\pm$ 0,4	97,6
	Plátano	5,4 $\pm$ 0,7	5,4 $\pm$ 0,4	99,5
	Patata	4,5 $\pm$ 0,4	4,4 $\pm$ 0,0	97,6
t-test de parejas	$\bar{X}$ de las diferencias	σ de las diferencias	$t_{\text{calculada}}$	$t_{\text{crítica}}$
	-3,16 $\times 10^{-2}$	0,19	0,72	2,10

a. [Cu] = Media $\pm$ desviación estándar (n=3)

6.1.4 Extracción y determinación de hierro

Extracción y determinación de hierro en moluscos y pescados

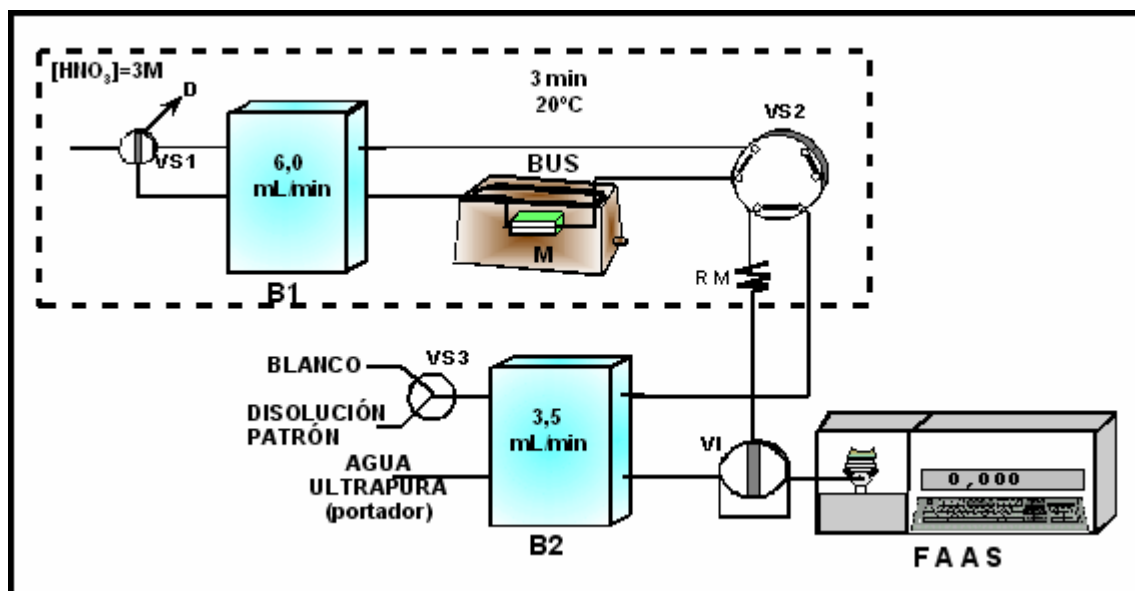


Figura 102. Sistema FIA utilizado para la determinación de hierro en muestras de moluscos y pescados indicando los valores óptimos de las variables implicadas en el proceso. B1 y B2, bombas peristálticas; BUS, baño de ultrasonidos; M, minicolumna; RM, reactor de mezcla; D, desecho; VS1, VS2 y VS3, válvulas de selección; VI, válvula de inyección y FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con llama.

Tabla 262. Características analíticas del método propuesto para la determinación de hierro en muestras de moluscos y pescados

Tipo de muestra	Cantidad de muestra (g)	LOD ($\mu\text{g/g}$)	LOQ ($\mu\text{g/g}$)	Sensibilidad para un 1% de absorción ($\mu\text{g/g}$)	Intervalo lineal ($\mu\text{g/g}$)
Moluscos y pescados	0,0100	3,0	13,0	13,0	13,0 – 550,0
	0,0200	1,5	6,5	6,5	6,5 - 275,0

Tabla 263. Resultados obtenidos en la determinación de hierro en muestras reales de moluscos y pescados. Aplicación del t-Test de parejas a los resultados obtenidos

Tipo de muestras	Muestras	[Fe] ($\mu\text{g/g}$, peso seco) ^a		(%)Eficacia en la extracción
		Método de referencia	Método propuesto	
Moluscos y Pescados	Mejillón 1	254,6 $\pm$ 3,0	254,5 $\pm$ 1,9	100,0
	Mejillón 2	257,6 $\pm$ 3,0	256,7 $\pm$ 1,9	99,6
	Mejillón 3	219,1 $\pm$ 1,8	218,8 $\pm$ 0,0	99,9
	Mejillón 4	224,2 $\pm$ 3,0	223,3 $\pm$ 1,9	99,6
	Mejillón 5	227,2 $\pm$ 3,0	226,6 $\pm$ 1,9	99,7
	Mejillón 6	242,4 $\pm$ 3,0	240,0 $\pm$ 1,9	99,0
	Mejillón 7	254,6 $\pm$ 3,0	256,7 $\pm$ 1,9	100,8
	Mejillón 8	246,5 $\pm$ 1,8	246,7 $\pm$ 1,9	100,1
	Mejillón 9	229,3 $\pm$ 1,8	228,8 $\pm$ 0,0	99,8
	Mejillón 10	248,5 $\pm$ 3,0	247,8 $\pm$ 1,9	99,7
	Atún	66,3 $\pm$ 3,0	66,3 $\pm$ 1,9	100,0
	Sardina	94,7 $\pm$ 1,8	94,1 $\pm$ 1,9	99,4
	Merluza	51,2 $\pm$ 3,0	50,7 $\pm$ 1,9	99,1
	Cangrejo	37,0 $\pm$ 1,8	37,4 $\pm$ 1,9	101,0
	Langostino	144,3 $\pm$ 1,8	145,4 $\pm$ 0,0	100,8
	Navajas	60,3 $\pm$ 3,0	59,6 $\pm$ 1,9	98,9
	Zamburiñas	133,1 $\pm$ 3,0	133,1 $\pm$ 1,9	100,0
	Berberechos	114,9 $\pm$ 3,0	116,4 $\pm$ 1,9	101,3
	Almeja 1	221,2 $\pm$ 3,0	219,9 $\pm$ 1,9	99,4
	Almeja 2	210,0 $\pm$ 1,8	208,8 $\pm$ 0,0	99,4
t-test de parejas	$\bar{X}$ de las diferencias	σ de las diferencias	t _{calculada}	t _{crítica}
	0,27	1,01	1,19	2,09

a. [Fe] = Media $\pm$ desviación estándar (n=3)

Extracción y determinación de hierro en muestras de carne

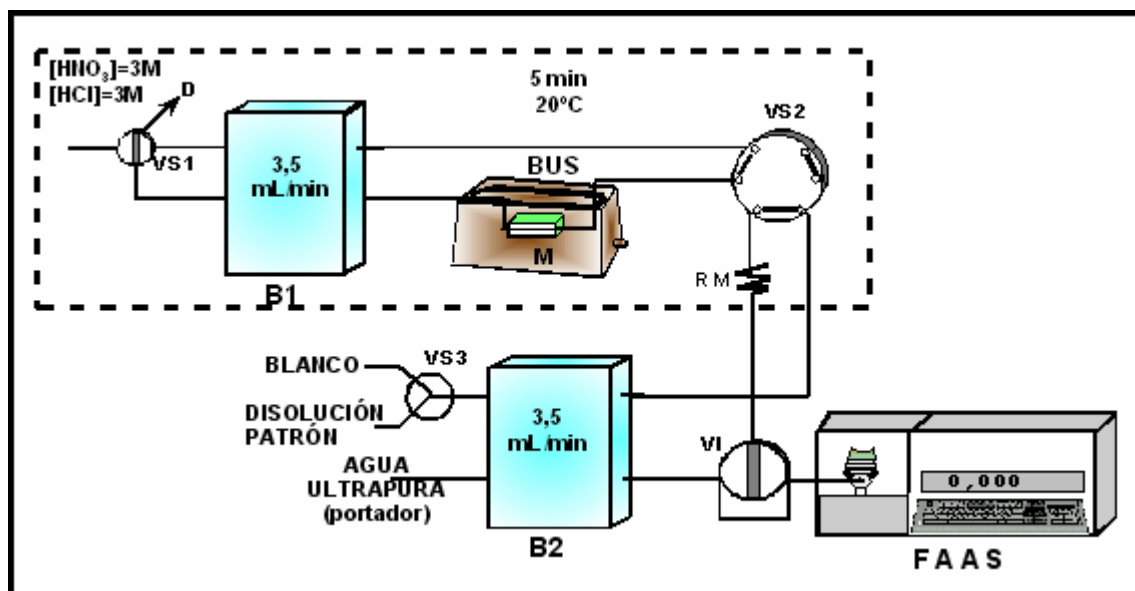


Figura 103. Sistema FIA utilizado para la determinación de hierro en muestras de carne indicando los valores óptimos de las variables implicadas en el proceso. B1 y B2, bombas peristálticas; BUS, baño de ultrasonidos; M, minicolumna; RM, reactor de mezcla; D, desecho; VS1, VS2 y VS3, válvulas de selección; VI, válvula de inyección y FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con llama.

Tabla 264. Características analíticas del método propuesto para la determinación de hierro en muestras de carne

Tipo de muestra	Cantidad de muestra (g)	LOD ($\mu\text{g/g}$)	LOQ ($\mu\text{g/g}$)	Sensibilidad para un 1% de absorción ($\mu\text{g/g}$)	Intervalo lineal ($\mu\text{g/g}$)
Carne	0,0100	3,0	13,0	13,0	13,0 – 550,0
	0,0200	1,5	6,5	6,5	6,5 - 275,0
	0,0300	1,0	4,3	4,3	4,3 – 183,3

Tabla 265. Resultados obtenidos en la determinación de hierro en muestras reales de carne. Aplicación del t-Test de parejas a los resultados obtenidos

Tipo de muestras	Muestras	[Fe] ($\mu\text{g/g}$, peso seco) ^a		(%)Eficacia en la extracción
		Método de referencia	Método propuesto	
Carnes	Riñones de cordero	129,4 $\pm$ 1,0	129,0 $\pm$ 0,6	99,7
	Hígado de conejo	278,8 $\pm$ 3,0	277,8 $\pm$ 1,9	99,6
	Pollo	59,6 $\pm$ 1,0	60,0 $\pm$ 0,6	100,7
	Ternera	106,1 $\pm$ 1,0	106,0 $\pm$ 0,6	99,9
	Cerdo	59,6 $\pm$ 1,0	58,8 $\pm$ 0,6	98,8
	Cordero	64,6 $\pm$ 1,0	64,8 $\pm$ 0,6	100,3
	Pavo	65,6 $\pm$ 1,0	65,5 $\pm$ 0,6	99,8
t-test de parejas	$\bar{X}$ de las diferencias	σ de las diferencias	t _{calculada}	t _{crítica}
	0,25	0,49	1,36	2,45

a. [Fe] = Media $\pm$ desviación estándar (n=3)

Extracción y determinación de hierro en muestras de cereales y derivados

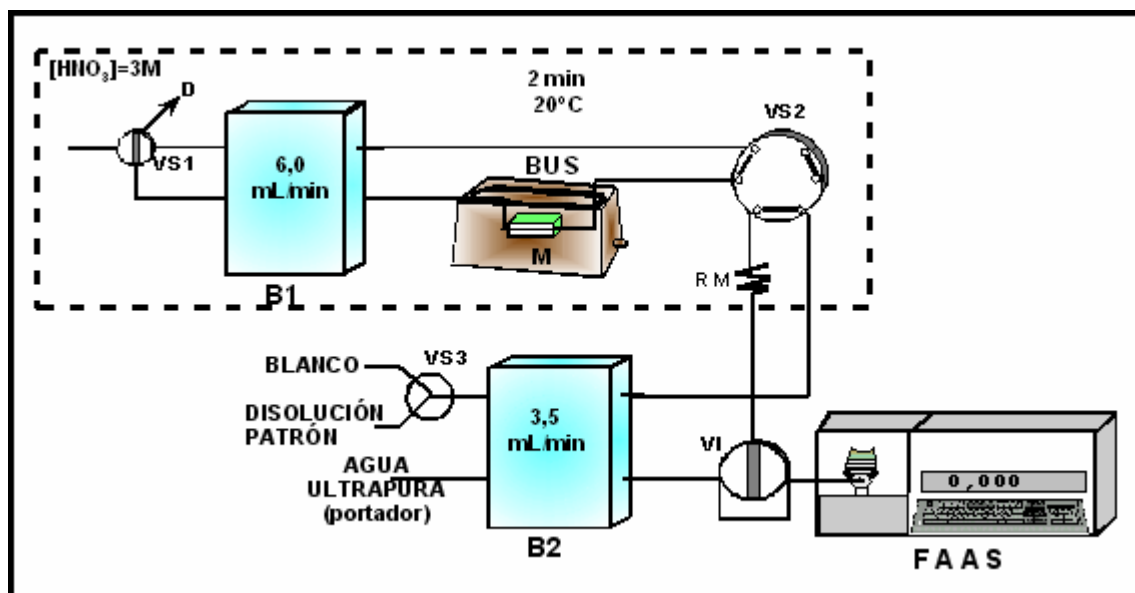


Figura 104. Sistema FIA utilizado para la determinación de hierro en muestras de cereales y derivados indicando los valores óptimos de las variables implicadas en el proceso. B1 y B2, bombas peristálticas; BUS, baño de ultrasonidos; M, minicolumna; RM, reactor de mezcla; D, desecho; VS1, VS2 y VS3, válvulas de selección; VI, válvula de inyección y FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con llama.

Tabla 266. Características analíticas del método propuesto para la determinación de hierro en muestras de cereales y derivados

Tipo de muestra	Cantidad de muestra (g)	LOD ($\mu\text{g/g}$)	LOQ ($\mu\text{g/g}$)	Sensibilidad para un 1% de absorción ($\mu\text{g/g}$)	Intervalo lineal ($\mu\text{g/g}$)
Cereales y derivados	0,0300	1,0	4,3	4,3	4,3 – 183,3

Tabla 267. Resultados obtenidos en la determinación de hierro en muestras reales de cereales y derivados. Aplicación del t-Test de parejas a los resultados obtenidos

Tipo de muestras	Muestras	[Fe] ($\mu\text{g/g}$, peso seco) ^a		(%)Eficacia en la extracción
		Método de referencia	Método propuesto	
Cereales y derivados	Harina de Trigo	20,1 $\pm$ 2,0	20,3 $\pm$ 0,6	100,8
	Sémola de Trigo	12,0 $\pm$ 2,0	11,7 $\pm$ 1,1	97,6
	Harina Integral	31,9 $\pm$ 1,5	32,1 $\pm$ 0,6	100,7
	Harina Fina de Maiz	7,3 $\pm$ 1,5	7,3 $\pm$ 1,1	99,8
	Pan Rallado	22,5 $\pm$ 1,5	22,5 $\pm$ 0,6	100,1
	Obleas de helado	17,1 $\pm$ 2,0	17,3 $\pm$ 1,1	101,3
	Arroz	10,0 $\pm$ 2,0	9,9 $\pm$ 1,7	98,9
	Galletas	15,7 $\pm$ 1,5	16,2 $\pm$ 1,1	102,9
	Fideos sopa	20,4 $\pm$ 1,5	20,3 $\pm$ 0,6	99,1
	Spaguetty	21,4 $\pm$ 1,5	21,7 $\pm$ 0,0	101,4
	Tallarín	21,4 $\pm$ 1,5	21,7 $\pm$ 1,1	101,4
	Cereales de desayuno	19,8 $\pm$ 2,1	19,5 $\pm$ 1,1	98,7
	Cereales con cacao	67,0 $\pm$ 2,5	67,7 $\pm$ 0,6	101,2
t-test de parejas	$\bar{X}$ de las diferencias	σ de las diferencias	t _{calculada}	t _{crítica}
	-0,12	0,30	1,47	2,18

a. [Fe] = Media $\pm$ desviación estándar (n=3)

Extracción y determinación de hierro en muestras de frutos secos

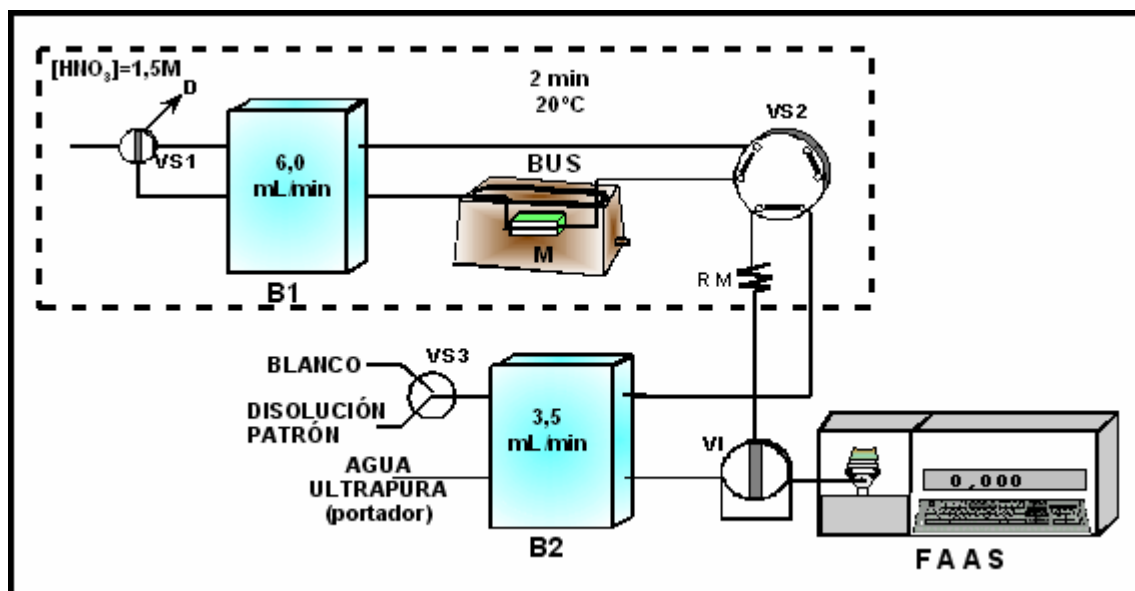


Figura 105. Sistema FIA utilizado para la determinación de hierro en muestras de frutos secos indicando los valores óptimos de las variables implicadas en el proceso. B1 y B2, bombas peristálticas; BUS, baño de ultrasonidos; M, minicolumna; RM, reactor de mezcla; D, desecho; VS1, VS2 y VS3, válvulas de selección; VI, válvula de inyección y FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con llama.

Tabla 268. Características analíticas del método propuesto para la determinación de hierro en muestras de frutos secos

Tipo de muestra	Cantidad de muestra (g)	LOD ($\mu\text{g/g}$)	LOQ ($\mu\text{g/g}$)	Sensibilidad para un 1% de absorción ($\mu\text{g/g}$)	Intervalo lineal ($\mu\text{g/g}$)
Frutos secos	0,0300	1,0	4,3	4,3	4,3 – 183,3

Tabla 269. Resultados obtenidos en la determinación de hierro en muestras reales de frutos secos. Aplicación del t-Test de parejas a los resultados obtenidos

Tipo de muestras	Muestras	[Fe] ($\mu\text{g/g}$, peso seco) ^a		(%)Eficacia en la extracción
		Método de referencia	Método propuesto	
Frutos Secos	Castañas	29,9 $\pm$ 1,5	30,3 $\pm$ 0,6	101,3
	Pistachos	41,7 $\pm$ 1,2	41,4 $\pm$ 0,6	99,3
	Cacahuetes	21,4 $\pm$ 2,1	21,7 $\pm$ 1,1	101,4
	Nueces	34,6 $\pm$ 1,5	34,7 $\pm$ 0,6	100,4
	Almendras	33,6 $\pm$ 1,5	33,2 $\pm$ 0,6	99,0
	Avellanas	34,9 $\pm$ 2,1	35,8 $\pm$ 0,6	102,6
t-test de parejas	$\bar{X}$ de las diferencias	σ de las diferencias	t _{calculada}	t _{crítica}
	-0,18	0,46	0,97	2,57

a. [Fe] = Media $\pm$ desviación estándar (n=3)

Extracción y determinación de hierro en muestras de legumbres

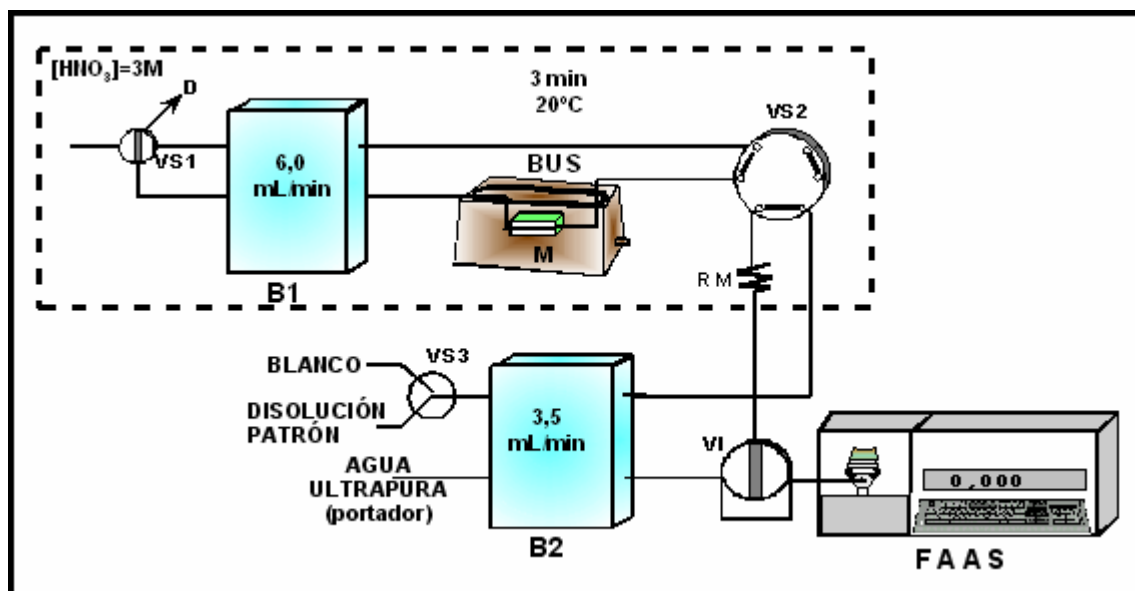


Figura 106. Sistema FIA utilizado para la determinación de hierro en muestras de legumbres indicando los valores óptimos de las variables implicadas en el proceso. B1 y B2, bombas peristálticas; BUS, baño de ultrasonidos; M, minicolumna; RM, reactor de mezcla; D, desecho; VS1, VS2 y VS3, válvulas de selección; VI, válvula de inyección y FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con llama.

Tabla 270. Características analíticas del método propuesto para la determinación de hierro en muestras de legumbres

Tipo de muestra	Cantidad de muestra (g)	LOD ($\mu\text{g/g}$)	LOQ ($\mu\text{g/g}$)	Sensibilidad para un 1% de absorción ($\mu\text{g/g}$)	Intervalo lineal ($\mu\text{g/g}$)
Legumbres	0,0300	1,0	4,3	4,3	4,3 – 183,3

Tabla 271. Resultados obtenidos en la determinación de hierro en muestras reales de legumbres. Aplicación del t-Test de parejas a los resultados obtenidos

Tipo de muestras	Muestras	[Fe] ($\mu\text{g/g}$, peso seco) ^a		(%)Eficacia en la extracción
		Método de referencia	Método propuesto	
Legumbres	Lentejas 1	73,4 $\pm$ 1,2	73,3 $\pm$ 0,6	99,9
	Lentejas 2	70,0 $\pm$ 1,5	71,5 $\pm$ 0,6	102,1
	Habas 1	51,8 $\pm$ 2,1	52,9 $\pm$ 1,1	102,1
	Habas 2	52,5 $\pm$ 1,0	52,2 $\pm$ 0,6	99,4
	Garbanzos 1	43,0 $\pm$ 1,5	43,3 $\pm$ 0,6	100,5
	Garbanzos 2	38,6 $\pm$ 1,5	39,5 $\pm$ 1,1	102,3
t-test de parejas	$\bar{X}$ de las diferencias	σ de las diferencias	t _{calculada}	t _{crítica}
	-0,55	0,70	1,92	2,57

a. [Fe] = Media $\pm$ desviación estándar (n=3)

Extracción y determinación de hierro en muestras de verduras, hortalizas y frutas

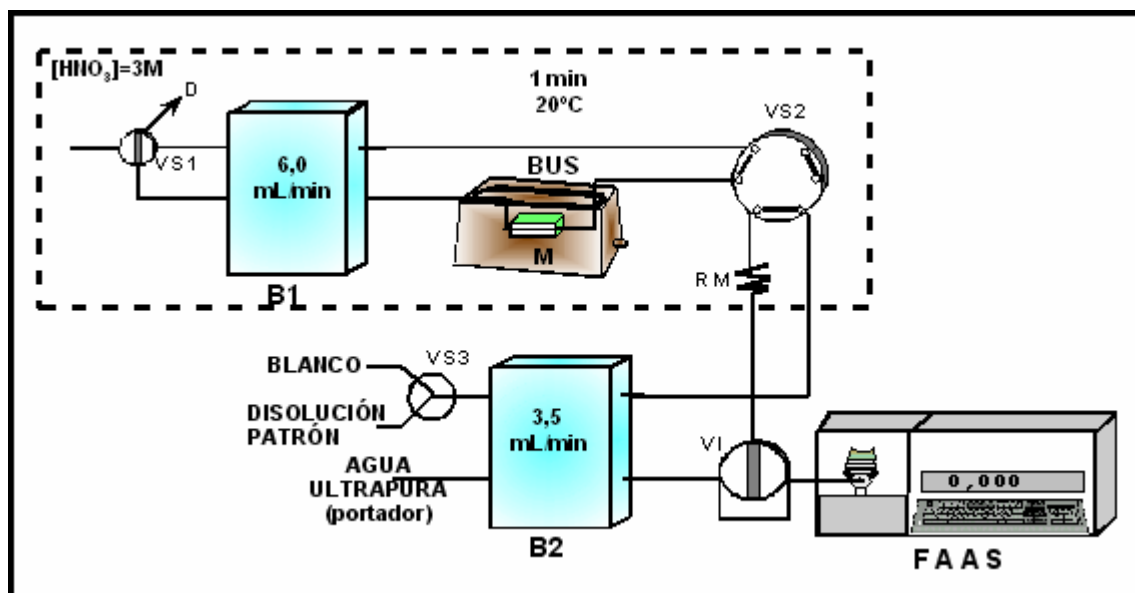


Figura 107. Sistema FIA utilizado para la determinación de hierro en muestras de verduras, hortalizas y frutas indicando los valores óptimos de las variables implicadas en el proceso. B1 y B2, bombas peristálticas; BUS, baño de ultrasonidos; M, minicolumna; RM, reactor de mezcla; D, desecho; VS1, VS2 y VS3, válvulas de selección; VI, válvula de inyección y FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con llama.

Tabla 272. Características analíticas del método propuesto para la determinación de hierro en muestras de verduras, hortalizas y frutas

Tipo de muestra	Cantidad de muestra (g)	LOD ($\mu\text{g/g}$)	LOQ ($\mu\text{g/g}$)	Sensibilidad para un 1% de absorción ($\mu\text{g/g}$)	Intervalo lineal ($\mu\text{g/g}$)
Verduras, hortalizas y frutas	0,0100	3,0	13,0	13,0	13,0 – 550,0
	0,0200	1,5	6,5	6,5	6,5 - 275,0
	0,0300	1,0	4,3	4,3	4,3 – 183,3

Tabla 273. Resultados obtenidos en la determinación de hierro en muestras reales de verduras, hortalizas y frutas. Aplicación del t-Test de parejas a los resultados obtenidos

Tipo de muestras	Muestras	[Fe] ($\mu\text{g/g}$, peso seco) ^a		(% Eficacia en la extracción)
		Método de referencia	Método propuesto	
Verduras, hortalizas y frutas	Acelga	111,2 $\pm$ 2,0	112,3 $\pm$ 0,6	101,0
	Repollo	102,1 $\pm$ 2,0	101,9 $\pm$ 1,1	99,8
	Lombarda	54,5 $\pm$ 1,0	54,4 $\pm$ 0,6	99,8
	Lechuga	71,7 $\pm$ 2,0	71,8 $\pm$ 1,1	100,2
	Grelo	159,1 $\pm$ 1,5	158,7 $\pm$ 1,1	99,8
	Tila	254,6 $\pm$ 3,0	250,0 $\pm$ 1,9	98,2
	Manzanilla	92,9 $\pm$ 2,0	93,7 $\pm$ 0,6	100,8
	Té 1	174,6 $\pm$ 4,6	173,2 $\pm$ 1,9	99,2
	Té 2 (Inglés)	18,7 $\pm$ 1,5	19,1 $\pm$ 0,6	102,1
	Té 3 (Rojo)	476,1 $\pm$ 3,0	474,9 $\pm$ 1,9	99,7
	Té 4	50,8 $\pm$ 1,5	51,0 $\pm$ 0,6	100,5
	Escaramujo	48,4 $\pm$ 1,0	48,8 $\pm$ 0,6	100,8
	Manzana	23,1 $\pm$ 1,0	23,2 $\pm$ 0,6	100,4
	Zanahoria	39,0 $\pm$ 1,5	40,7 $\pm$ 1,1	104,3
	Calabacín	42,7 $\pm$ 1,5	42,9 $\pm$ 1,1	100,5
	Pera	19,4 $\pm$ 1,5	19,9 $\pm$ 0,6	102,4
	Albaricoque	22,1 $\pm$ 1,0	22,1 $\pm$ 0,6	100,0
	Plátano	22,1 $\pm$ 1,0	22,5 $\pm$ 0,6	101,6
	Patata	22,8 $\pm$ 1,0	23,2 $\pm$ 0,6	101,9
t-test de parejas	$\bar{X}$ de las diferencias	σ de las diferencias	t _{calculada}	t _{crítica}
	9,05x10 ⁻²	1,29	0,30	2,10

a. [Fe] = Media $\pm$ desviación estándar (n=3)

6.1.5 Extracción y determinación de magnesio

Extracción y determinación de magnesio en muestras de moluscos y pescados

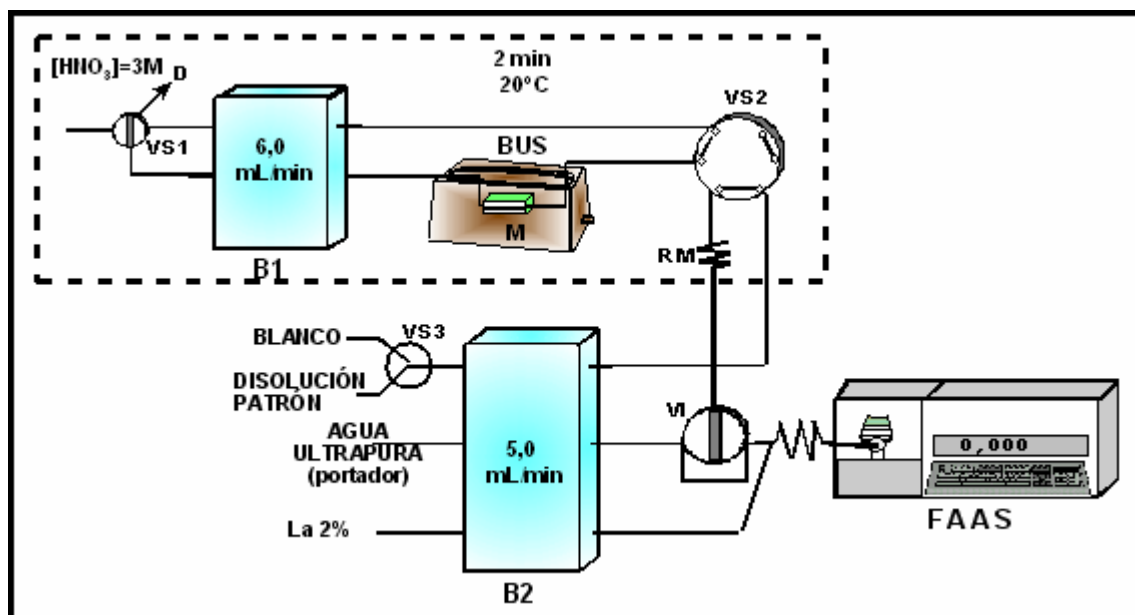


Figura 108. Sistema FIA utilizado para la determinación de magnesio en muestras de moluscos y pescados indicando los valores óptimos de las variables implicadas en el proceso. B1 y B2, bombas peristálticas; BUS, baño de ultrasonidos; M, minicolumna; RM, reactor de mezcla; D, desecho; VS1, VS2 y VS3, válvulas de selección; VI, válvula de inyección y FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con llama.

Tabla 274. Características analíticas del método propuesto para la determinación de magnesio en moluscos y pescados

Tipo de muestra	Cantidad de muestra (g)	LOD ($\mu\text{g/g}$)	LOQ ($\mu\text{g/g}$)	Sensibilidad para un 1% de absorción ($\mu\text{g/g}$)	Intervalo lineal ($\mu\text{g/g}$)
Moluscos y pescados	0,0050	21,0	81,0	81,0	81,0 – 6000,0

Tabla 275. Resultados obtenidos en la determinación de magnesio en muestras reales de moluscos y pescados. Aplicación del t-Test de parejas a los resultados obtenidos

Tipo de muestras	Muestras	[Mg] ($\mu\text{g/g}$, peso seco) ^a		(%)Eficacia en la extracción
		Método de referencia	Método propuesto	
Moluscos y Pescados	Mejillón 1	4922,8 $\pm$ 54,4	4904,8 $\pm$ 10,7	99,6
	Mejillón 2	7107,7 $\pm$ 54,4	7149,5 $\pm$ 46,2 ^b	100,4
	Mejillón 3	3984,7 $\pm$ 35,6	3980,9 $\pm$ 10,7	99,9
	Mejillón 4	7084,0 $\pm$ 35,6	7103,3 $\pm$ 46,2 ^b	99,9
	Mejillón 5	8022,1 $\pm$ 54,4	7996,5 $\pm$ 26,7 ^b	99,7
	Mejillón 6	4839,7 $\pm$ 35,6	4898,7 $\pm$ 10,7	101,2
	Mejillón 7	3984,7 $\pm$ 35,6	3999,3 $\pm$ 10,7	100,4
	Mejillón 8	4768,4 $\pm$ 35,6	4720,0 $\pm$ 10,7	99,0
	Mejillón 9	5065,3 $\pm$ 54,4	5089,6 $\pm$ 10,7	100,5
	Mejillón 10	4768,4 $\pm$ 35,6	4732,3 $\pm$ 10,7	99,2
	Atún	956,7 $\pm$ 35,6	950,3 $\pm$ 10,7	99,3
	Sardina	1313,0 $\pm$ 35,6	1332,2 $\pm$ 10,7	101,5
	Merluza	1063,6 $\pm$ 35,6	1055,0 $\pm$ 10,7	99,2
	Cangrejo	671,8 $\pm$ 35,6	673,1 $\pm$ 10,7	100,2
	Langostino	2298,6 $\pm$ 54,4	2262,3 $\pm$ 10,7	98,4
	Navajas	1704,8 $\pm$ 35,6	1707,9 $\pm$ 10,7	100,2
	Zamburiñas	1633,6 $\pm$ 35,6	1664,8 $\pm$ 10,7	101,9
	Berberechos	1681,1 $\pm$ 54,4	1671,0 $\pm$ 10,7	99,4
	Almeja 1	3343,5 $\pm$ 35,6	3371,1 $\pm$ 10,7	100,8
	Almeja 2	4376,6 $\pm$ 35,6	4332,0 $\pm$ 10,7	99,0
t-test de parejas	$\bar{X}$ de las diferencias	σ de las diferencias	t _{calculada}	t _{crítica}
	1,61	28,49	0,25	2,09

a. [Mg] = Media $\pm$ desviación estándar (n=3)

b. Se utilizó 0,0030 g de muestra debido a la elevada concentración de magnesio presente

Extracción y determinación de magnesio en muestras de carne

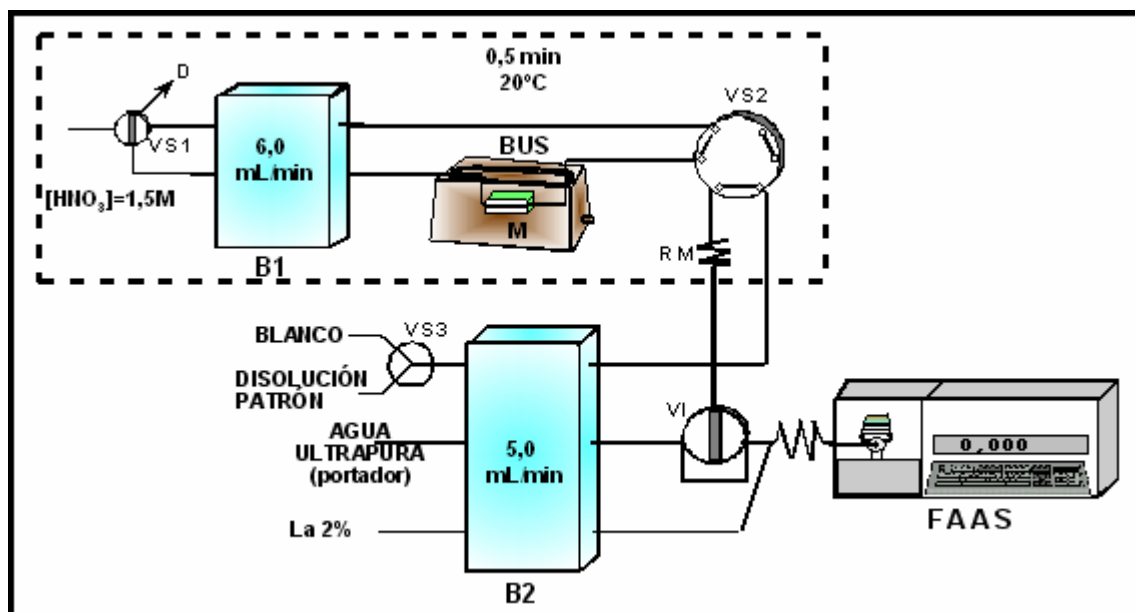


Figura 109. Sistema FIA utilizado para la determinación de magnesio en muestras de carne indicando los valores óptimos de las variables implicadas en el proceso. B1 y B2, bombas peristálticas; BUS, baño de ultrasonidos; M, minicolumna; RM, reactor de mezcla; D, desecho; VS1, VS2 y VS3, válvulas de selección; VI, válvula de inyección y FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con llama.

Tabla 276. Características analíticas del método propuesto para la determinación de magnesio en muestras de carne

Tipo de muestra	Cantidad de muestra (g)	LOD ($\mu\text{g/g}$)	LOQ ($\mu\text{g/g}$)	Sensibilidad para un 1% de absorción ($\mu\text{g/g}$)	Intervalo lineal ($\mu\text{g/g}$)
Carne	0,0050	4,2	16,4	16,4	16,4 – 1200,0

Tabla 277. Resultados obtenidos en la determinación de magnesio en muestras reales de carne. Aplicación del t-Test de parejas a los resultados obtenidos

Tipo de muestras	Muestras	[Mg] ($\mu\text{g/g}$, peso seco) ^a		(%)Eficacia en la extracción
		Método de referencia	Método propuesto	
Carnes	Riñones de cordero	658,5 $\pm$ 3,6	658,8 $\pm$ 2,3	100,0
	Hígado de conejo	644,3 $\pm$ 3,6	660,1 $\pm$ 2,3	102,5
	Pollo	772,5 $\pm$ 7,1	781,7 $\pm$ 2,3	101,2
	Ternera	769,0 $\pm$ 7,1	768,6 $\pm$ 2,3	100,0
	Cerdo	633,6 $\pm$ 7,1	637,9 $\pm$ 3,9	100,7
	Cordero	632,4 $\pm$ 5,4	632,7 $\pm$ 2,3	100,0
	Pavo	954,2 $\pm$ 3,6	954,2 $\pm$ 2,3	100,0
t-test de parejas	$\bar{X}$ de las diferencias	σ de las diferencias	t _{calculada}	t _{crítica}
	-4,27	6,25	1,84	2,45

a. [Mg] = Media $\pm$ desviación estándar (n=3)

Extracción y determinación de magnesio en muestras de cereales y derivados

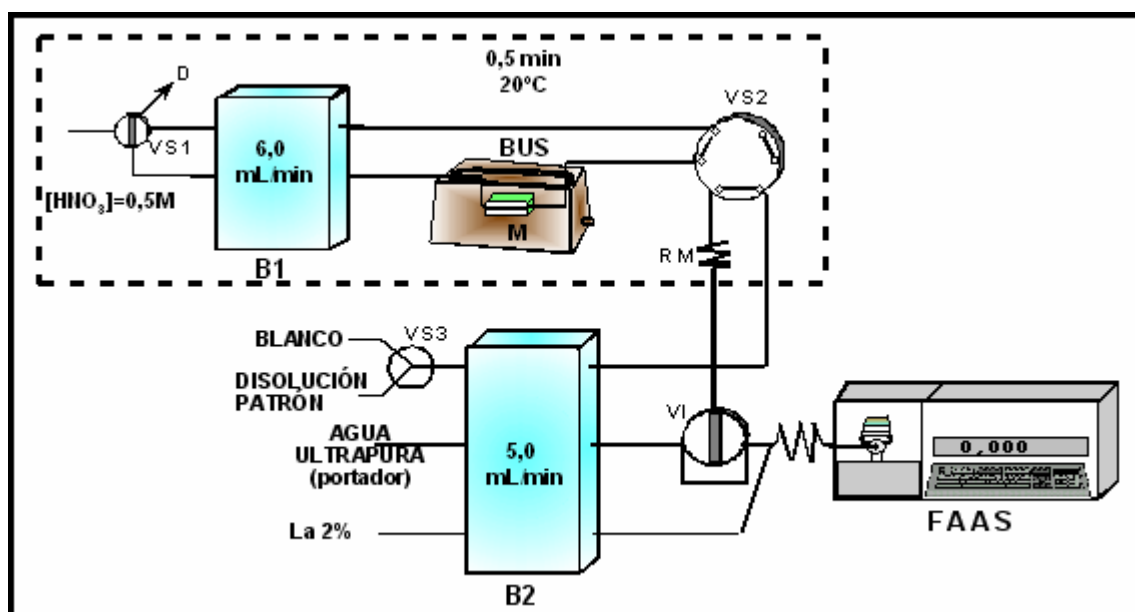


Figura 110. Sistema FIA utilizado para la determinación de magnesio en muestras de cereales y derivados indicando los valores óptimos de las variables implicadas en el proceso. B1 y B2, bombas peristálticas; BUS, baño de ultrasonidos; M, minicolumna; RM, reactor de mezcla; D, desecho; VS1, VS2 y VS3, válvulas de selección; VI, válvula de inyección y FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con llama.

Tabla 278. Características analíticas del método propuesto para la determinación de magnesio en muestras de cereales y derivados

Tipo de muestra	Cantidad de muestra (g)	LOD ($\mu\text{g/g}$)	LOQ ($\mu\text{g/g}$)	Sensibilidad para un 1% de absorción ($\mu\text{g/g}$)	Intervalo lineal ($\mu\text{g/g}$)
Cereales y derivados	0,0100	2,1	8,2	8,2	8,2 – 600,0

Tabla 279. Resultados obtenidos en la determinación de magnesio en muestras reales de cereales y derivados. Aplicación del t-Test de parejas a los resultados obtenidos

Tipo de muestras	Muestras	[Mg] ($\mu\text{g/g}$, peso seco) ^a		(%)Eficacia en la extracción
		Método de referencia	Método propuesto	
Cereales y derivados	Harina de Trigo	288,9 $\pm$ 2,7	290,2 $\pm$ 1,1	100,5
	Sémola de Trigo	361,3 $\pm$ 3,6	363,4 $\pm$ 1,1	100,6
	Harina Integral	650,2 $\pm$ 2,1	648,4 $\pm$ 2,3 ^b	99,7
	Harina Fina de Maiz	ND	ND	-
	Pan Rallado	366,7 $\pm$ 1,8	368,0 $\pm$ 2,0	100,4
	Obleas de helado	421,9 $\pm$ 3,6	422,2 $\pm$ 1,1	100,1
	Arroz	363,7 $\pm$ 2,7	364,1 $\pm$ 2,0	100,1
	Galletas	221,8 $\pm$ 2,7	222,2 $\pm$ 1,1	100,2
	Fideos sopa	481,8 $\pm$ 3,7	480,4 $\pm$ 1,1	99,7
	Spaguetty	499,1 $\pm$ 2,7	500,0 $\pm$ 1,1	100,2
	Tallarín	463,4 $\pm$ 3,7	463,4 $\pm$ 1,1	100,0
	Cereales de desayuno	132,7 $\pm$ 2,7	132,7 $\pm$ 2,0	100,0
	Cereales con cacao	944,7 $\pm$ 5,4	950,3 $\pm$ 2,3 ^b	100,6
t-test de parejas	$\bar{X}$ de las diferencias	σ de las diferencias	t _{calculada}	t _{crítica}
	-0,75	1,89	1,36	2,18

a. [Mg] = Media $\pm$ desviación estándar (n=3)

b. Se utilizó 0,0050 g de muestra debido a la elevada concentración de magnesio presente

ND: No detectado

Extracción y determinación de magnesio en muestras de frutos secos

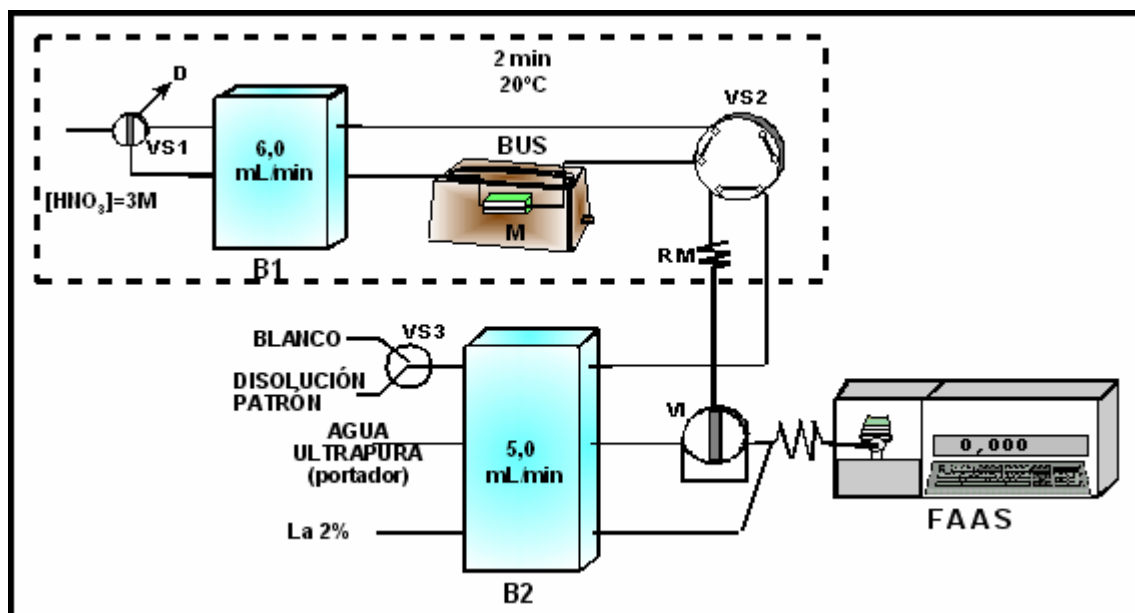


Figura 111. Sistema FIA utilizado para la determinación de magnesio en muestras de frutos secos indicando los valores óptimos de las variables implicadas en el proceso. B1 y B2, bombas peristálticas; BUS, baño de ultrasonidos; M, minicolumna; RM, reactor de mezcla; D, desecho; VS1, VS2 y VS3, válvulas de selección; VI, válvula de inyección y FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con llama.

Tabla 280. Características analíticas del método propuesto para la determinación de magnesio en muestras de frutos secos

Tipo de muestra	Cantidad de muestra (g)	LOD ($\mu\text{g/g}$)	LOQ ($\mu\text{g/g}$)	Sensibilidad para un 1% de absorción ($\mu\text{g/g}$)	Intervalo lineal ($\mu\text{g/g}$)
Frutos secos	0,0050	10,5	41,0	41,0	41,0 – 3000,0

Tabla 281. Resultados obtenidos en la determinación de magnesio en muestras reales de frutos secos. Aplicación del t-Test de parejas a los resultados obtenidos

Tipo de muestras	Muestras	[Mg] ($\mu\text{g/g}$, peso seco) ^a		(% Eficacia en la extracción)
		Método de referencia	Método propuesto	
Frutos Secos	Castañas	708,2 $\pm$ 13,6	709,2 $\pm$ 0,0	100,1
	Pistachos	1094,1 $\pm$ 8,9	1054,2 $\pm$ 5,3	96,3
	Cacahuètes	2008,5 $\pm$ 13,6	2015,1 $\pm$ 5,3	100,3
	Nueces	1444,4 $\pm$ 13,6	1436,1 $\pm$ 5,3	99,4
	Almendras	2195,5 $\pm$ 13,6	2193,7 $\pm$ 5,3	99,9
	Avellanas	1293,0 $\pm$ 13,6	1282,1 $\pm$ 0,0	99,2
t-test de parejas	$\bar{X}$ de las diferencias	σ de las diferencias	t _{calculada}	t _{crítica}
	7,90	16,85	1,15	2,57

a. [Mg] = Media $\pm$ desviación estándar (n=3)

Extracción y determinación de magnesio en muestras de legumbres

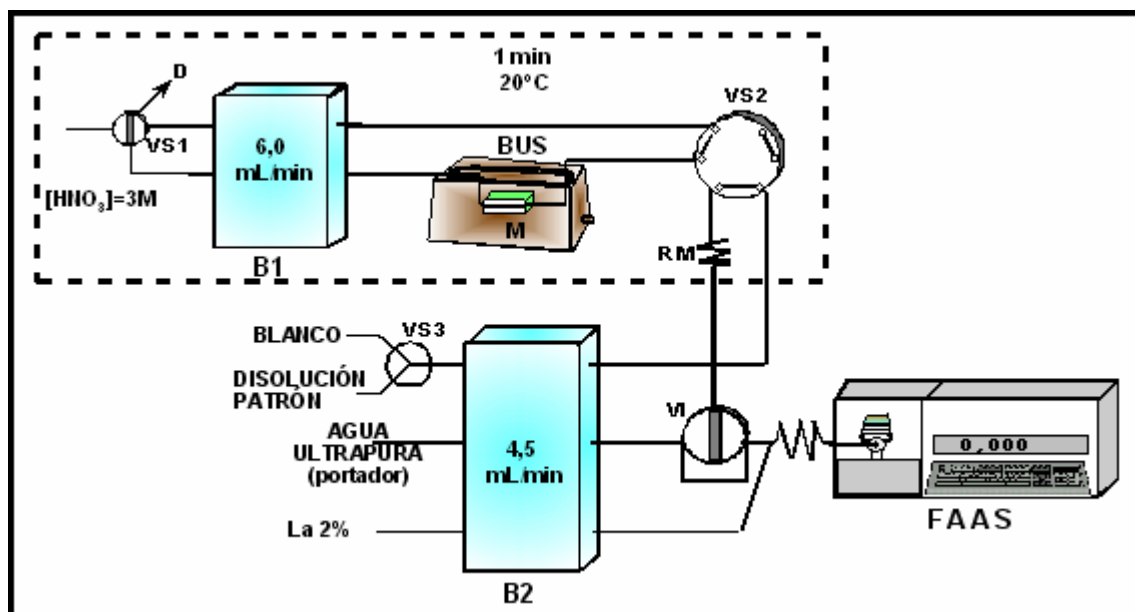


Figura 112. Sistema FIA utilizado para la determinación de magnesio en muestras de legumbres indicando los valores óptimos de las variables implicadas en el proceso. B1 y B2, bombas peristálticas; BUS, baño de ultrasonidos; M, minicolumna; RM, reactor de mezcla; D, desecho; VS1, VS2 y VS3, válvulas de selección; VI, válvula de inyección y FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con llama.

Tabla 282. Características analíticas del método propuesto para la determinación de magnesio en muestras de legumbres

Tipo de muestra	Cantidad de muestra (g)	LOD ($\mu\text{g/g}$)	LOQ ($\mu\text{g/g}$)	Sensibilidad para un 1% de absorción ($\mu\text{g/g}$)	Intervalo lineal ($\mu\text{g/g}$)
Legumbres	0,0050	6,3	24,6	24,6	24,6 – 1800,0

Tabla 283. Resultados obtenidos en la determinación de magnesio en muestras reales de legumbres. Aplicación del t-Test de parejas a los resultados obtenidos

Tipo de muestras	Muestras	[Mg] ($\mu\text{g/g}$, peso seco) ^a		(% Eficacia en la extracción)
		Método de referencia	Método propuesto	
Legumbres	Lentejas 1	862,6 $\pm$ 8,9	879,2 $\pm$ 5,9	101,9
	Lentejas 2	877,4 $\pm$ 13,6	875,3 $\pm$ 3,4	99,8
	Habas 1	1503,8 $\pm$ 8,9	1499,7 $\pm$ 3,4	99,7
	Habas 2	1494,9 $\pm$ 8,9	1489,9 $\pm$ 5,9	99,7
	Garbanzos 1	1186,2 $\pm$ 13,6	1182,6 $\pm$ 3,4	99,7
	Garbanzos 2	1263,4 $\pm$ 8,9	1255,0 $\pm$ 5,9	99,3
t-test de parejas	$\bar{X}$ de las diferencias	σ de las diferencias	t _{calculada}	t _{crítica}
	1,09	8,90	0,30	2,57

a. [Mg] = Media $\pm$ desviación estándar (n=3)

Extracción y determinación de magnesio en muestras de verduras, hortalizas y frutas

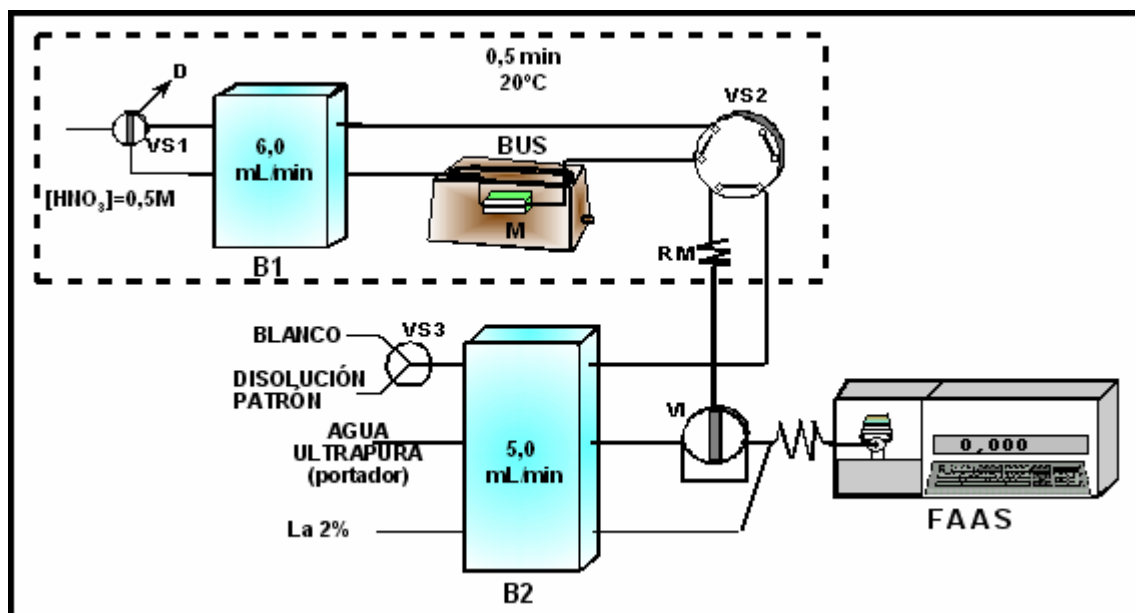


Figura 113. Sistema FIA utilizado para la determinación de magnesio en muestras de verduras, hortalizas y frutas indicando los valores óptimos de las variables implicadas en el proceso. B1 y B2, bombas peristálticas; BUS, baño de ultrasonidos; M, minicolumna; RM, reactor de mezcla; D, desecho; VS1, VS2 y VS3, válvulas de selección; VI, válvula de inyección y FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con llama.

Tabla 284. Características analíticas del método propuesto para la determinación de magnesio en muestras de verduras, hortalizas y frutas

Tipo de muestra	Cantidad de muestra (g)	LOD ($\mu\text{g/g}$)	LOQ ($\mu\text{g/g}$)	Sensibilidad para un 1% de absorción ($\mu\text{g/g}$)	Intervalo lineal ($\mu\text{g/g}$)
Legumbres	0,0050	10,5	41,0	41,0	41,0 – 3000,0

Tabla 285. Resultados obtenidos en la determinación de magnesio en muestras reales de verduras, hortalizas y frutas. Aplicación del t-Test de parejas a los resultados obtenidos

Tipo de muestras	Muestras	[Mg] ($\mu\text{g/g}$, peso seco) ^a		(%)Eficacia en la extracción
		Método de referencia	Método propuesto	
Verduras, hortalizas y frutas	Acelga	6435,5 $\pm$ 68,0	6425,7 $\pm$ 26,7 ^b	99,8
	Repollo	2400,3 $\pm$ 13,6	2406,2 $\pm$ 5,3	100,2
	Lombarda	3081,0 $\pm$ 68,0	3084,1 $\pm$ 46,2 ^b	100,1
	Lechuga	3941,9 $\pm$ 68,0	3992,6 $\pm$ 26,7 ^b	101,3
	Grelo	2183,6 $\pm$ 13,6	2178,3 $\pm$ 9,2	99,8
	Tila	3556,0 $\pm$ 44,5	3530,7 $\pm$ 26,7 ^b	99,3
	Manzanilla	2240,0 $\pm$ 13,6	2270,7 $\pm$ 9,2	101,4
	Té 1	1649,3 $\pm$ 13,6	1657,8 $\pm$ 5,3	100,5
	Té 2 (Inglés)	2498,3 $\pm$ 13,6	2544,8 $\pm$ 5,3	101,9
	Té 3 (Rojo)	2739,6 $\pm$ 68,0	2714,5 $\pm$ 46,2	99,1
	Té 4	2335,0 $\pm$ 13,6	2360,0 $\pm$ 5,3	101,1
	Escaramujo	2531,0 $\pm$ 13,6	2538,6 $\pm$ 9,2	100,3
	Manzana	1040,7 $\pm$ 8,9	1029,5 $\pm$ 5,3	98,9
	Zanahoria	1515,7 $\pm$ 13,6	1522,3 $\pm$ 9,2	100,4
	Calabacín	2257,8 $\pm$ 13,6	2273,8 $\pm$ 5,3	100,7
	Pera	331,2 $\pm$ 13,6	330,4 $\pm$ 9,2	99,8
	Albaricoque	616,2 $\pm$ 13,6	613,7 $\pm$ 5,3	99,6
	Plátano	1209,9 $\pm$ 8,9	1211,2 $\pm$ 5,3	100,1
	Patata	847,8 $\pm$ 13,6	13,6 $\pm$ 5,3	101,5
t-test de parejas	$\bar{X}$ de las diferencias	σ de las diferencias	t _{calculada}	t _{crítica}
	-7,07	20,43	1,51	2,10

a. [Mg] = Media $\pm$ desviación estándar (n=3)

b. Se utilizó 0,0020 g de muestra debido a la elevada concentración de magnesio presente

6.1.5 Extracción y determinación de manganeso

Extracción y determinación de manganeso en moluscos y pescados

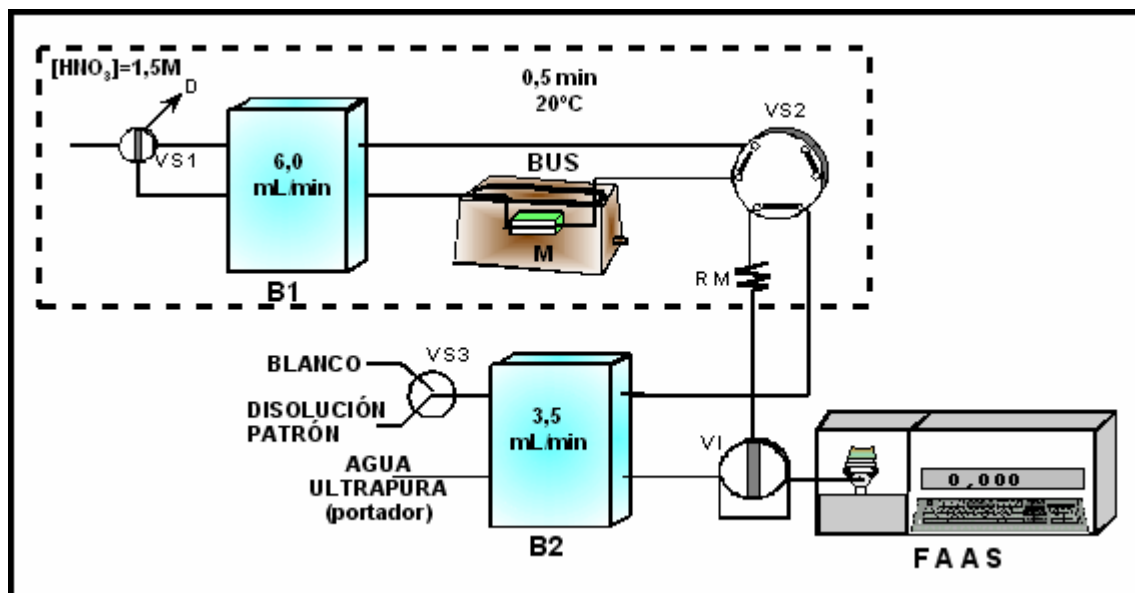


Figura 114. Sistema FIA utilizado para la determinación de manganeso en muestras de moluscos y pescados indicando los valores óptimos de las variables implicadas en el proceso. B1 y B2, bombas peristálticas; BUS, baño de ultrasonidos; M, minicolumna; RM, reactor de mezcla; D, desecho; VS1, VS2 y VS3, válvulas de selección; VI, válvula de inyección y FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con llama.

Tabla 286. Características analíticas del método propuesto para la determinación de manganeso en muestras de moluscos y pescados

Tipo de muestra	Cantidad de muestra (g)	LOD ($\mu\text{g/g}$)	LOQ ($\mu\text{g/g}$)	Sensibilidad para un 1% de absorción ($\mu\text{g/g}$)	Intervalo lineal ($\mu\text{g/g}$)
Moluscos y pescados	0,0300	0,7	0,7	2,3	2,3 – 73,3

Tabla 287. Resultados obtenidos en la determinación de manganeso en muestras reales de moluscos y pescados. Aplicación del t-Test de parejas a los resultados obtenidos

Tipo de muestras	Muestras	[Mn] ($\mu\text{g/g}$, peso seco) ^a		(%)Eficacia en la extracción
		Método de referencia	Método propuesto	
Moluscos y Pescados	Mejillón 1	4,8 $\pm$ 0,5	4,9 $\pm$ 0,3	102,2
	Mejillón 2	5,8 $\pm$ 0,5	5,6 $\pm$ 0,3	97,3
	Mejillón 3	5,8 $\pm$ 0,5	6,0 $\pm$ 0,3	103,5
	Mejillón 4	15,6 $\pm$ 0,5	15,7 $\pm$ 0,3	100,5
	Mejillón 5	2,7 $\pm$ 0,3	2,8 $\pm$ 0,3	103,0
	Mejillón 6	2,4 $\pm$ 0,5	2,4 $\pm$ 0,3	102,1
	Mejillón 7	3,0 $\pm$ 0,3	2,9 $\pm$ 0,3	97,8
	Mejillón 8	2,5 $\pm$ 0,3	2,6 $\pm$ 0,0	102,6
	Mejillón 9	10,4 $\pm$ 0,3	10,3 $\pm$ 0,3	99,3
	Mejillón 10	5,0 $\pm$ 0,3	4,9 $\pm$ 0,3	98,9
	Atún	5,8 $\pm$ 0,5	5,8 $\pm$ 0,0	100,4
	Sardina	4,8 $\pm$ 0,5	4,7 $\pm$ 0,0	98,5
	Merluza	ND	ND	-
	Cangrejo	ND	ND	-
	Langostino	6,3 $\pm$ 0,5	6,2 $\pm$ 0,3	98,3
	Navajas	6,0 $\pm$ 0,3	6,2 $\pm$ 0,3	103,7
	Zamburiñas	45,1 $\pm$ 0,5	45,2 $\pm$ 0,0	100,1
	Berberechos	44,0 $\pm$ 0,3	43,8 $\pm$ 0,3	99,5
	Almeja 1	4,8 $\pm$ 0,5	4,9 $\pm$ 0,3	102,2
	Almeja 2	5,0 $\pm$ 0,3	4,9 $\pm$ 0,3	98,9
t-test de parejas	$\bar{X}$ de las diferencias	σ de las diferencias	t _{calculada}	t _{crítica}
	0,00	0,12	0,00	2,09

a. [Mn] = Media $\pm$ desviación estándar (n=3)

ND: No detectado

Extracción y determinación de manganeso en muestras de carne

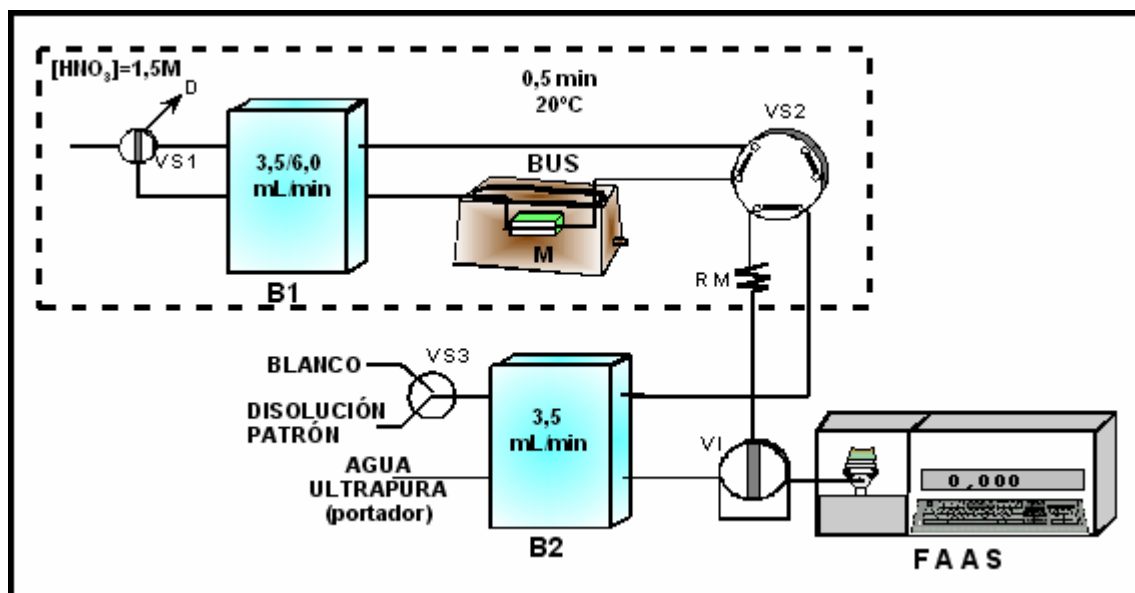


Figura 115. Sistema FIA utilizado para la determinación de manganeso en muestras de carne indicando los valores óptimos de las variables implicadas en el proceso. B1 y B2, bombas peristálticas; BUS, baño de ultrasonidos; M, minicolumna; RM, reactor de mezcla; D, desecho; VS1, VS2 y VS3, válvulas de selección; VI, válvula de inyección y FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con llama.

Tabla 288. Características analíticas del método propuesto para la determinación de manganeso en muestras de carne

Tipo de muestra	Cantidad de muestra (g)	LOD ($\mu\text{g/g}$)	LOQ ($\mu\text{g/g}$)	Sensibilidad para un 1% de absorción ($\mu\text{g/g}$)	Intervalo lineal ($\mu\text{g/g}$)
Carne	0,0300	0,7	2,3	2,3	2,3 – 73,3

Tabla 289. Resultados obtenidos en la determinación de manganeso en muestras reales de carne. Aplicación del t-Test de parejas a los resultados obtenidos

Tipo de muestras	Muestras	[Mn] ($\mu\text{g/g}$, peso seco) ^a		(% Eficacia en la extracción)
		Método de referencia	Método propuesto	
Carnes	Riñones de cordero ^b	$3,6 \pm 0,8$	$3,8 \pm 0,5$	104,7
	Hígado de conejo ^b	$3,1 \pm 0,8$	$3,1 \pm 0,3$	98,2
	Pollo ^b	$3,4 \pm 0,5$	$3,4 \pm 0,3$	99,3
	Ternera ^b	$8,4 \pm 0,5$	$8,5 \pm 0,3$	101,1
	Cerdo ^b	$7,9 \pm 0,5$	$7,9 \pm 0,3$	100,6
	Cordero ^b	$8,8 \pm 0,5$	$8,6 \pm 0,0$	97,5
	Pavo ^b	$3,6 \pm 0,8$	$3,8 \pm 0,5$	104,7
t-test de parejas	$\bar{X}$ de las diferencias	σ de las diferencias	t _{calculada}	t _{crítica}
	$3,50 \times 10^{-2}$	0,06	1,46	2,45

a. [Mn] = Media $\pm$ desviación estándar (n=3)b. Se ha realizado una adición de $1\mu\text{g/mL}$ de manganeso a la muestra

Extracción y determinación de manganeso en muestras de cereales y derivados

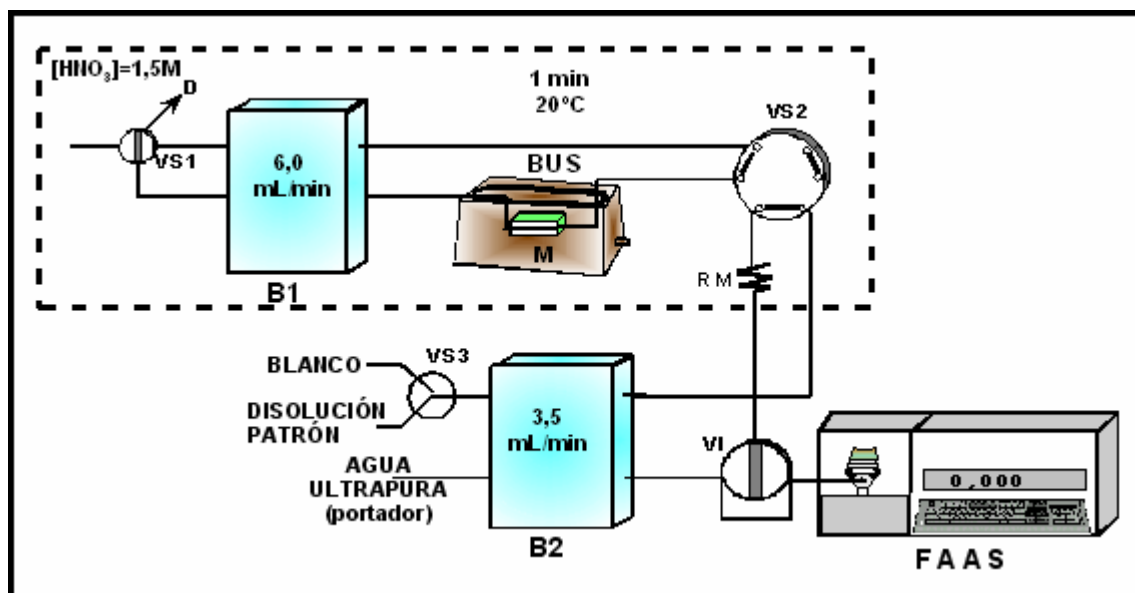


Figura 116. Sistema FIA utilizado para la determinación de manganeso en muestras de cereales y derivados indicando los valores óptimos de las variables implicadas en el proceso. B1 y B2, bombas peristálticas; BUS, baño de ultrasonidos; M, minicolumna; RM, reactor de mezcla; D, desecho; VS1, VS2 y VS3, válvulas de selección; VI, válvula de inyección y FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con llama.

Tabla 290. Características analíticas del método propuesto para la determinación de manganeso en muestras de cereales y derivados

Tipo de muestra	Cantidad de muestra (g)	LOD ($\mu\text{g/g}$)	LOQ ($\mu\text{g/g}$)	Sensibilidad para un 1% de absorción ($\mu\text{g/g}$)	Intervalo lineal ($\mu\text{g/g}$)
Cereales y derivados	0,0100	2,0	7,0	7,0	7,0 – 220,0
	0,0200	1,0	3,5	3,5	3,5 – 110,0
	0,0300	0,7	2,3	2,3	2,3 – 73,3

Tabla 291. Resultados obtenidos en la determinación de manganeso en muestras reales de cereales y derivados. Aplicación del t-Test de parejas a los resultados obtenidos

Tipo de muestras	Muestras	[Mn] ($\mu\text{g/g}$, peso seco) ^a		(%)Eficacia en la extracción
		Método de referencia	Método propuesto	
Cereales y derivados	Harina de Trigo	$4,8 \pm 0,5$	$4,9 \pm 0,3$	102,2
	Sémola de Trigo	$6,0 \pm 0,8$	$5,6 \pm 0,3$	94,6
	Harina Integral	$16,6 \pm 0,5$	$16,8 \pm 0,3$	101,1
	Harina Fina de Maiz	ND	ND	-
	Pan Rallado	$7,1 \pm 0,8$	$7,1 \pm 0,3$	99,6
	Obleas de helado	$7,4 \pm 0,6$	$7,6 \pm 0,3$	102,5
	Arroz	$5,6 \pm 0,8$	$5,6 \pm 0,3$	100,1
	Galletas	$3,5 \pm 0,8$	$3,5 \pm 0,3$	99,5
	Fideos sopa	$9,6 \pm 0,8$	$9,6 \pm 0,5$	100,3
	Spaguetty	$8,6 \pm 0,6$	$8,5 \pm 0,0$	99,2
	Tallarín	$9,9 \pm 0,8$	$10,0 \pm 0,6$	100,6
	Cereales de desayuno	ND	ND	-
	Cereales con cacao	$12,4 \pm 0,8$	$12,7 \pm 0,3$	102,4
t-test de parejas	$\bar{X}$ de las diferencias	σ de las diferencias	t _{calculada}	t _{crítica}
	$-4,36 \times 10^{-2}$	0,16	0,89	2,18

a. [Mn] = Media $\pm$ desviación estándar (n=3)

ND: No detectado

Extracción y determinación de manganeso en muestras de frutos secos

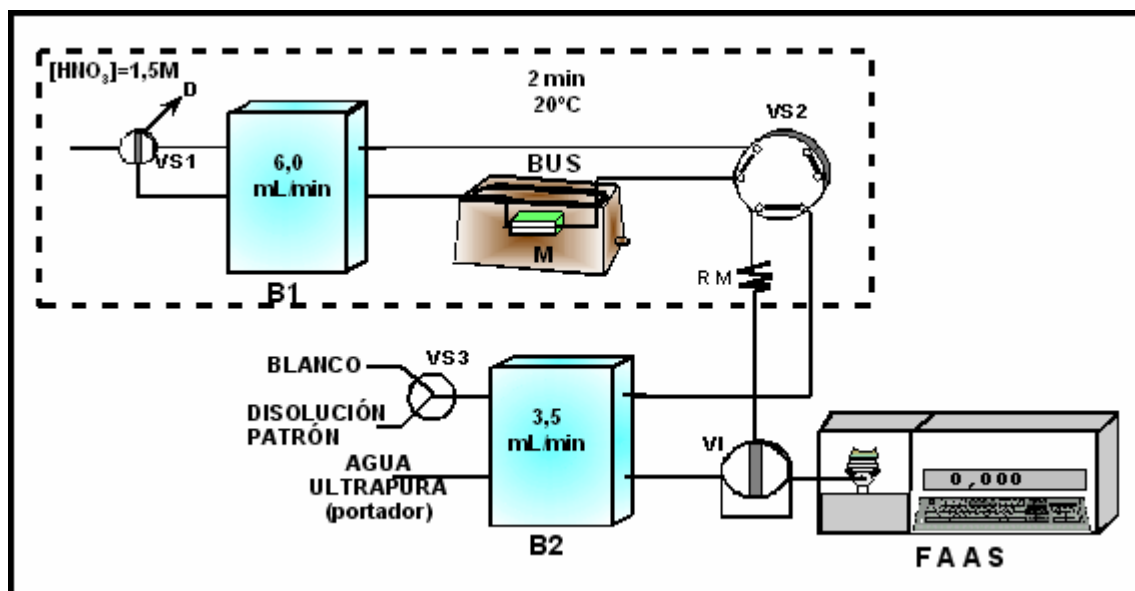


Figura 117. Sistema FIA utilizado para la determinación de manganeso en muestras de frutos secos indicando los valores óptimos de las variables implicadas en el proceso. B1 y B2, bombas peristálticas; BUS, baño de ultrasonidos; M, minicolumna; RM, reactor de mezcla; D, desecho; VS1, VS2 y VS3, válvulas de selección; VI, válvula de inyección y FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con llama.

Tabla 292. Características analíticas del método propuesto para la determinación de manganeso en muestras de frutos secos

Tipo de muestra	Cantidad de muestra (g)	LOD ($\mu\text{g/g}$)	LOQ ($\mu\text{g/g}$)	Sensibilidad para un 1% de absorción ($\mu\text{g/g}$)	Intervalo lineal ($\mu\text{g/g}$)
Frutos secos	0,0200	1,0	3,5	3,5	3,5 – 110,0
	0,0300	0,7	2,3	2,3	2,3 – 73,3

Tabla 293. Resultados obtenidos en la determinación de manganeso en muestras reales de frutos secos. Aplicación del t-Test de parejas a los resultados obtenidos

Tipo de muestras	Muestras	[Mn] ($\mu\text{g/g}$, peso seco) ^a		(% Eficacia en la extracción)
		Método de referencia	Método propuesto	
Frutos Secos	Castañas	32,0 $\pm$ 0,8	31,9 $\pm$ 0,3	99,6
	Pistachos	8,8 $\pm$ 1,0	9,1 $\pm$ 0,5	103,5
	Cacahuetes	14,0 $\pm$ 0,8	14,1 $\pm$ 0,3	100,7
	Nueces	29,7 $\pm$ 0,8	30,3 $\pm$ 0,3	101,8
	Almendras	14,5 $\pm$ 0,8	14,5 $\pm$ 0,0	99,8
	Avellanas	42,3 $\pm$ 0,8	42,1 $\pm$ 0,3	99,5
t-test de parejas	$\bar{X}$ de las diferencias	σ de las diferencias	t _{calculada}	t _{crítica}
	-0,10	0,29	0,86	2,57

a. [Mn] = Media $\pm$ desviación estándar (n=3)

Extracción y determinación de manganeso en muestras de legumbres

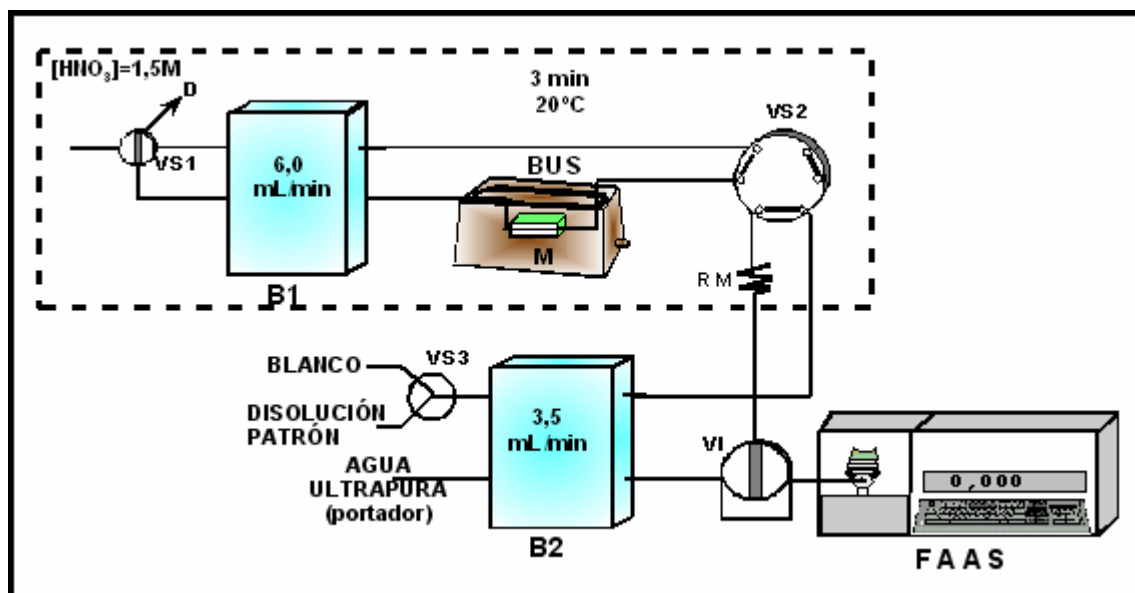


Figura 118. Sistema FIA utilizado para la determinación de manganeso en muestras de legumbres indicando los valores óptimos de las variables implicadas en el proceso. B1 y B2, bombas peristálticas; BUS, baño de ultrasonidos; M, minicolumna; RM, reactor de mezcla; D, desecho; VS1, VS2 y VS3, válvulas de selección; VI, válvula de inyección y FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con llama.

Tabla 294. Características analíticas del método propuesto para la determinación de manganeso en muestras de legumbres

Tipo de muestra	Cantidad de muestra (g)	LOD ($\mu\text{g/g}$)	LOQ ($\mu\text{g/g}$)	Sensibilidad para un 1% de absorción ($\mu\text{g/g}$)	Intervalo lineal ($\mu\text{g/g}$)
Legumbres	0,0300	0,7	2,3	2,3	2,3 – 73,3

Tabla 295. Resultados obtenidos en la determinación de manganeso en muestras reales de legumbres. Aplicación del t-Test de parejas a los resultados obtenidos

Tipo de muestras	Muestras	[Mn] ($\mu\text{g/g}$, peso seco) ^a		(% Eficacia en la extracción)
		Método de referencia	Método propuesto	
Legumbres	Lentejas 1	$12,8 \pm 0,8$	$13,0 \pm 0,3$	101,3
	Lentejas 2	$13,7 \pm 1,0$	$13,9 \pm 0,5$	101,8
	Habas 1	$12,2 \pm 1,0$	$12,3 \pm 0,5$	100,9
	Habas 2	$12,5 \pm 0,6$	$12,3 \pm 0,0$	98,2
	Garbanzos 1	$19,4 \pm 0,8$	$19,5 \pm 0,3$	100,4
	Garbanzos 2	$18,9 \pm 1,0$	$19,0 \pm 0,3$	100,2
t-test de parejas	$\bar{X}$ de las diferencias	σ de las diferencias	$t_{\text{calculada}}$	$t_{\text{crítica}}$
	$-1,33 \times 10^{-2}$	0,21	0,15	2,57

a. [Mn] = Media $\pm$ desviación estándar (n=3)

Extracción y determinación de manganeso en muestras de verduras, hortalizas y frutas

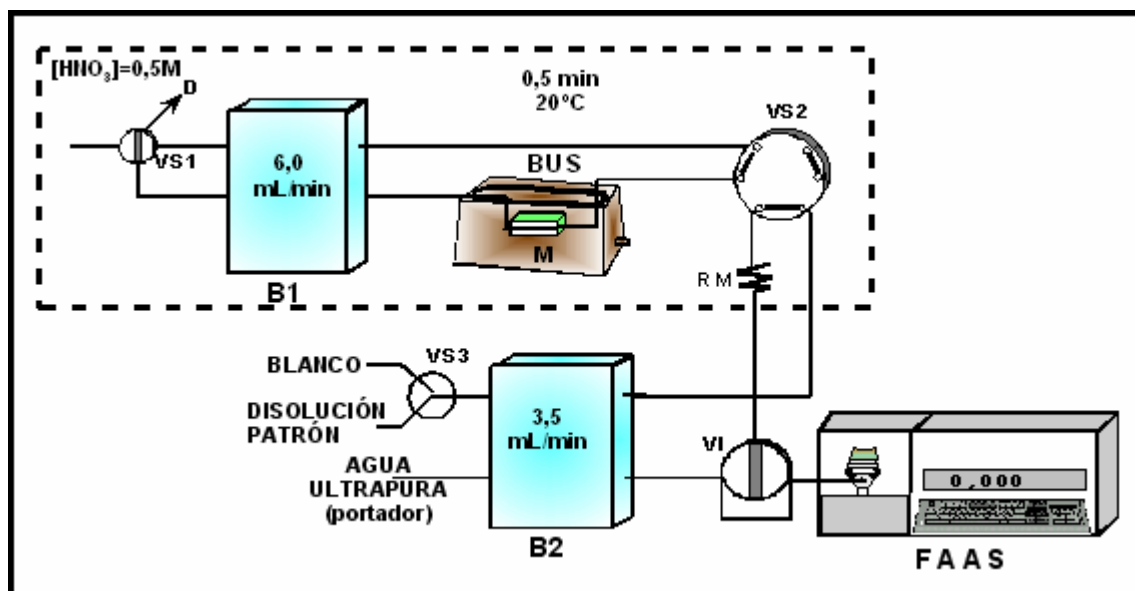


Figura 119. Sistema FIA utilizado para la determinación de manganeso en muestras de verduras, hortalizas y frutas indicando los valores óptimos de las variables implicadas en el proceso. B1 y B2, bombas peristálticas; BUS, baño de ultrasonidos; M, minicolumna; RM, reactor de mezcla; D, desecho; VS1, VS2 y VS3, válvulas de selección; VI, válvula de inyección y FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con llama.

Tabla 296. Características analíticas del método propuesto para la determinación de manganeso en muestras de verduras, hortalizas y frutas

Tipo de muestra	Cantidad de muestra (g)	LOD ($\mu\text{g/g}$)	LOQ ($\mu\text{g/g}$)	Sensibilidad para un 1% de absorción ($\mu\text{g/g}$)	Intervalo lineal ($\mu\text{g/g}$)
Verduras, hortalizas y frutas	0,0300	0,7	2,3	2,3	2,3 – 73,3

Tabla 297. Resultados obtenidos en la determinación de manganeso en muestras reales de verduras, hortalizas y frutas. Aplicación del t-Test de parejas a los resultados obtenidos

Tipo de muestras	Muestras	[Mn] ($\mu\text{g/g}$, peso seco) ^a		(%)Eficacia en la extracción
		Método de referencia	Método propuesto	
Verduras, hortalizas y frutas	Acelga ^c	370,1 $\pm$ 4,5	367,2 $\pm$ 1,9	99,2
	Repollo	19,1 $\pm$ 0,5	19,0 $\pm$ 0,3	99,3
	Lombarda	21,2 $\pm$ 0,8	21,1 $\pm$ 0,3	99,5
	Lechuga	35,3 $\pm$ 0,5	35,7 $\pm$ 0,3	101,1
	Grelo	27,6 $\pm$ 0,8	27,6 $\pm$ 0,3	99,9
	Tila ^c	118,4 $\pm$ 1,7	118,0 $\pm$ 1,9	99,7
	Manzanilla	50,0 $\pm$ 0,5	51,0 $\pm$ 0,3	101,8
	Té 1 ^d	1250,7 $\pm$ 14,7	1248,1 $\pm$ 9,3	99,8
	Té 2 (Inglés) ^d	764,0 $\pm$ 14,7	768,1 $\pm$ 9,3	100,5
	Té 3 (Rojo) ^d	655,9 $\pm$ 22,5	660,2 $\pm$ 16,2	100,7
	Té 4 ^d	488,7 $\pm$ 22,5	482,2 $\pm$ 16,2	98,7
	Escaramujo ^c	271,8 $\pm$ 4,5	277,7 $\pm$ 3,2	102,2
	Manzana ^b	ND	ND	-
	Zanahoria ^b	5,1 $\pm$ 0,8	5,0 $\pm$ 0,3	99,1
	Calabacín ^b	7,0 $\pm$ 0,8	7,0 $\pm$ 0,5	99,5
	Pera ^b	3,4 $\pm$ 0,5	3,4 $\pm$ 0,3	99,3
	Albaricoque ^b	3,4 $\pm$ 0,5	3,4 $\pm$ 0,3	99,3
	Plátano ^b	2,8 $\pm$ 0,8	2,9 $\pm$ 0,3	103,3
	Patata ^b	9,7 $\pm$ 0,8	9,7 $\pm$ 0,5	100,4
t-test de parejas	$\bar{X}$ de las diferencias	σ de las diferencias	t _{calculada}	t _{crítica}
	-0,15	2,67	0,25	2,10

a. [Mn] = Media $\pm$ desviación estándar (n=3)

b: Se ha realizado una adición de 1 $\mu\text{g/mL}$ a la muestra debido la baja concentración de manganeso presente

c: Se utilizó 0,0050 g de muestra debido a la elevada concentración de manganeso presente

d: Se utilizó 0,0010 g de muestra debido a la elevada concentración de manganeso presente

ND: No detectado

6.2 Aplicación del sistema continuo CUDS/FAAS para la disolución de la muestra y determinación de los metales en las muestras de leche en polvo y fórmulas infantiles

6.2.1 Disolución de la muestra y determinación de calcio y magnesio

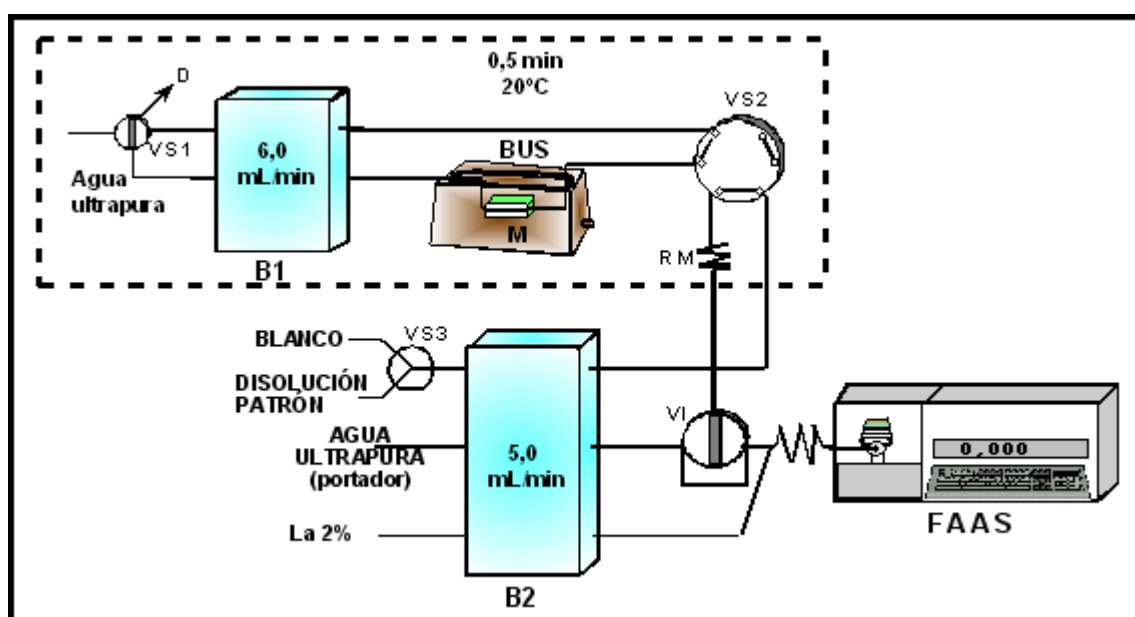


Figura 120. Sistema FIA utilizado para la determinación de calcio y magnesio en muestras de leche en polvo y fórmulas infantiles indicando los valores óptimos de las variables implicadas en el proceso. B1 y B2, bombas peristálticas; BUS, baño de ultrasonidos; M, minicolumna; RM, reactor de mezcla; D, desecho; VS1, VS2 y VS3, válvulas de selección; VI, válvula de inyección y FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con llama.

Tabla 298. Características analíticas del método propuesto para la determinación de calcio y magnesio en muestras de leche en polvo y fórmulas infantiles

Tipo de muestra	Cantidad de muestra (g)	LOD ($\mu\text{g/g}$)	LOQ ($\mu\text{g/g}$)	Sensibilidad para un 1% de absorción ($\mu\text{g/g}$)	Intervalo lineal ($\mu\text{g/g}$)
Ca	0,0050	150,0	600,0	600,0	600,0 – 27500,0
Mg	0,0050	10,5	41,0	41,0	41,0 – 3000,0

Tabla 299. Resultados obtenidos en la determinación de calcio y magnesio en muestras reales de leche en polvo y fórmulas infantiles. Aplicación del t-Test de parejas a los resultados obtenidos

Metal	Muestras	[Ca] ($\mu\text{g/g}$, peso seco) ^a		(%)Recuperación
		Método de referencia	Método propuesto	
Ca	Leche en polvo 1	15110 $\pm$ 135	15049 $\pm$ 81	99,6
	Leche en polvo 2	7954 $\pm$ 135	8035 $\pm$ 81	101,0
	Fórmula infantil 1	2867 $\pm$ 206	2891 $\pm$ 140	100,8
	Fórmula infantil 2	6198 $\pm$ 135	6164 $\pm$ 81	99,5
	Fórmula infantil 3	4398 $\pm$ 206	4434 $\pm$ 140	100,8
	Fórmula infantil 4	5523 $\pm$ 135	5510 $\pm$ 81	99,8
	Fórmula infantil 5	3317 $\pm$ 206	3312 $\pm$ 140	99,8
t-test de parejas	$\bar{X}$ de las diferencias	σ de las diferencias	t _{calculada}	t _{crítica}
	-38,8	47,4	0,21	2,45
Metal	Muestras	[Mg] ($\mu\text{g/g}$, peso seco) ^a		(%)Recuperación
		Método de referencia	Método propuesto	
Mg	Leche en polvo 1	429,2 $\pm$ 13,6	428,9 $\pm$ 5,3	99,9
	Leche en polvo 2	853,7 $\pm$ 8,9	854,0 $\pm$ 5,3	100,0
	Fórmula infantil 1	357,9 $\pm$ 13,6	358,1 $\pm$ 9,2	100,1
	Fórmula infantil 2	464,8 $\pm$ 13,6	465,9 $\pm$ 5,3	100,2
	Fórmula infantil 3	357,9 $\pm$ 13,6	358,1 $\pm$ 9,2	100,1
	Fórmula infantil 4	438,1 $\pm$ 13,6	435,1 $\pm$ 5,3	99,3
	Fórmula infantil 5	441,1 $\pm$ 13,6	438,2 $\pm$ 5,3	99,4
t-test de parejas	$\bar{X}$ de las diferencias	σ de las diferencias	t _{calculada}	t _{crítica}
	-0,42	3,59	0,31	2,45

a. [Me] = Concentración media del metal objeto de estudio $\pm$ desviación estándar (n=3)

6.2.2 Disolución de la muestra y determinación de cinc, cobre e hierro

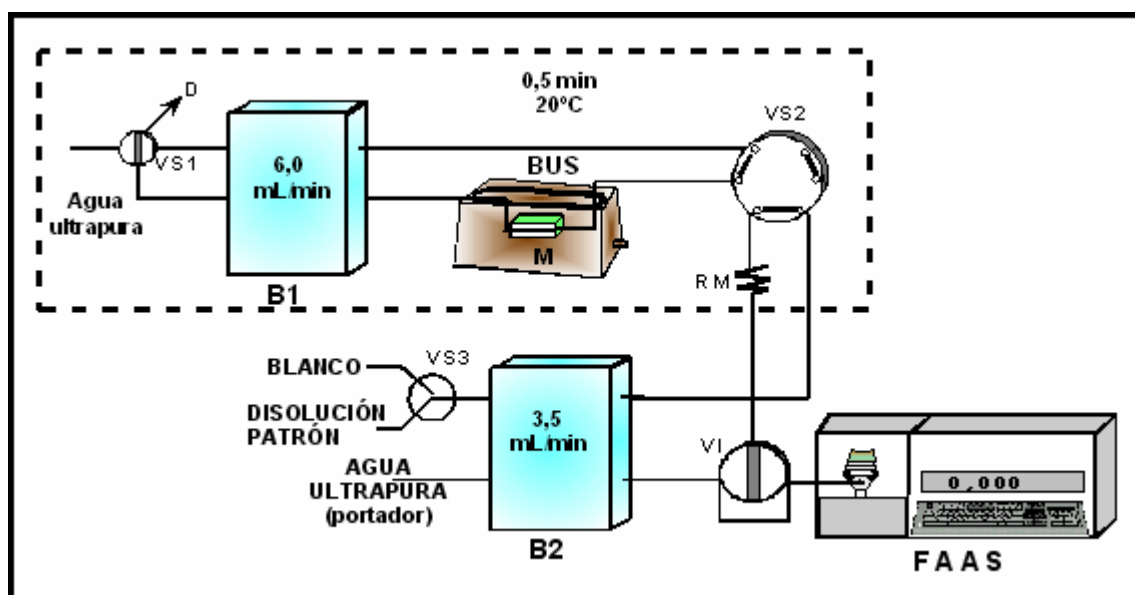


Figura 121. Sistema FIA utilizado para la determinación de cinc, cobre e hierro en muestras de leche en polvo y fórmulas infantiles indicando los valores óptimos de las variables implicadas en el proceso. B1 y B2, bombas peristálticas; BUS, baño de ultrasonidos; M, minicolumna; RM, reactor de mezcla; D, desecho; VS1, VS2 y VS3, válvulas de selección; VI, válvula de inyección y FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con llama.

Tabla 300. Características analíticas del método propuesto para la determinación de cinc, cobre e hierro en muestras de leche en polvo y fórmulas infantiles

Tipo de muestra	Cantidad de muestra (g)	LOD ($\mu\text{g/g}$)	LOQ ($\mu\text{g/g}$)	Sensibilidad para un 1% de absorción ($\mu\text{g/g}$)	Intervalo lineal ($\mu\text{g/g}$)
Zn	0,0100	0,4	2,0	2,0	2,0 – 110,0
Cu	0,0300	0,3	2,7	2,7	2,7 – 183,3
Fe	0,0300	1,0	4,3	4,3	4,3 – 183,3

Tabla 301. Resultados obtenidos en la determinación de cinc, cobre e hierro en muestras reales de leche en polvo y fórmulas infantiles. Aplicación del t-Test de parejas a los resultados obtenidos

Metal	Muestras	[Zn] ($\mu\text{g/g}$, peso seco) ^a		(%Recuperación)
		Método de referencia	Método propuesto	
Zn	Leche en polvo 1	48,9 $\pm$ 0,9	49,1 $\pm$ 0,3	100,5
	Leche en polvo 2	42,8 $\pm$ 0,9	43,1 $\pm$ 0,3	100,7
	Fórmula infantil 1	39,3 $\pm$ 0,9	39,2 $\pm$ 0,3	99,8
	Fórmula infantil 2	39,3 $\pm$ 0,9	39,6 $\pm$ 0,3	100,6
	Fórmula infantil 3	47,1 $\pm$ 0,9	46,7 $\pm$ 0,3	99,2
	Fórmula infantil 4	70,9 $\pm$ 0,5	70,5 $\pm$ 0,0	99,4
	Fórmula infantil 5	46,3 $\pm$ 0,9	46,9 $\pm$ 0,3	101,4
t-test de parejas	$\bar{X}$ de las diferencias	σ de las diferencias	t _{calculada}	t _{crítica}
	8,67x 10 ⁻²	0,44	0,51	2,45
Metal	Muestras	[Cu] ($\mu\text{g/g}$, peso seco) ^a		(%Recuperación)
		Método de referencia	Método propuesto	
Cu	Leche en polvo 1 ^b	6,1 $\pm$ 0,7	5,2 $\pm$ 1,0	100,5
	Leche en polvo 2 ^b	3,0 $\pm$ 1,0	2,8 $\pm$ 1,3	99,8
	Fórmula infantil 1 ^b	3,7 $\pm$ 1,0	3,4 $\pm$ 1,3	101,4
	Fórmula infantil 2 ^b	3,4 $\pm$ 0,7	3,2 $\pm$ 1,0	101,0
	Fórmula infantil 3 ^b	4,1 $\pm$ 0,7	3,9 $\pm$ 1,0	102,3
	Fórmula infantil 4 ^b	3,0 $\pm$ 1,0	2,8 $\pm$ 1,3	99,8
	Fórmula infantil 5 ^b	3,7 $\pm$ 1,0	3,7 $\pm$ 1,4	101,4
t-test de parejas	$\bar{X}$ de las diferencias	σ de las diferencias	t _{calculada}	t _{crítica}
	0,22	0,38	1,53	2,45
Metal	Muestras	[Fe] ($\mu\text{g/g}$, peso seco) ^a		(%Recuperación)
		Método de referencia	Método propuesto	
Fe	Leche en polvo 1	90,9 $\pm$ 2,7	91,1 $\pm$ 0,6	100,2
	Leche en polvo 2	63,6 $\pm$ 2,7	62,6 $\pm$ 0,6	98,4
	Fórmula infantil 1	65,6 $\pm$ 2,7	65,5 $\pm$ 0,6	99,8
	Fórmula infantil 2	85,5 $\pm$ 2,1	84,8 $\pm$ 0,6	99,2
	Fórmula infantil 3	97,0 $\pm$ 2,0	97,4 $\pm$ 0,0	100,5
	Fórmula infantil 4	81,5 $\pm$ 2,1	80,4 $\pm$ 0,6	98,6
	Fórmula infantil 5	41,3 $\pm$ 2,7	41,4 $\pm$ 0,6	100,1
t-test de parejas	$\bar{X}$ de las diferencias	σ de las diferencias	t _{calculada}	t _{crítica}
	-0,11	0,98	0,31	2,45

a. [Me] = Concentración media del metal objeto de estudio $\pm$ desviación estándar (n=3)

b. Se realizó una adición de 1 $\mu\text{g/mL}$ de Cu

7. ESTUDIO ESTADÍSTICO DE LOS PROCESOS DE EXTRACCIÓN PARA LOS METALES ESTUDIADOS EN LAS DIFERENTES MATRICES SÓLIDAS DE NATURALEZA ALIMENTICIA

Se ha estudiado estadísticamente la mayor o menor dificultad del proceso de extracción determinándose las similitudes y diferencias existentes entre las condiciones de extracción. De esta manera, el objetivo fue conseguir formar grupos de matrices sólidas y analitos que tienen propiedades similares en lo que se refiere a su comportamiento hacia la extracción.

Para llevar a cabo este estudio se ha aplicado el Análisis Jerárquico de Grupos, o como es más conocido, “Hierarchical Cluster Analysis” (HCA). Utilizando este método de análisis se produce la formación de grupos de los datos obtenidos como paso previo al estudio de la estructura detallada de los mismos. Este análisis describe la proximidad de los datos en base a la distancia Euclídea al cuadrado, construyendo una matriz de similitud entre los mismos que permite establecer grupos de datos de forma jerárquica (método de Ward’s). Este tipo de análisis tiene en cuenta en cada paso la heterogeneidad de la desviación (la suma de los cuadrados de la distancia de un dato con respecto al baricentro del grupo de los mismos) de cada posible grupo de datos que pueden crearse mediante la unión de dos grupos de datos existentes [168].

En este análisis se ha utilizado el software STATGRAPHICS 4.0 y se ha aplicado siguiendo dos enfoques diferentes:

- primero se ha aplicado el análisis de HCA a los valores óptimos obtenidos para cada variable en la extracción de un mismo metal en las diferentes matrices sólidas de naturaleza alimenticia para poder estudiar las similitudes y diferencias de las condiciones de extracción de cada metal en cada tipo de muestra

- en segundo lugar se aplicó el análisis de HCA a los valores óptimos obtenidos para cada variable en la extracción de los diferentes metales en la misma matriz sólida de naturaleza alimenticia para poder estudiar las similitudes y diferencias en la extracción de los diferentes metales en un mismo tipo de muestra

Estudio estadístico mediante HCA de la extracción de calcio en los diferentes tipos de muestras sólidas de naturaleza alimenticia

Se ha aplicado el HCA a los valores óptimos obtenidos para las variables que afectan a la extracción de calcio en las matrices sólidas de naturaleza alimenticia estudiadas (Figura 122).

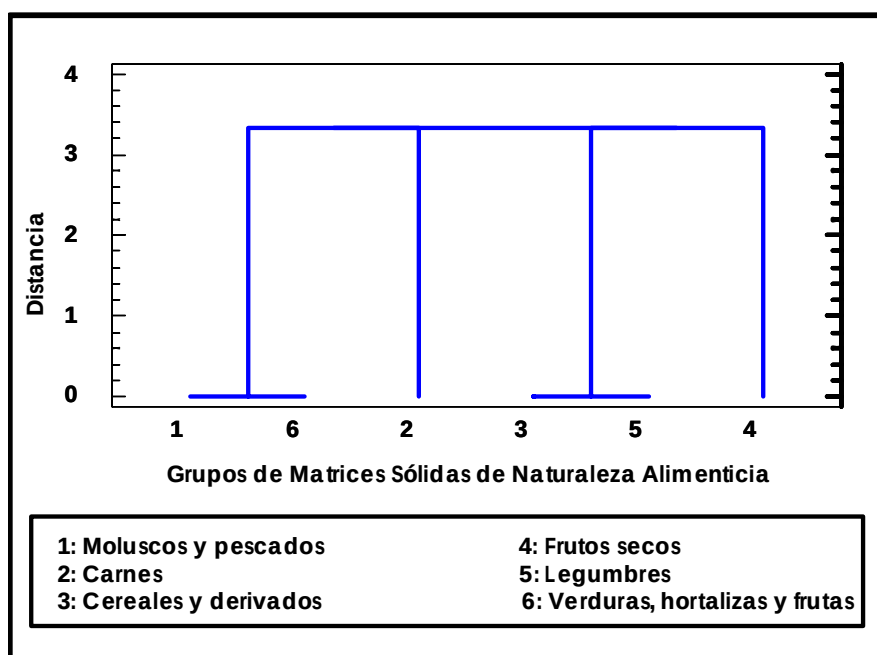


Figura 122. Dendrograma proporcionado por el análisis de HCA al aplicarlo a los valores óptimos de cada variable en la extracción de calcio en las diferentes matrices sólidas.

Los resultados obtenidos en el dendrograma proporcionado por el análisis de HCA indican que las extracciones de calcio en los diferentes tipos de muestras de alimentos se pueden dividir principalmente en cuatro grupos. Esta división atiende a la concentración ácida necesaria en la disolución

extractante y al tiempo de sonicación necesario para llevar a cabo la extracción, ya que las demás variables presentan el mismo valor óptimo para todos los tipos de matrices estudiadas (temperatura de extracción=20°C, caudal de extracción=6mL/min, volumen de disolución extractante=1mL y [La]=2%). Así, en los resultados obtenidos se observa:

- Un primer grupo constituido por los moluscos y pescados y las verduras, hortalizas y frutas (tipos de muestra 1 y 6). Estos tipos de muestras necesitan una concentración de HNO_3 3M y un tiempo de sonicación de 0,5 min.
- Un segundo grupo formado por las muestras de carne, muestras que necesitan una disolución extractante de HNO_3 1,5 M y 0,5 min de sonicación para obtener %eficacia en la extracción cuantitativos (tipo de muestra 2).
- Un tercer grupo formado por las muestras de cereales y derivados y legumbres. Estas muestras necesitan también una disolución extractante de HNO_3 1,5 M, pero en este caso el tiempo de sonicación necesario es de 1 min (tipos de muestra 3 y 5).
- Un cuarto grupo constituido por las muestras de frutos secos. Estos tipos de muestras necesitan una concentración de HNO_3 3M y un tiempo de sonicación de 1 min (tipo de muestra 4).

Sin embargo, observando el dendograma proporcionado por el análisis de HCA y teniendo en cuenta los valores óptimos para el tiempo de sonicación en la extracción de calcio, se puede realizar una clasificación alternativa de los grupos de muestras. Así, se puede realizar una clasificación de dichas matrices dividiéndolas en dos grupos en función del tiempo de sonicación:

- Un primer grupo formado por las muestras de moluscos y pescados, las muestras de verduras, hortalizas y frutas y las muestras de carne. Estas muestras requieren 0,5 min de sonicación para proporcionar resultados cuantitativos, y de hecho observando el dendograma este tipo de

muestras se sitúan en la mitad izquierda del mismo (tipos de muestras 1, 6 y 2).

- Un segundo grupo formado por aquellas muestras que requieren 1 min de sonicación en la extracción óptima del calcio. Las muestras forman este grupo son los cereales y derivados, las legumbres y los frutos secos. Así, recurriendo de nuevo el dendograma se observa que este tipo de matrices se encuentran situadas en la mitad derecha del mismo (tipos de muestras 3, 5 y 4).

En resumen, se observa que las diferencias fundamentales en la extracción de calcio en las diferentes muestras sólidas de naturaleza alimenticia vienen dadas por la concentración ácida presente en la disolución extractante y por el tiempo de sonicación. Atendiendo a estas dos variables se concluye que el tipo de muestras donde el calcio requiere las condiciones más drásticas para ser extraído son los frutos secos ya que presentan valores óptimos más elevados para estas dos variables que las demás matrices estudiadas ($[\text{HNO}_3]=3\text{M}$ y un tiempo de sonicación de 1 min).

Estudio estadístico mediante HCA de la extracción de cinc en los diferentes tipos de muestras sólidas de naturaleza alimenticia

Se ha aplicado el HCA a los valores óptimos obtenidos para las variables que afectan a la extracción de cinc en las matrices sólidas de naturaleza alimenticia estudiadas (Figura 123).

Los resultados obtenidos en el dendograma proporcionado por el análisis de HCA indican que las extracciones de cinc en los diferentes tipos de muestras de alimentos se pueden dividir principalmente en dos grupos. Estos dos grupos se han formado en función de la concentración ácida necesaria para extraer el cinc de los diferentes tipos de muestras, ya que las demás variables tienen el mismo valor óptimo independiente del tipo de matriz en la que se realiza la extracción (tiempo de sonicación=0,5 min, temperatura de extracción=20°C, caudal de extracción=6mL/min y volumen de disolución extractante=1mL). Los grupos formados son:

- Un primer grupo constituido por aquellas muestras que necesitan una concentración de disolución extractante entre 0,2 y 0,4 M, ambos valores inclusive, para obtener resultados cuantitativos. Dentro de este grupo se encuentran las muestras de moluscos y pescados, cereales y derivados, legumbres, verduras, hortalizas y frutas y de frutos secos (tipos de muestras 1, 3, 5, 6 y 4).
- Un segundo grupo que está formado por aquellas muestras que requieren una concentración ácida en su disolución extractante mayor que 0,4M. En este grupo sólo se encuentran las muestras de carne (tipo de muestra 2), ya que la concentración óptima de la disolución extractante es de 0,75M. Esta concentración 0,75M puede ser bien de HNO_3 o de HCl , pues para este tipo de muestras ambos ácidos proporcionan resultados cuantitativos a esta concentración.

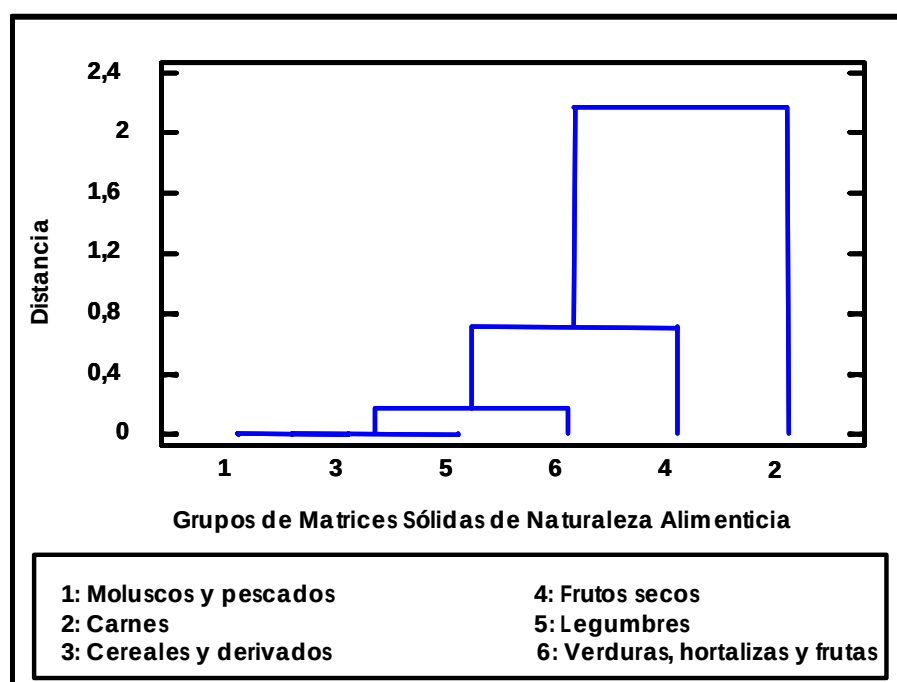


Figura 123. Dendrograma proporcionado por el análisis de HCA al aplicarlo a los valores óptimos de cada variable en la extracción de cinc en las diferentes matrices sólidas.

Dentro del primer grupo de muestras, aquel formado por muestras que necesitan una concentración de disolución extractante entre 0,2 y 0,4 M, ambos valores inclusive, para obtener resultados cuantitativos, se observa que hay tres subgrupos. El primer subgrupo (tipos de muestra 1,3,5) está formado por las muestras de moluscos y pescados, cereales y derivados y legumbres, debido a que estas muestras necesitan la misma concentración de ácido ($[\text{HNO}_3]=0,2\text{ M}$) para obtener un %eficacia en la extracción cuantitativo. En el caso de los cereales y derivados y las legumbres, también proporciona resultados cuantitativos una disolución extractante de HCl 0,2 M. El segundo y tercer subgrupo los forman las muestras de verduras, hortalizas y frutas y las muestras de frutos secos, respectivamente (tipos de muestra 6 y 4). Estos dos tipos de muestras necesitan una disolución extractante de concentración HNO_3 0,1M y 0,4 M, respectivamente.

En resumen, las muestras que ofrecen una mayor dificultad para la extracción de cinc, en cuanto a concentración ácida de la disolución extractante se refiere, ya que las demás variables del proceso de extracción son idénticas independientemente del tipo de matriz, son las muestras de carne seguidas de las muestras de frutos secos, pero aún así las concentraciones de ácido nítrico necesarias son muy bajas (0,75 y 0,4 M, respectivamente).

Estudio estadístico mediante HCA de la extracción de cobre en los diferentes tipos de muestras sólidas de naturaleza alimenticia

Se ha aplicado el HCA a los valores óptimos obtenidos para las variables que afectan a la extracción de cobre en las matrices sólidas de naturaleza alimenticia estudiadas (Figura 124).

Los resultados obtenidos en el dendograma proporcionado por el análisis de HCA indican que las extracciones de cobre en los diferentes tipos de muestras de alimentos se pueden dividir dos grupos principales, atendiendo al caudal de extracción, y dentro de éstos, en diferentes subgrupos en función del tiempo de sonicación (las demás variables son idénticas independientemente del tipo de muestra ($[\text{HNO}_3]=3\text{M}$, $[\text{HCl}]=0\text{M}$, temperatura

de extracción=20°C y volumen de disolución extractante=1mL). Los dos grupos principales formados son:

- Un primer grupo constituido por los moluscos y pescados, las verduras, hortalizas y frutas, los cereales y derivados, las legumbres y los frutos secos (tipos de muestra 1, 6, 3, 5 y 4). En este grupo, las extracciones necesitan entre 0,5 y 2 min de tiempo de sonicación a un caudal de extracción de 6 mL/min.
- Un segundo grupo formado por las muestras de carne (tipo de muestra 2). La extracción en este tipo de muestras necesita 3 min de tiempo de sonicación a un caudal de 3,5 mL/min. La extracción de cobre en este tipo de muestras es un caso particular, como se refleja en el dendograma (Figura 124). Esto se debe principalmente a que este tipo de muestras requieren un mayor tiempo de sonicación que las demás muestras (3min). La concentración ácida necesaria no difiere del primer grupo de muestras (3M) que en este caso puede ser bien de HNO_3 o de HCl . Sin embargo, la variable que hace que esta extracción difiera de las demás es que el caudal de extracción, que en este caso es de 3,5 mL/min. Esto, como ya se ha explicado en los estudios de optimización de la extracción, se explica teniendo en cuenta la matriz de las muestras de carne, la cantidad de muestra necesaria debido a la baja concentración de cobre existente (0,03 g) y al hecho de que la extracción requiere mayor tiempo que en los casos anteriores. Estos factores hacen que, si el caudal es elevado (6 mL/min), la muestra comience a compactarse dentro de la columna tras unos minutos de sonicación y necesite mayor tiempo para extraer cuantitativamente el metal. Sin embargo, si el caudal es menor, no se genera el moviendo rápido de las partículas que constituyen la muestra y que hace que ésta se compacte, y por tanto, los resultados en la extracción son mejores en menor tiempo.

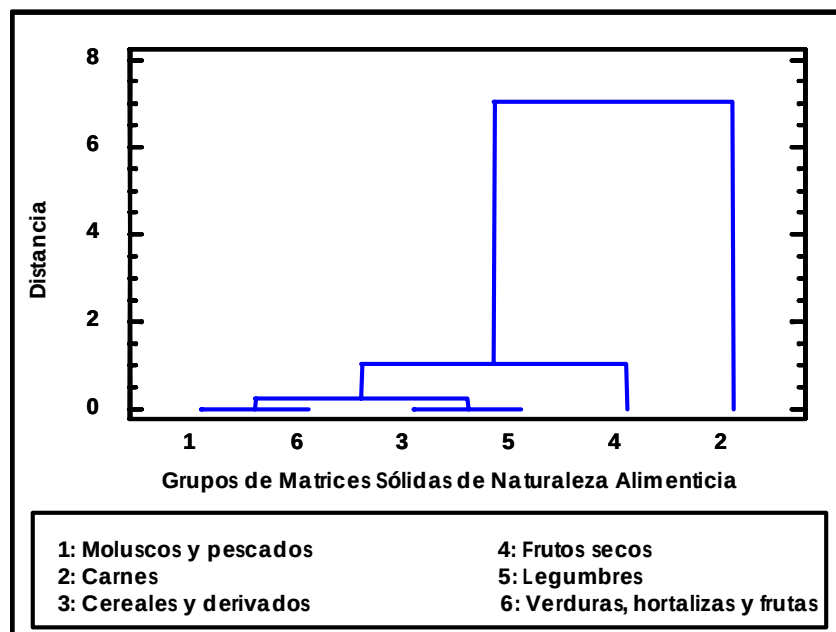


Figura 124. Dendrograma proporcionado por el análisis de HCA al aplicarlo a los valores óptimos de cada variable en la extracción de cobre en las diferentes matrices sólidas.

Dentro del primer grupo de muestras, las muestras se encuentran subagrupadas en función del tiempo de sonicación necesario para extraer el cobre, dando lugar a tres subgrupos. Así, las muestras que forman el primer subgrupo, moluscos y pescados y verduras, hortalizas y frutas (tipos de muestras 1 y 6) necesitan 1 min para extraer el metal; el siguiente subgrupo formado por las muestras de cereales y derivados y las legumbres (tipos de muestras 3 y 5) necesitan 0,5 min y el tercer subgrupo formado por los frutos secos (tipo de muestra 4) necesita 2 min para obtener %eficacia en la extracción cuantitativas.

En resumen, las muestras que ofrecen una mayor dificultad para la extracción de cobre, son las muestras de carne ya que necesitan el tiempo de sonicación más elevado, además de necesitar la mayor concentración ácida utilizada en la extracción de este metal (HNO_3 o HCl 3M), hecho que también ocurre para el primer grupo de muestras del dendrograma.

Estudio estadístico mediante HCA de la extracción de hierro en los diferentes tipos de muestras sólidas de naturaleza alimenticia

Se ha aplicado el HCA a los valores óptimos obtenidos para las variables que afectan a la extracción de hierro en las matrices sólidas de naturaleza alimenticia estudiadas (Figura 125).

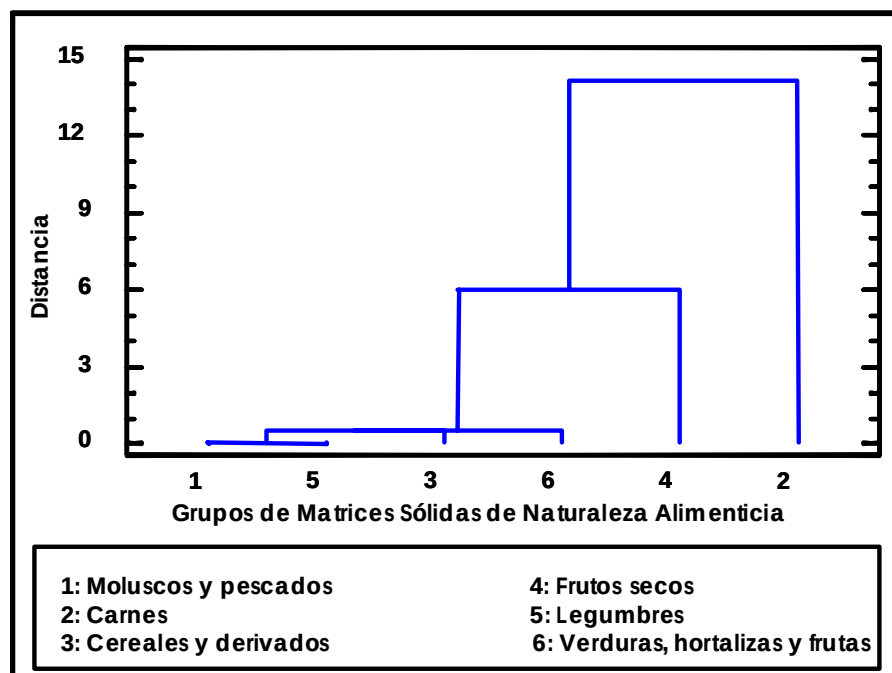


Figura 125. Dendrograma proporcionado por el análisis de HCA al aplicarlo a los valores óptimos de cada variable en la extracción de hierro en las diferentes matrices sólidas.

Los resultados obtenidos en el dendrograma proporcionado por el análisis de HCA indican que las extracciones de hierro en los diferentes tipos de muestras de alimentos se pueden dividir principalmente en dos grupos, que vienen dados en función de la concentración ácida de la disolución extractante, el tiempo de sonicación y el caudal de extracción (las demás variables son idénticas independientemente del tipo de muestra: temperatura de extracción=20°C y caudal de extracción=6mL/min). Así los dos grupos principales formados son:

- Un primer grupo constituido por los moluscos y pescados, las legumbres, los cereales y derivados, las verduras, hortalizas y frutas y los frutos secos

(tipos de muestras 1, 5, 3, 6, y 4). Para estas muestras la extracción se realiza con una disolución extractante de HNO_3 1,5-3 M (ambos valores inclusive) y durante un tiempo de sonicación de 1-3 min a un caudal de 6 mL/min.

- El segundo grupo lo forman solamente las muestra de carnes (tipo de muestra 2), ya que la extracción hierro en dicha matriz es una caso bastante diferente. Esto es debido a que la concentración ácida necesaria es mucho mayor que para las demás muestras ($\text{HNO}_3\text{:HCl}$ 3M-3M) y el tiempo de sonicación también es mucho más elevado (5 min). Otro factor que hace diferente la extracción de hierro en este tipo de muestras es el caudal de extracción, que debido a la a la complejidad de la muestra y al elevado tiempo de sonicación, hace que la muestra se compacte dentro de la columna a caudales elevados (6mL/min, que es el caudal óptimo para los demás tipos de muestras) y sea a caudales bajos (3,5 mL/min) cuando la extracción proporcione mejores resultados.

Dentro del primer grupo, los tipos de muestras se clasifican en dos subgrupos en función de la concentración ácida de la disolución extractante. Así, en un primer subgrupo se encuentran aquellos tipos de muestras que necesitan como disolución extractante HNO_3 3M para extraer al hierro (moluscos y pescados, legumbres, cereales y derivados, verduras, frutas y hortalizas y frutos secos; tipos de muestras 1, 5, 3 y 6) y en el segundo subgrupo se encuentran los frutos secos (tipo de muestra 4), pues este tipo de muestras necesitan una concentración menor del mismo ácido. Dentro de este primer subgrupo (muestras que necesitan una $[\text{HNO}_3]=3\text{M}$), se observan de otros tres subgrupos formados en función del tiempo de sonicación. Así, las muestras de moluscos y pescados forman el primer subgrupo ya que necesitan 3 min de sonicación; y las muestras de cereales y derivados y verduras, hortalizas y frutas constituyen el segundo y tercer subgrupo ya que necesitan 2 y 1 min de sonicación, respectivamente.

En resumen, tal y como ha ocurrido en la extracción de cobre, las muestras que ofrecen una mayor dificultad para la extracción de hierro son las muestras de carne, ya que necesitan una concentración ácida elevada en la disolución

extractante (3M:3M HNO₃:HCl), además de un elevado tiempo de sonicación (5min).

Estudio estadístico mediante HCA de la extracción de magnesio en los diferentes tipos de muestras sólidas de naturaleza alimenticia

Se ha aplicado el HCA a los valores óptimos obtenidos para las variables que afectan a la extracción de magnesio en las matrices sólidas de naturaleza alimenticia estudiadas (Figura 126).

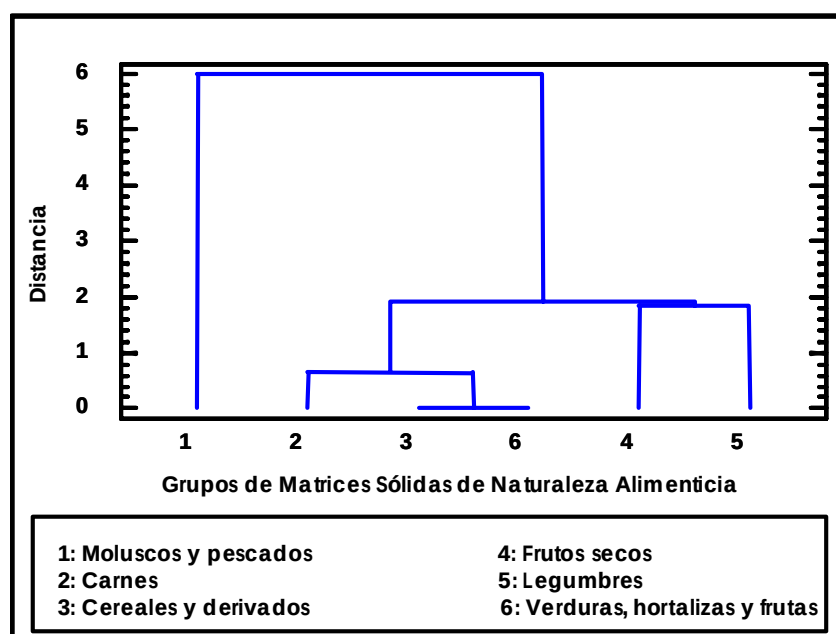


Figura 126. Dendrograma proporcionado por el análisis de HCA al aplicarlo a los valores óptimos de cada variable en la extracción de magnesio en las diferentes matrices sólidas.

Los resultados obtenidos en el dendrograma proporcionado por el análisis de HCA indican que las extracciones de magnesio en los diferentes tipos de muestras de alimentos se pueden dividir principalmente en tres grupos en función de la acidez de la disolución extractante, el tiempo de sonicación y el volumen de disolución extractante (las demás variables son idénticas independientemente del tipo de muestra: temperatura de extracción=20°C, caudal de extracción=6mL/min, [La]=2%). Así los grupos formados son:

- Un primer grupo el primer grupo está constituido por los moluscos y pescados (tipo de muestra 1)
- Un segundo grupo donde se encuadran los demás tipos de muestras, las muestras de carne, cereales y derivados, las verduras, hortalizas y frutas, las carnes, frutos secos y legumbres (tipos de muestra 2, 3, 6, 4 y 5)

Esta primera división de las muestras se realiza en función del volumen de disolución extractante, ya que en el caso de los moluscos y pescados el volumen de la misma es el doble que en los demás casos (2 mL) debido a las elevadas concentraciones de magnesio presentes en este tipo de muestras. Para este tipo de muestras la disolución extractante es una disolución de HNO_3 3M y el tiempo de sonicación 2 min.

En el segundo grupo de muestras, hay una subdivisión en tres grupos que viene dada por el tiempo de sonicación. Así, hay un primer subgrupo donde el tiempo de sonicación es de 0,5 min donde se encuentran las muestras de carne, cereales y derivados y las verduras, hortalizas y frutas. En el segundo y tercer subgrupo se encuentran las muestras cuyos tiempos de sonicación son de 2min (frutos secos) y 1min (legumbres), respectivamente. Para estos dos últimos subgrupos la concentración de HNO_3 utilizada es la extracción es 3M. Sin embargo, entro del primer subgrupo se realiza de nuevo otra subdivisión en función de la concentración de HNO_3 , ya que para las muestras de carne se necesita una concentración 1,5 M y para las muestras de cereales y derivados y las verduras, hortalizas y frutas la concentración necesaria es de 0,5 M.

En resumen, las extracciones de magnesio que requieren mayor tiempo y una mayor concentración ácida en la disolución extractante son las muestras de moluscos y pescados y de frutos secos ($[\text{HNO}_3]=3\text{M}$ y $t=2$ min), seguidas de las muestras de legumbres donde sólo se necesita un minuto menos en el tiempo de extracción y la misma disolución extractante.

Estudio estadístico mediante HCA de la extracción de manganeso en los diferentes tipos de muestras sólidas de naturaleza alimenticia

Se ha aplicado el HCA a los valores óptimos obtenidos para las variables que afectan a la extracción de manganeso en las matrices sólidas de naturaleza alimenticia estudiadas (Figura 127).

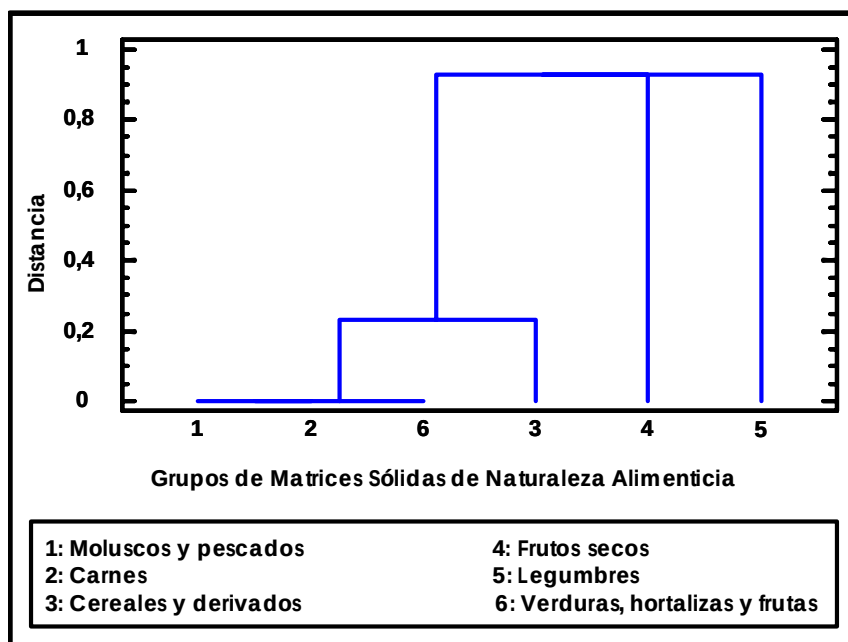


Figura 127 Dendrograma proporcionado por el análisis de HCA al aplicarlo a los valores óptimos de cada variable en la extracción de manganeso en las diferentes matrices sólidas.

Los resultados obtenidos en el dendrograma proporcionado por el análisis de HCA indican que las extracciones de manganeso en los diferentes tipos de muestras de alimentos se pueden dividir principalmente en tres grupos en función del tiempo de sonicación (ya que las demás variables son idénticas independientemente del tipo de muestra: $[\text{HNO}_3]=1,5 \text{ M}$, $[\text{HCl}]=0 \text{ M}$, temperatura de extracción= 20°C , caudal de extracción= 6mL/min y volumen de disolución extractante= 1mL). Los grupos formados son:

- Un primer grupo está constituido por aquellas muestras que necesitan tiempos de sonicación menores en la extracción de manganeso. Así, en este primer grupo se encuentran dos subgrupos, unos formado por las

muestras que requieren 0,5 min de sonicación (moluscos y pescados, carnes y verduras, hortalizas y frutas; tipos de muestras 1, 2 y 6) y las que requieren 1 min (cereales y derivados; tipo de muestra 3)

- El segundo grupo está formado sólo por las muestras frutos secos, que requieren 2 min de sonicación en el proceso de extracción
- El tercer grupo lo constituyen las muestras que necesitan 3 min de sonicación en el proceso de extracción, que son las muestras de legumbres

En conclusión, si se observa el dendograma se la disposición de las muestras de izquierda a derecha es en orden ascendente de tiempo de sonicación desde 0,5 hasta 3 min. Esto ocurre porque en este caso todas las variables son idénticas independientemente del tipo de matriz, excepto la variable tiempo de sonicación. Así, las extracciones de manganeso que requieren mayor tiempo de sonicación corresponde a las muestras de las legumbres (3min) seguidas de las muestras de frutos secos y cereales que consumen 1 y 2 min.

Una vez estudiadas estadísticamente las similitudes y diferencias existentes en las extracciones de un mismo metal en cada tipo de muestra sólida, se han estudiado estadísticamente aplicando también HCA las similitudes y diferencias de la extracción de los diferentes metales en un mismo tipo de muestra sólida.

Estudio estadístico mediante HCA de la extracción de los diferentes metales de muestras las muestras de moluscos y pescados

Se ha aplicado el HCA a los valores óptimos obtenidos para las variables que afectan a la extracción de calcio, cinc, cobre, hierro, magnesio y manganeso en las muestras de moluscos y pescados (Figura 128).

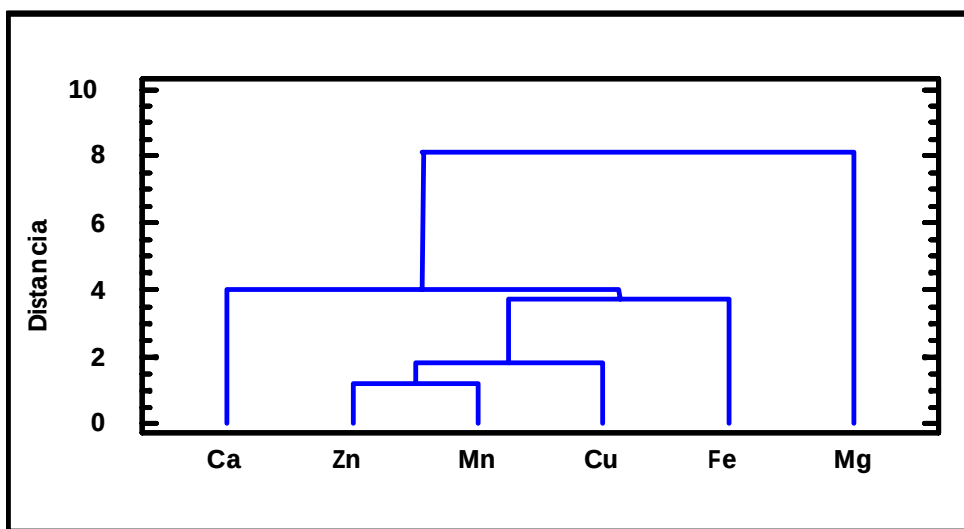


Figura 128. Dendrograma proporcionado por el análisis de HCA al aplicarlo a los valores óptimos de cada variable en la extracción de calcio, cinc, cobre, hierro, magnesio y manganeso en muestras de moluscos y pescados.

En los resultados obtenidos en el dendrograma proporcionado por el análisis de HCA indican que las condiciones para las extracciones de los diferentes metales en moluscos y pescados se pueden dividir principalmente en dos grupos en función de la concentración ácida y del volumen utilizado de disolución extractante, el tiempo de sonicación y la concentración de lantano (utilizada en la extracción de calcio y magnesio), ya que las demás variables son idénticas independiente del metal extraído (temperatura de extracción=20°C y caudal de extracción=6mL/min). Así, el primer criterio que da lugar a la formación de grupos de metales es el volumen de disolución extractante utilizada, dando lugar a dos grupos de metales:

- Un primer grupo donde se encuentran el Ca, Zn, Mn, Cu y Fe, que utilizan 1 mL de disolución extractante
- Un segundo grupo donde se encuentra el Mg, que utiliza el doble de volumen del caso anterior debido a las elevadas concentraciones de este metal en este tipo de muestra. En la extracción de este metal se utiliza como disolución extractante HNO_3 3M y es necesario un tiempo de sonicación de 2 min.

Dentro de este primer grupo de metales hay diferentes subclasificaciones. El primer criterio de subclasificación es la utilización o no de lantano en la extracción. En consecuencia, se forman dos grupos: un primer grupo donde se encuentra el Ca, ya que es el único metal de ellos (el magnesio ya está clasificado como un grupo aparte) que necesita lantano en su determinación ($[La]=2\%$) y otro grupo donde se encuentran aquellos metales que no necesitan lantano en su determinación. Dentro de este último grupo, formado por el Zn, Mn, Cu y Fe, estos metales están subdivididos en función del tiempo de sonicación. Así, por una parte se encuentran el Zn y el Mn cuyos tiempos de sonicación en la extracción son de 0,5 min, y por otra se encuentran el Cu y el Fe formando grupos independientes, pues sus tiempos de sonicación son 1 y 3 min, respectivamente.

En resumen, las extracciones que implican mayor dificultad, teniendo como criterio la concentración ácida y el tiempo de sonicación necesarios, son en el orden indicado: Fe, Mg y Cu ($[HNO_3]=3M$ y 3min, 2 min y 1 min de sonicación, respectivamente). De ahí, que su proximidad en la mitad derecha del dendograma (Figura 128). Las extracciones de Ca, Zn y Mn (parte izquierda del dendograma) requieren un tiempo de sonicación de sólo 0,5 min, y unas concentraciones de HNO_3 de 3 M, 0,2 M y 1,5 M, respectivamente.

Estudio estadístico mediante HCA de la extracción de los diferentes metales de muestras las muestras de carnes

Se ha aplicado el HCA a los valores óptimos obtenidos para las variables que afectan a la extracción de calcio, cinc, cobre, hierro, magnesio y manganeso en las muestras de carnes (Figura 129).

En los resultados obtenidos en el dendograma proporcionado por el análisis de HCA indican que las extracciones de los diferentes metales en carnes se puede dividir principalmente en dos grupos en función de la concentración ácida, del tiempo de sonicación, del caudal de extracción y la concentración de lantano (utilizada en la determinación de calcio y magnesio), ya que las demás variables son idénticas independientemente del metal analizado

(temperatura de extracción=20°C y volumen de disolución extractante=1mL). Así, los dos grupos principales son:

- Un grupo formado por aquellos metales que requieren menor concentración ácida en la disolución extractante (0,75-1,5M) y menor tiempo de sonicación (0,5-1 min) a un caudal de 6mL/min. En este grupo se encuentran los metales Ca, Mg, Zn y Mn.
- Un segundo grupo donde se encuentran el Cu y el Fe, debido a que estos necesitan condiciones más severas en la extracción. Así, las disoluciones extractantes para estos dos metales tienen una concentración ácida mayor. En el caso del cobre es una disolución de HNO₃ 3M, y en el caso del hierro es necesaria la presencia de ambos ácidos para obtener resultados cuantitativos en la extracción (HNO₃:HCl, 3M:3M). Además, en las extracciones de estos dos metales son necesarios mayores tiempos de sonicación (3 min y 5 min, para el Cu y el Fe, respectivamente) a un caudal de 3,5 mL/min. La necesidad de un caudal más bajo es debida, como ya se ha explicado anteriormente, a las características de la matriz y al mayor tiempo de sonicación que hace que la muestra se compacte dentro de la columna.

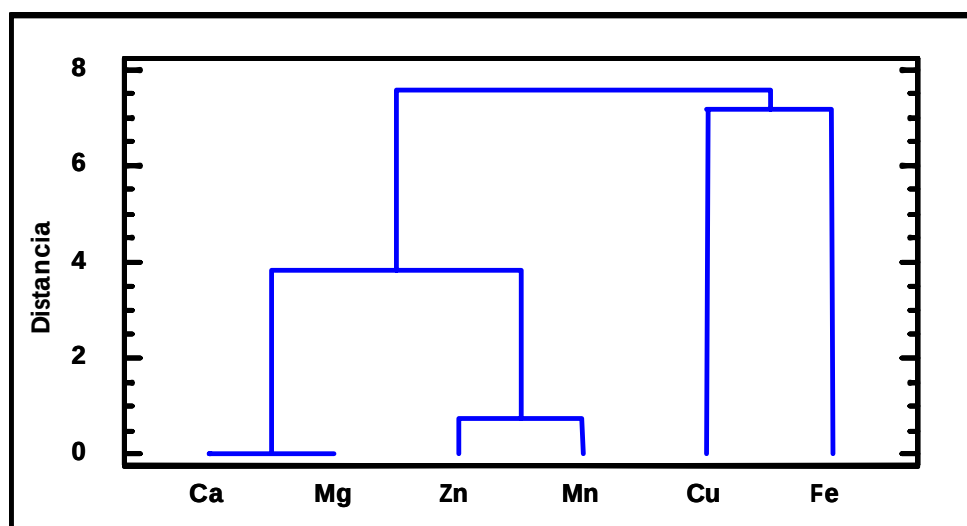


Figura 129. Dendrograma proporcionado por el análisis de HCA al aplicarlo a los valores óptimos de cada variable en la extracción de calcio, cinc, cobre, hierro, magnesio y manganeso en muestras de carnes.

En lo que respecta al grupo formado por Ca, Mg, Zn y Mn, se observa una subdivisión de los metales en función de la necesidad de realizar una disolución del extracto con lantano o no. Así, un subgrupo lo constituyen el Ca y Mg, ya que ambos necesitan para su determinación la dilución del extracto con una disolución de La 2%. La extracción de estos metales en las muestras de carne requiere en ambos casos una concentración de HNO_3 1,5 M y un tiempo de sonicación de 0,5 min. El otro subgrupo está formado por el Zn y el Mn, ya que estos dos metales no necesitan una dilución con una disolución de lantano para su determinación. La concentración de HNO_3 y el tiempo de sonicación necesarios en las extracciones de estos dos metales son, 0,75 M y 0,5 min (caudal de extracción=6mL/min) para el cinc y 1,5M y 1min (caudal de extracción=6mL/min) para el Mn.

En resumen, los metales que necesitan para su extracción una mayor concentración ácida y mayor tiempo de sonicación son, con gran diferencia con respecto a los demás, el Fe y el Cu. Esto se puede explicar a partir de las fuertes uniones de estos metales a proteínas de las carne, sobre todo en el caso del hierro hemo, muy abundante en las muestras de carne.

Estudio estadístico mediante HCA de la extracción de los diferentes metales de muestras las muestras de cereales y derivados

Se ha aplicado el HCA a los valores óptimos obtenidos para las variables que afectan a la extracción de calcio, cinc, cobre, hierro, magnesio y manganeso en las muestras de cereales y derivados (Figura 130).

En los resultados obtenidos en el dendograma proporcionado por el análisis se observan dos grupos principales. Estos grupos se han formado en función de la concentración ácida, del tiempo de sonicación y la concentración de lantano (utilizada en la extracción de calcio y magnesio), ya que las demás variables son idénticas, independientemente del metal analizado (temperatura de extracción=20°C, caudal de sonicación=6mL/min y volumen de disolución extractante=1mL). Así, los dos grupos principales son:

- Un primer grupo formado por los metales Ca, Mg, Zn, Mn y Cu
- Un segundo grupo formado sólo por el Fe. Esto es debido a que de nuevo el Fe es el metal que necesita mayor tiempo de sonicación (2 min) y una concentración de HNO_3 3M.

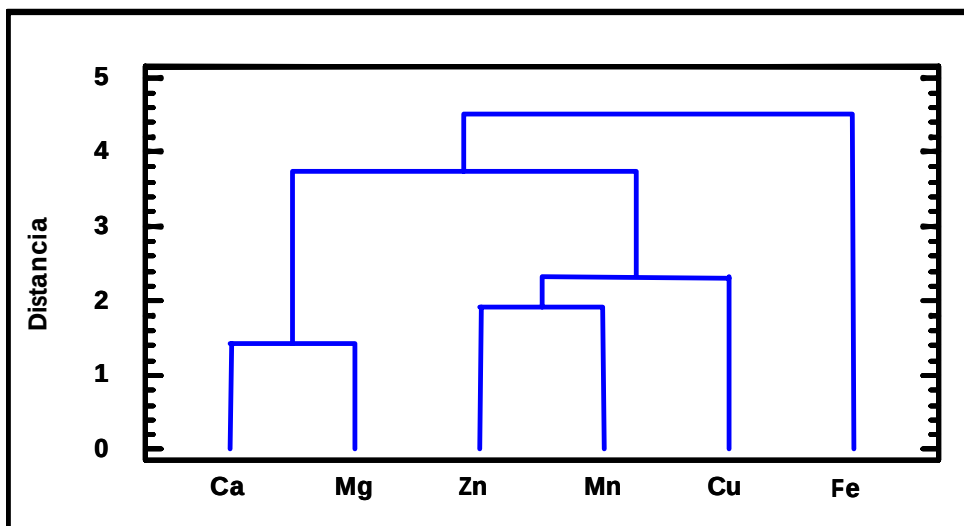


Figura 130. Dendrograma proporcionado por el análisis de HCA al aplicarlo a los valores óptimos de cada variable en la extracción de calcio, cinc, cobre, hierro, magnesio y manganeso en muestras de cereales y derivados.

Dentro del primer grupo de metales se observa de nuevo una separación entre los metales que necesitan una dilución del extracto con una disolución de lantano y los que no. Así, se encuentran formando dos subgrupos, por una parte los metales Ca y Mg, y por otra el Zn, Mn y Cu. Para la extracción de los metales del primer subgrupo, es necesaria una $[\text{HNO}_3]$ y un tiempo de sonicación de 1,5M y 1 min, para el Ca, y 0,5 M y 0,5 min, para el magnesio. En el segundo subgrupo, el Zn y el Cu necesitan 0,5 min de sonicación para su extracción, mientras que el Mn necesita el doble de tiempo (1min). En cuanto a la concentración de HNO_3 necesaria para la extracción de estos metales es de 0,2M, 1,5M y 3M para el Zn, Mn y Cu, respectivamente.

En resumen, los metales que requieren una mayor concentración ácida para ser extraídos de las muestras de cereales y derivados son el Fe y el Cu ($[\text{HNO}_3]=3\text{M}$) y el que requiere menor concentración es el Mg ($[\text{HNO}_3]=0,5\text{M}$). Con respecto al tiempo de sonicación, los metales que necesitan un mayor

tiempo de sonicación son, de nuevo el Fe, el Mn y el Ca (2 min y 1 min, respectivamente). Los restantes metales (Mg, Zn y Cu) sólo necesitan 0,5 min de sonicación.

Estudio estadístico mediante HCA de la extracción de los diferentes metales de muestras las muestras de frutos secos

Se ha aplicado el HCA a los valores óptimos obtenidos para las variables que afectan a la extracción de calcio, cinc, cobre, hierro, magnesio y manganeso en las muestras de frutos secos (Figura 131).

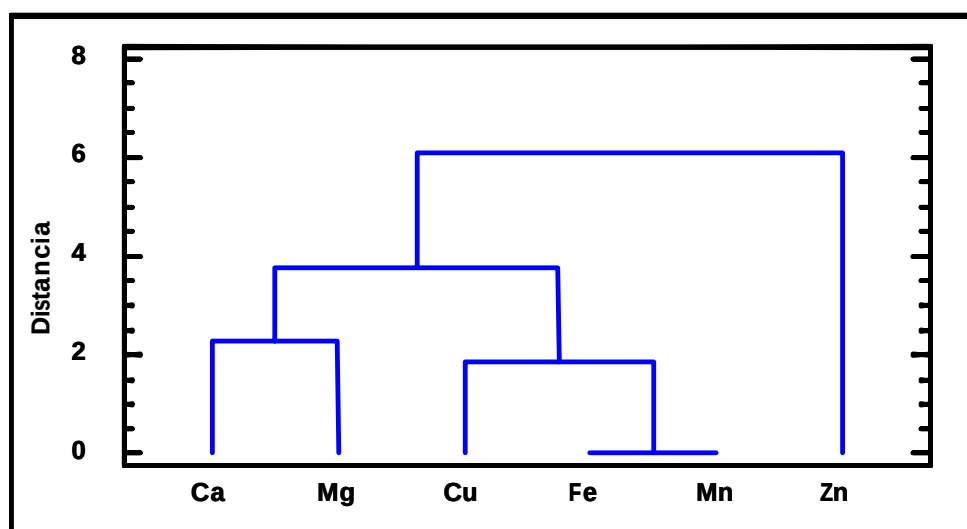


Figura 131. Dendograma proporcionado por el análisis de HCA al aplicarlo a los valores óptimos de cada variable en la extracción de calcio, cinc, cobre, hierro, magnesio y manganeso en muestras de frutos secos.

En los resultados obtenidos en el dendrograma proporcionado por el análisis se observan dos grupos principales. Estos grupos se han formado en función de la concentración ácida, del tiempo de sonicación y la concentración de lantano (utilizada en la extracción de calcio y magnesio), ya que las demás variables son idénticas independientemente del metal analizado (temperatura de extracción=20°C, caudal de sonicación=6mL/min y volumen de disolución extractante=1mL). Así, los dos grupos principales son:

- Un primer grupo donde se encuentran los metales cuyas extracciones requieren concentraciones de HNO_3 entre 1,5M – 3M y tiempos de

sonicación entre 1 min – 2 min, ambos valores inclusive en los dos casos (Ca, Mg, Cu, Fe y Mn)

- El segundo grupo lo constituye el Zn, ya que las condiciones, en cuanto a concentración ácida y a tiempo de sonicación se refiere, son mucho menos drásticas que para los metales del primer grupo. Así, para la extracción de Zn en este tipo de muestras se necesita una disolución extractante de HNO_3 0,4 M y un tiempo de sonicación de 0,5 min.

En los que respecta a los metales del primer grupo formado (Ca, Mg, Cu, Fe y Mn) se observa de nuevo una separación entre los metales que necesitan una dilución del extracto con una disolución de lantano y los que no. Así, se encuentran formando dos subgrupos, por una parte los metales Ca y Mg, y por otra el Cu, Fe y Mn. Para los metales del primer subgrupo, la disolución extractante necesaria para obtener %eficacia en la extracción cuantitativos es de HNO_3 3M en ambos casos, y el tiempo de sonicación es de 1 min y 2 min para el Ca y Mg, respectivamente. En el caso de Cu, Fe y Mn, los tres metales necesitan un tiempo de sonicación de 2 min, y la disolución extractante necesaria es HNO_3 3M para el Cu, y HNO_3 1,5M para el Fe y Mn.

En conclusión, la extracciones en este tipo de matriz que requieren mayor concentración ácida son las de los metales Ca, Mg y Cu (parte derecha del dendograma, Figura 131). En contraposición se encuentra el caso de la extracción de Zn, que requiere la menor concentración ácida, además del menor tiempo de sonicación ($[\text{HNO}_3]=0,4$ M y 0,5 min de sonicación).

Estudio estadístico mediante HCA de la extracción de los diferentes metales de muestras las muestras de legumbres

Se ha aplicado el HCA a los valores óptimos obtenidos para las variables que afectan a la extracción de calcio, cinc, cobre, hierro, magnesio y manganeso en las muestras de legumbres (Figura 132).

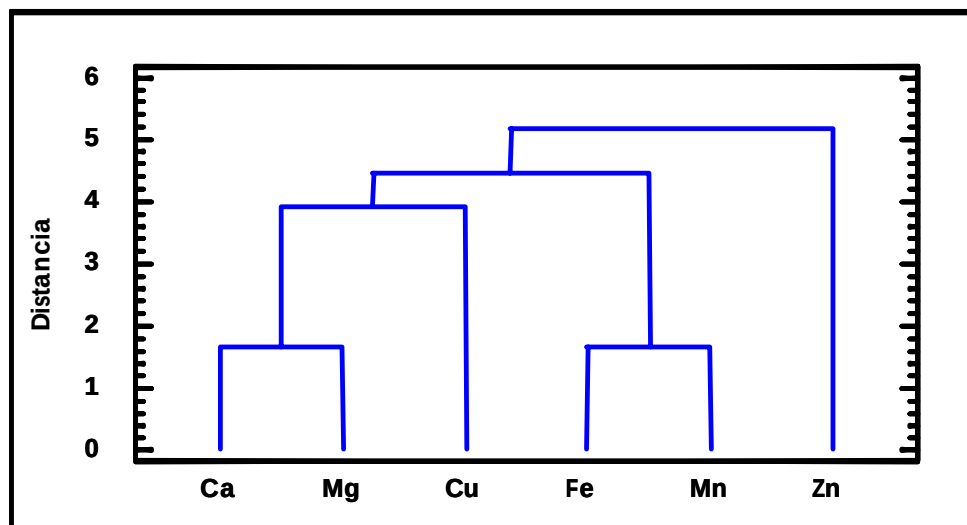


Figura 132. Dendrograma proporcionado por el análisis de HCA al aplicarlo a los valores óptimos de cada variable en la extracción de calcio, cinc, cobre, hierro, magnesio y manganeso en muestras de legumbres.

En los resultados obtenidos en el dendrograma proporcionado por el análisis se observan dos grupos principales. Estos grupos se han formado en función de la concentración ácida, del tiempo de sonicación y la concentración de lantano (utilizada en la extracción de calcio y magnesio), ya que las demás variables son idénticas independientemente del metal analizado (temperatura de extracción=20°C, caudal de sonicación=6mL/min y volumen de disolución extractante=1mL). Así, los dos grupos son:

- Un primer grupo donde se encuentran los metales cuyas extracciones requieren una concentración de HNO_3 entre 1,5M – 3M y tiempos de sonicación entre 0,5 min – 3 min, ambos valores inclusive en los dos casos (Ca, Mg, Cu, Fe y Mn)
- El segundo grupo lo constituye el Zn, ya que las condiciones, en cuanto a concentración ácida y a tiempo de sonicación se refiere, son mucho menos fuertes que para los metales del primer grupo. Así, para la extracción de Zn en este tipo de muestras se necesita una disolución extractante de HNO_3 0,2 M y un tiempo de sonicación de 0,5 min.

En los que respecta a los metales del primer grupo formado (Ca, Mg, Cu, Fe y Mn) se observa una división de los metales en función del tiempo de sonicación que necesitan para su extracción. Así, se observan dos subgrupos.

Un primer subgrupo constituido por aquellas metales que necesitan un tiempo de sonicación entre 0,5-1min (Ca, Mg y Cu). El otro subgrupo está constituido por el Fe y Mn, ya que ambos necesitan 3 min de sonicación para proporcionar %eficacias en la extracción cuantitativas. En estos dos metales la disolución extractante es HNO_3 3M, para el Fe, y 1,5 M para el Mn.

En el subgrupo formado por Ca, Mg y Cu, se observa otra escisión que engloba por un lado aquellos metales que necesitan una disolución con lantano para su determinación (Ca y Mg) y los metales que no la necesitan, caso del Cu. En la extracción del Ca y Mg, la concentración de HNO_3 necesaria es de 1,5 M y 3M, respectivamente y tiempo de sonicación es 1 min en ambos casos. En la extracción de Cu el tiempo de sonicación es menor (0,5 min), y sin embargo la concentración de HNO_3 necesaria es 3M.

En resumen, al igual que se ha concluido para las matrices de frutos secos, el Zn es el metal que necesita una menor concentración ácida así como menor tiempo de sonicación para ser extraído de las muestras de legumbres. Los metales que requieren mayor tiempo en su extracción en este tipo de muestras son el Fe y el Mn (3min). En lo que respecta a la concentración ácida necesaria para la extracción, los metales que necesitan una mayor concentración de la misma son el Mg, Cu y el Fe ($[\text{HNO}_3]=3\text{M}$).

Estudio estadístico mediante HCA de la extracción de los diferentes metales de muestras las muestras de verduras, hortalizas y frutas

Se ha aplicado el HCA a los valores óptimos obtenidos para las variables que afectan a la extracción de calcio, cinc, cobre, hierro, magnesio y manganeso en las muestras de verduras, hortalizas y frutas (Figura 133).

En los resultados obtenidos en el dendograma proporcionado por el análisis se observan dos grupos principales. Estos grupos se han formado en función de la concentración ácida, del tiempo de sonicación y la concentración de lantano (utilizada en la extracción de calcio y magnesio), ya que las demás variables son idénticas independientemente del metal analizado (temperatura de extracción=20°C, caudal de sonicación=6mL/min y volumen de disolución extractante=1mL). Así, los dos grupos son:

- Un primer grupo formado por aquellos metales que se extraen de este tipo de muestras con un tiempo de sonicación de 0,5 min. Estos metales son Ca, Mg, Zn y Mn
- Un segundo grupo formado por aquellos metales que se extraen con un tiempo de sonicación de 3 min. Estos metales son Cu y Fe. Para estos dos metales la disolución extractante es en ambos casos HNO_3 3M.

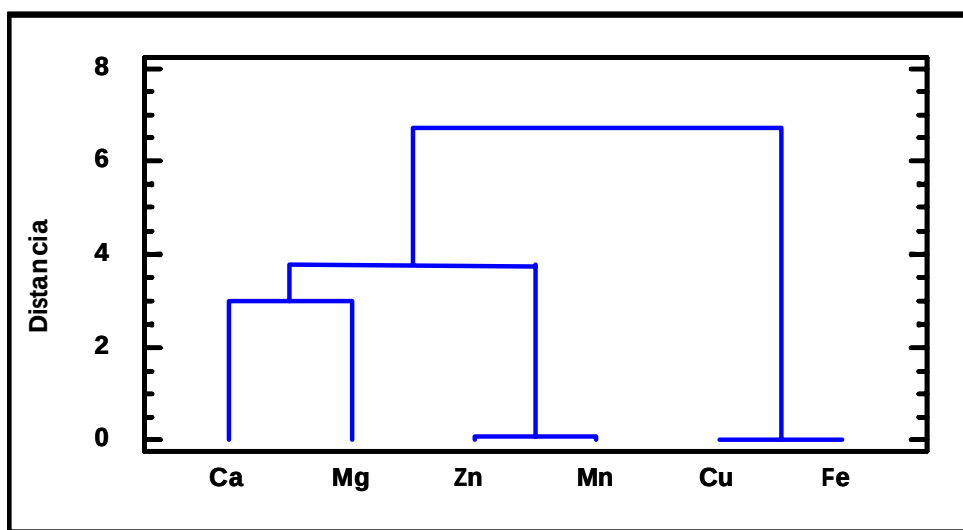


Figura 133. Dendrograma proporcionado por el análisis de HCA al aplicarlo a los valores óptimos de cada variable en la extracción de calcio, cinc, cobre, hierro, magnesio y manganeso en muestras de verduras, hortalizas y frutas.

En el primer grupo de metales se observa una división de los mismos en función de la necesidad de dilución del extracto ácido con una disolución de lantano para su determinación. Así, por una parte se encuentran el Ca y Mg, y por otra el Zn y Mn. Para los metales que necesitan una dilución del extracto, la disolución extractante es HNO_3 3M para el Ca, y 0,5 M para el Mg. Para el Zn y Mn la disolución extractante utilizada es HNO_3 0,1 M y 0,5 M, respectivamente.

En resumen, los metales que son más difíciles de extraer de este tipo de muestras son el Cu y el Fe, ya que necesitan el mayor tiempo de sonicación, además de una concentración de HNO_3 de 3M. Esto puede explicar a través de la fuerte unión de estos metales a las proteínas vegetales. El metal que se extrae más fácilmente de este tipo de matriz es el Zn, caso que también se ha dado en las matrices de frutos secos y las legumbres.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- Se han diseñado y optimizado distintos dispositivos que han permitido el tratamiento de una muestra sólida realizado de modo continuo a través de un sistema FIA y utilizando para ello la energía de ultrasonidos. Con este dispositivo se consiguió la automatización del tratamiento previo de la muestra con lo que se evitó gran cantidad de inconvenientes derivados de la manipulación de la misma.
- Se han diseñado distintos dispositivos que han permitido bien extraer los metales de diferentes muestras sólidas de naturaleza alimenticia o bien disolver la muestra en los casos en los que ésta es soluble, y determinar en continuo los metales objeto de estudio mediante espectroscopía de absorción atómica con llama (FAAS). Se han presentado distintos dispositivos de inyección en flujo (FI) en función del proceso que ha tenido lugar y de las necesidades específicas de cada metal en su determinación. Así, se han diseñado, desarrollado y optimizado dispositivos que han permitido realizar la extracción continua mediante la energía de ultrasonidos (CUES) de los metales calcio, cinc, cobre, hierro, magnesio y manganeso de las siguientes muestras sólidas de naturaleza alimenticia (moluscos y pescados, carnes, cereales y derivados, frutos secos, legumbres y verduras hortalizas y frutas). También se han diseñado, optimizado y desarrollado otros dispositivos que permiten realizar la disolución de la muestra sólida en continuo utilizando la energía de ultrasonidos (CUDS) seguida de la determinación del metal por FAAS. Este dispositivo se ha aplicado en el análisis de calcio, cinc, cobre, hierro y magnesio en muestras de leche en polvo y fórmulas infantiles.
- Se ha descrito y optimizado un sistema FIA que incorpora el dispositivo de extracción/disolución de la muestra. El sistema FIA final, incluyendo el dispositivo anterior, fue optimizado con un diseño multivariable de

Plackett-Burman lo que permitió disminuir en gran medida el número de experimentos a realizar en esta etapa. Los resultados que se obtuvieron con este diseño indican que este sistema ofrece una serie de ventajas adicionales a la automatización y miniaturización del proceso, ya que se cumplen en gran medida las condiciones ideales del pretratamiento de la muestra en el proceso analítico:

- son procedimientos rápidos. La mayoría de los procesos necesitan un tiempo de sonicación de la muestra entre 0,5-3 minutos, excepto en el caso de la extracción de hierro en carne que necesita 5 minutos de sonicación. Además estos procesos se realizan en todos los casos a temperatura ambiente (20°C), lo que hace que la preparación del sistema para realizar el análisis conlleve menor tiempo. En consecuencia las frecuencias de muestreo obtenidas son muy elevadas (17-70 muestras/hora).
- no dan lugar a contaminación de las muestras ni a pérdidas de analito.
- no exponen al analista a riesgos químicos.
- extraen cuantitativamente el analito de interés (CUES) o disuelven totalmente la muestra (CUDS) utilizando disoluciones ácidas poco concentradas (0,1-3M) o simplemente agua ultrapura
- no requieren instrumentación cara.
- como el proceso se ha miniaturizado, se utiliza una cantidad pequeña de tanto de la muestra (10-30 mg) como de los reactivos (el volumen de disolución extractante es en casi todos los casos 1 mL, excepto en el caso de la extracción de magnesio en muestras de moluscos donde se utilizan 2mL debido a las elevadas concentraciones de este metal en este tipo de muestras). Esto permite realizar los análisis con mayor rapidez y menor coste.

- En la optimización de la cantidad de muestra, se ha observado que la cantidad de la misma en ningún caso debe ser superior a 0,03 g de muestra pues se generan presiones en el sistema FIA. Las cantidades de muestra que se pueden utilizar en cada análisis depende de la concentración del metal presente en la misma y del volumen de disolución utilizada bien en la extracción del metal o en la disolución de la muestra (en los casos del calcio y del magnesio también depende de la dilución aplicada). En los casos de las extracciones se ha observado que el tamaño de partícula no influye en la eficacia del proceso.
- Los métodos propuestos para la extracción de los diferentes metales son métodos sensibles, hecho que se refleja en los límites de detección y cuantificación obtenidos en cada caso. Además son métodos exactos y precisos, ya que se han obtenido recuperaciones entre 98,4-101,5% y coeficientes de variación menores del 10% en todos los casos. Las frecuencias de muestreo oscilan entre 11-70 muestras/hora para aquellos metales que no requieren dilución. Para el calcio y el magnesio, metales que necesitan la dilución con lantano para su determinación, las frecuencia de muestreo encuentran entre 17-57 muestras/hora. Por tanto, estos métodos son adecuados para análisis en rutina.
- En el caso de la disolución de las muestras (leche en polvo y fórmulas infantiles) los límites de detección y cuantificación también indican que el método propuesto es sensible. En este caso también el método es exacto y preciso, ya que las recuperaciones se encuentran entre 98,5-101,2% y los coeficientes de variación entre 0,3-1,1%. Este método proporciona frecuencias de muestreo muy elevadas (54-70 muestras/hora).
- Estas metodologías se han aplicado a muestras reales. Los resultados obtenidos se han comparado mediante el Test de parejas con los obtenidos al utilizar un método de referencia, y se ha concluido que las

metodologías propuestas se pueden aplicar de modo satisfactorio a muestras reales.

- Se ha realizado un estudio estadístico utilizando el Análisis Jerárquico de Grupos, o como es más conocido “Hierarchical Cluster Análisis” (HCA), para evaluar la mayor o menor dificultad del proceso de extracción de cada metal de cada matriz sólida de naturaleza alimenticia objeto de estudio. Se han evaluado así los parámetros óptimos para cada extracción, y las similitudes y diferencias existentes entre las extracciones llevadas a cabo en las diferentes matrices. Se ha concluido que los tipos de muestras que requieren mayor concentración ácida o mayor tiempo de sonicación (factores que han sido los determinantes al realizar este estudio) en la extracción de cada metal son:

- para el calcio, las muestras de frutos secos
- para el cinc, las muestras de frutos secos y de carnes
- para el cobre y el hierro, las muestras de carne
- para el magnesio, las muestras de moluscos y pescados y frutos secos
- para el manganeso, las muestras de legumbres, frutos secos y cereales

De todas estas extracciones, la extracción de hierro, seguida de la de cobre, en ambos casos en muestras de carne, son las que ofrecen mayor dificultad, ya que requieren las mayores concentraciones ácidas utilizadas y los mayores tiempos de sonicación aplicados para obtener %eficacia en la extracción cuantitativos. Esto se puede justificar a partir de las fuertes uniones de estos dos metales a las proteínas de este tipo de muestras.

Por otra parte, si se tiene en cuenta los estudios de HCA realizados sobre la extracción de cada metal en una misma matriz se puede observar que en algunos análisis los resultados son idénticos entre tipos de muestras. Así, los resultados obtenidos para las muestras de carne,

cereales y verduras, hortalizas y frutas son prácticamente idénticos, como también ocurre entre las matrices frutos secos y legumbres. Para el primer grupo de muestras se observa que los metales que necesitan bien mayores concentraciones ácidas o más tiempo de sonicación son el cobre y el hierro. En el caso de las frutas y las legumbres se observa que el calcio, el magnesio, el cobre y el hierro necesitan bien más concentración ácida o bien más tiempo de sonicación, así como el cinc es el metal que se extrae más fácilmente en ambos casos. Los moluscos y pescados constituyen un tipo de matriz que estadísticamente no se puede agrupar con otras matrices, en lo que respecta a las extracciones de los diferentes metales en la misma. En este tipo de muestras los metales que requieren mayores concentraciones ácidas o más tiempo de sonicación son el hierro, el magnesio y el cobre.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Segura, R., Webb, S., Tovar, J., Gausí, C. *"Los Minerales y la Salud"* (2000) Plaza y Janés, Barcelona, España.
- [2] Tolonen, M. *"Vitaminas y Minerales en la Salud y la Nutrición"* (1995) Acribia, Zaragoza, España, pp.187-241.
- [3] Fennema, O.R. *"Química de los Alimentos"* (1993) Acribia, Zaragoza, España, pp. 541-575.
- [4] Lisk, D.J. *Adv. Agron.*, (1972), **24**, 267-320.
- [5] Schroeder, H.A. *Am. J. Clin. Nutr.*, (1971), **24**, 562-573.
- [6] Reilly, C. *"Metal Contamination of Food"* (1991) Elsevier Applied Science, New York, USA.
- [7] Borocz-Szabo, M. *Acta Alimentaria*, (1980), **9**, 341-356.
- [8] Belitz, H.D., Grosch, W. *"Química de los Alimentos"* (1992) Acribia, Zaragoza, España, pp. 503-507.
- [9] Cotton, F.A., Wilkinson G. *"Química Inorgánica Avanzada"* (1995) Limusa, México, pp. 335-355.
- [10] Sharpe, A.G. *"Inorganic Chemistry"* (1992) John Wiley and Sons, New York, USA, pp. 241-253.
- [11] Bailar, J.C., Emeléus, H.J., Nyholm, R., Trotman-Dickenson, A.F. *"Comprehensive Inorganic Chemistry"* (1973) Pergamon Press, Oxford, England, pp. 591-664.
- [12] Moreiras, O., Carbajal, A., Cabrera, L., Cuadrado, C. *"Tablas de Composición de Alimentos"* (2004) Pirámide, Madrid, España.
- [13] Ministerio de Sanidad y Consumo y Boletín Oficial del Estado. *"Tablas de Composición de Alimentos Españoles"* (2000) Madrid, España.
- [14] Kathleen-Mahan, L., Escott-Stump, S. *"Nutrición y Dietoterapia, de Krause"* (1998) Mc Graw-Hill Interamericana, México.
- [15] Food and Nutrition Board, National Research Council, National Academy of Sciences. *"Recommended Dietary Allowances"* (1989) National Academy Press, Washington.
- [16] Merian E. *"Metals and Their Compounds in the Environment"* (1991) VCH, Weinheim, Germany.
- [17] Paul, A.A., Southgate, D.A.T. *"McCance and Widdowson. The Composition of Foods"* (1978) HMSO, Elsevier, Amsterdam, Holanda.

- [18] Murphy, E.W., Willis, B.W., Watts, B.K. *J. Am. Diet. Assoc.*, (1975), **66**, 345-355.
- [19] English, R. *J. Food. Nutr.*, (1981), **38**, 63-65.
- [20] Varo, P., Koivistoinen, P. *Acta Agric. Scand. Suppl.*, (1980), **22**, 165-170.
- [21] Crosby, N.T. *Analyst*, (1977), **102**, 225-268.
- [22] Branca, P. *Boll. Chim. Unione Ital. Lab. Prov.*, (1982), **33**, 495-506.
- [23] Biffoli, R., Chiti, F., Mocchi, M., Pinzauti, S. *Rev. Soc. Ital. Sc. Alimentazione*, (1980), **9**, 241-246.
- [24] Buldini, P.L., Ricci, L., Sharma, J.L. *J. Chromatogr. A*, (2002), **975**, 47-70.
- [25] De Oliveira, E. *J. Braz. Chem. Soc.*, (2003), **14**, 174-182.
- [26] Günzler, H., Williams, A. "Handbook of Analytical Techniques" (2001) Wiley-VCH, Weinheim, Germany, pp. 77-108.
- [27] Somenath, M. "Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry" (2003) John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, pp. 139-181; 227-270.
- [28] Novozamsky, I., Van der Lee, H. J., Houba, V. J. G. *Mikrochim. Acta*, (1995), **119**, 183-189.
- [29] Silva, R.G.L., Willie, S.N., Sturgeon, R.E., Santelli, E.E., Sella, S. M. *The Analyst*, (1999), **124**, 1843-1846.
- [30] Sabty-Daily, R.A., Luk, K.K., Froines, J.R. *The Analyst*, (2002), **127**, 852-858.
- [31] Giacomelli, M. B. O., Lima, M. C., Stupp, V., de Carvalho Junior, R. M., Borba da Silva, J. B., Bermejo Barrera, P. *Spectrochim. Acta*, Part B, (2002), **57B**, 2151-2157.
- [32] Hintelmann, H., Nguyen, H.T. *Anal. Bioanal. Chem.*, (2005), **381**, 360-365.
- [33] Vandecasteele, C. "Modern Methods for Trace Element Determination" (1993) John Wiley & Sons, Chichester, England, pp. 9-53; 92-137.
- [34] Knapp, G. *Mikrochim. Acta*, (1991), **II**, 445-455.
- [35] Mader, P., Száková, J., Mihalová, D. *Analisis*, (1998), **26**, 121-129.
- [36] Jorhem, L. *J. AOAC Int.*, (2000), **83**, 1204-1211.
- [37] Kaiser, G., Tölg, G. *Fresenius Z. Anal. Chem.*, (1986), **325**, 32-40.
- [38] Raptis, S.E., Kaiser, G., Tölg, G. *Anal. Chim. Acta*, (1982), **138**, 93-101.
- [39] Luque de Castro, M.D., da Silva, M.P. *Trends Anal. Chem.*, (1997), **16**, 16-23.
- [40] Betinelly M. "Encyclopedia of Analytical Science: Microwave digestion", (1995) Academic Press, London, vol. 8, pp. 4510-4518.
- [41] Lambie, K.J., Hill, S.J. *Analyst*, (1998), **123**, 103R-133R.
- [42] Taylor, V.F., Toms, A., Longerich, H.P. *Anal. Bioanal. Chem.*, (2002), **372**, 360-365.
- [43] Mingorance, M.D. *Anal. Bioanal. Chem.*, (2002), **373**, 153-158.
- [44] Priego-Capote, F., Luque de Castro, M.D. *Trends Anal. Chem.*, (2004), **23**, 644-653.

- [45] Martens, D., Gfrerer, M., Wenzl, T., Zhang, A., Gawlik, B.M., Schramm, K.W., Lankmayr, E., Kettrup, A. *Anal. Bioanal. Chem.*, (2002), **372**, 562-568.
- [46] Vaeisaenen, A., Suontamo, R., Silvonen, J., Rintala, J. *Anal. Bioanal. Chem.*, (2002), **373**, 93-97.
- [47] Palma, M., Barroso, C.G. *Anal. Chim. Acta.*, (2002), **458**, 119-130.
- [48] Alissandrakis, E., Daferera, D., Tarantilis, P.A., Polissiou, M., Harizanis, P.C. *Food Chem.*, (2003), **82**, 575-582.
- [49] Rostagno, M. A., Palme, M., Barroso, C. G. *J. Chromatogr. A*, (2003), **1012**, 119-128.
- [50] Priego-López, E, Luque de Castro, M.D. *J. Chromatogr. A*, (2003), **1018**, 1-6.
- [51] Ruiz-Jimenez, J., Luque de Castro, M. D. *Anal. Chim. Acta*, (2004), **502**, 75-82.
- [52] Wibetoe, G., Takuwa, D.T., Lund, W., Sawula, G. *Fresenius J. Anal. Chem.*, (1999), **363**, 46-54.
- [53] Amoedo, L., Capelo, J.L., Lavilla, I., Bendicho, C. *J. Anal. At. Spectrom.*, (1999), **14**, 1221-1226.
- [54] Pack, B. W., Ray, S. J., Potyrailo, R. A., Hietje, G. M. *Appl. Spectrosc.*, (1998), **12**, 1515-1521.
- [55] Buldini, P.L., Melovi, A., Sharma, J. L. *Talanta*, (1998), **47**, 203-212.
- [56] Fransson, B., Ragnarsson, U. *J. Chromatogr. A*, (1998), **827**, 31-36.
- [57] Luque-García, J. L., Luque de Castro, M. D. *Trends Anal. Chem.*, (2003), **22**, 41-47.
- [58] Bendicho, C, Lavilla, I. "Encyclopedia of Separation Science: Applications of Ultrasound Extractions and Ultrasound-assisted Metal Extractions" (2000) Academic Press, London, vol. 9, pp.1448-1454; 4421-4426.
- [59] Sánchez, J., García, R., Millán, E. *Analisis*, (1995), **22**, 222-225.
- [60] Ashley, K., Andrews, R. N., Cavazos, L., Demange, M. J. *Anal. At. Spectrom.*, (2001), **16**, 1147-1153.
- [61] Bermejo Barrera, P., Moreda Piñeiro, A., Bermejo Barrera, A. *J. Anal. At. Spectrom.*, (2000), **15**, 121-130.
- [62] Kumar, S.J., Reddy, M.A., Meeravali, N.N. *J. Anal. At. Spectrom.*, (2005), **20**, 124-126.
- [63] Filgueiras, A.V., Lavilla, I., Bendicho, C. *Fresenius J. Anal. Chem.*, (2001), **369**, 451-456.
- [64] Nascentes, C.C., Korn, M., Arruda, M.A.Z. *Microchem. J.*, (2001), **69**, 37-43.
- [65] Marín, A., López-González, A., Barbas, C. *Anal. Chim. Acta*, (2001), **442**, 305-318.
- [66] Al-Merey, R., Al-Masri, M.S., Bozou, R. *Anal. Chim. Acta*, (2002), **452**, 143-148.
- [67] Väisänen, A., Suontamo, R., Silvonen, J., Rintala, J. *Anal. Bioanal. Chem.*, (2002), **373**, 93-97.

- [68] Arruda, S.C.C., Rodriguez, A.P.M., Arruda, M.A.Z. *J. Braz. Chem. Soc.*, (2003), **14**, 470-474.
- [69] Brasil, J.L., Lima, E.C., Cataluña, R., Tisott, M.M. *At. Spectrosc.*, (2004), **25**, 94-101.
- [70] Balarama Krishna, M.V., Arunachalam, J. *Anal. Chim. Acta*, (2004), **522**, 179-187.
- [71] Gomez-Ariza, J. L., Morales, E., Beltran, R., Giraldez, I., Ruiz-Benited, M. *Analyst*, (1995), **120**, 1171-1174.
- [72] El Azouzi, H., Cervera, M. L., De la Guardia, M. *J. Anal. At. Spectrom.*, (1998), **13**, 533-538.
- [73] Lavilla, I., Capelo, J.I., Bendicho, C. *Fresenius J. Anal. Chem.*, (1999), **363**, 283-288.
- [74] Aleixo, P.C., Júnior, D.S., Tomazelli, A.C., Rufino, I.A., Berndt, H., Drug, F.J. *Anal. Chim. Acta*, (2004), **512**, 329-337.
- [75] Valcárcel, M., Luque de Castro, M. D., Tena, M. T. *Ann. Chim.*, (1995), **85**, 1-15.
- [76] Luque de Castro, M. D., Valcárcel, M., Tena, M. T. "Extracción con fluidos supercríticos en el proceso analítico" (1993) Reverté, Barcelona, España.
- [77] Alfassi, Z.B. "Determination of Trace Elements" (1994) VCH, Weinheim, Germany, pp.145-190.
- [78] Nielsen, S.S. "Food Analysis" (1998) Aspen Publishers, Maryland, Estados Unidos, pp. 438-440.
- [79] Charalambous, G. "Analysis of Foods and Beverages: Modern Techniques" (1984) Academic Press, London, pp. 463-468.
- [80] Welz, B. "Atomic Absorption Spectrometry" (1985) VCH, Weinheim, Germany, pp. 277-300.
- [81] Van Staden, J.F., Van Rensburg, A. *Fresenius J. Anal. Chem.*, (1990), **337**, 393-397.
- [82] Van Staden, J.F., Van Rensburg, A. *Analyst*, (1990), **115**, 605-608.
- [83] Arruda, M. A. Z., Gallego, M., Valcárcel, M. *Quim. Anal.*, (1995), **14**, 17-26.
- [84] Marlon de Moraes Flores, E., Neri Gottfried Paniz, J., Figueiredo Martins, A., L. Dressler, V., Irineu Müller, E., Ben da Costa, A. *Spectrochim. Acta, Part B*, (2002), **57B**, 2187-2193.
- [85] Belarra, M. A., Resano, M., Vanhaecke, F., Moens, L. *Trends Anal. Chem.*, (2002), **21**, 828-839.
- [86] Sahuquillo, A., Rauret, G., Rehnert, A., Muntau, H. *Anal. Chim. Acta*, (2003), **476**, 15-24.
- [87] Belarra, M. A., Resano, M., Castillo, J. R. *J. Anal. At. Spectrom.*, (1999), **14**, 547-552.
- [88] Herber, R. F. M., Grobecker, K. *Fresenius J. Anal. Chem.*, (1995), **351**, 577-582.
- [89] Baxter, R.D.C., Frech, W. *Fresenius J. Anal. Chem.*, (1990), **337**, 253-263.

- [90] Marlon de Moraes Flores, E., Ben da Costa, A., Smanioto Barin, J., Luis Dressler, V., Neri Gottfried Paniz, J., Figueiredo Martins, A. *Spectrochim. Acta, Part B*, (2001), **56B**, 1875-1882.
- [91] Mierzwa, J., Sun, Y., Yang, M. *Anal. Chim. Acta*, (1997), **355**, 277-282.
- [92] Capelo, J. L., Lavilla, I., Bendicho, C. J. *Anal. At. Spectrom.*, (1998), **13**, 1285-1290.
- [93] López-García, I., Sánchez-Merlos, M., Hernández-Córdoba, M. *Mikrochim. Acta*, (1999), **130**, 295-300.
- [94] Liva, M., Muñoz-Olivas, R., Cámara, C. *Talanta*, (2000), **51**, 381-387.
- [95] Cal-Prieto, M.J., Felipe-Sotelo, M., Carlosena, A., Andrade, J.M., López-Mahía, P., Muniategui, S., Prada, D. *Talanta*, (2002), **56**, 1-51.
- [96] Lilleengen, B., Wibetoe, G. *Anal. Bioanal. Chem.*, (2002), **372**, 187-195.
- [97] Santos Jr, D., Barbosa Jr, F., Tomazelli, A.C., Krug, F.J., Nóbrega, J.A., Arruda, M.A.Z. *Anal. Bioanal. Chem.*, (2002), **373**, 183-189.
- [98] Miller-Ihli, N.J. *Fresenius J. Anal. Chem.*, (1993), **345**, 482-489.
- [99] Miller-Ihli, N.J. *J. Anal. At. Spectrom.*, (1994), **9**, 1129-1134.
- [100] Mierzwa, J. *At. Spectrosc.*, (1998), **19**, 6-9.
- [101] Moreda-Piñeiro, J., López-Mahía, P., Muniategui-Lorenzo, S., Fernández-Fernández, E., Prada-Rodríguez, D. *J. Anal. At. Spectrom.*, (2002), **17**, 721-726.
- [102] Bermejo-Barrera, P., Moreda-Piñeiro, A., Moreda-Piñeiro, J., Kauppila, T., Bermejo-Barrera, A. *At. Spectrosc.*, (2000), **21**, 5-9.
- [103] Valcárcel, M., Luque de Castro, M.D. *"Flow Injection Analysis: Principles and Applications"*. (1987) Ellis, Horwood, Chichester, West Sussex, England.
- [104] Ruzika J., Hansen E.H. *"Flow Injection Analysis"* (1998) J. Wiley & Sons. New York, USA.
- [105] Ruzika, J., Hansen, E.H. *Talanta*, (1982), **29**, 157.
- [106] Valcárcel, M., Luque de Castro, M.D. *Fresenius J. Anal. Chem.*, (1990), **337**, 662-666.
- [107] Hurst, W. J. *"Automation in the Laboratory"* (1995) VCH Publishers Inc., New York, USA, pp. 35-40.
- [108] Valcárcel, M., Luque de Castro, M.D. *"Automatic Methods of Analysis"* (1998) Elsevier Science Publishers, B.V. Amsterdam, Holanda, pp.166-171.
- [109] Valcárcel, M., Luque de Castro, M.D. *"Non-chromatographic Continuous Separation Techniques"* (1991) The Royal Society of Chemistry, Cambridge, England.
- [110] Georgiou, C.A., Valsami, G.N., Macheras, P.E., Koupparis, M.A. *J.Pharm. Biomed. Anal.*, (1994), **12**, 635-641.
- [111] Valcárcel, M., Gallego, M., *Talanta*, (1997), **44**, 1509-1516.

- [112] Luque de Castro, M.D. *Pure Appl. Chem.*, (2002), **74**, 2293-2298.
- [113] Zhi, Z., Ríos, A., Valcárcel, M. *Crit. Rev. Anal. Chem.*, (1996), **26(4)**, 239-260.
- [114] Burguera, M., Burguera, J.L. *Anal. Chim. Acta*, (1998), **366**, 63-80.
- [115] Carbonell, V., de la Guardia, M., Salvador, A., Burguera, J.L., Burguera, M. *Anal. Chim. Acta*, (1990), **238**, 417-421.
- [116] de la Guardia, M., Carbonell, V., Morales-Rubio, A., Salvador, A. *Talanta*, (1993), **40**, 1609-1617.
- [117] Gluodenis, T.J.Jr., Tyson, J.F. *J. Anal. At. Spectrom.*, (1993), **8**, 697-704.
- [118] Karanassios, V., Li, F.H., Liu, B., Salin, E.D. *J. Anal. At. Spectrom.*, (1991), **6**, 457-463.
- [119] Bordera, L., Hernandis, V., Canals, A. *Fresenius J. Anal. Chem.*, (1996), **355**, 112-119.
- [120] Haswell, S.J., Barclay, D. *Analyst*, (1992), **117**, 117-120.
- [121] Beary, E.S., Paulsen, P.J., Jassie, L.B., Fassett, J.D. *Anal. Chem.*, (1997), **69**, 758-766.
- [122] Guo, T., Baasner, J. *Talanta*, (1993), **40**, 1927-1936.
- [123] Welz, B., Tsalev, D.T., Sperling, M. *Anal. Chim. Acta*, (1992), **261**, 91-103.
- [124] Carbonell, V., Morales-Rubio, A., Salvador, A., de la Guardia, M., Burguera, J.L., Burguera, M. *J. Anal. At. Spectrom.*, (1992), **7**, 1085-1089.
- [125] Carlosena, A., Gallego, M., Valcárcel, M. *J. Anal. At. Spectrom.*, (1997), **12**, 479-486.
- [126] Pereira, E.R., Rohwedder, J. J.R., Arruda, M.A.Z. *Analyst*, (1998), **123**, 1023-1028.
- [127] Arruda, M.A., Gallego, M., Valcarcel, M. *J. Anal. At. Spectrom.*, (1995), **10**, 501-504.
- [128] Arruda, M.A.Z., Gallego, M., Valcarcel, M. *J. Anal. At. Spectrom.*, (1996), **11**, 169-173.
- [129] Yebra, M.C., Enríquez, M.F. *Analisis*, (1998), **26**, 261-263.
- [130] Betinelli, M., Beone, G.M., Spezia, S., Baffi, C. *Anal. Chim. Acta*, (2000), **424**, 289-296.
- [131] J. Mason, C., Coe G., M.E., Riby, P. *Analyst*, (2000), **125**, 1875-1883.
- [132] Gräber, C., Berndt, H. *J. Anal. At. Spectrom.*, (1999), **14**, 683-691.
- [133] Quaresma, M.C.B., Cassella, R.J., de la Guardia, M., Santelli, R.E. *Talanta*, (2004), **62**, 807-811.
- [134] Luque de Castro, M.D., Luque García, J.L. "Acceleration and automation of solid simple treatment" (2002) Elsevier, Amsterdam, Holanda, pp.43-82.
- [135] Filgueiras, A.V., Capelo, J.L., Lavilla, I., Bendicho, C. *Talanta*, (2000), **53**, 433-441.
- [136] Lima, E.C., Barbosa, F. Jr., Drug, F.J., Silva, M.M., Vale, M.G.R. *J. Anal. At. Spectrom.*, (2000), **15**, 995-1000.

- [137] Väisänen, A., Suontamo, R. *J. Anal. At. Spectrom.*, (2002), **17**, 739-742.
- [138] Chen, D., Lázaro, F., Luque de Castro, M.D., Valcárcel, M. *Anal. Chim. Acta*, (1989), **226**, 221-227.
- [139] Lázaro, F., Luque de Castro, M.D., Valcárcel, M. *Anal. Chim. Acta*, (1991), **242**, 283-289.
- [140] Ruiz-Jiménez, J., Luque-García, J.L., Luque de Castro, M.D. *Anal. Chim. Acta*, (2003), **480**, 231-237.
- [141] Luque-García, J.L., Luque de Castro, M.D. *Analyst*, (2002), **127**, 1115-1120.
- [142] Caballo-López, A., Luque de Castro, M.D. *Chromatographia*, (2003), **58**, 257-262.
- [143] Priego-Capote, F., Luque de Castro, M.D. *Anal. Bioanal. Chem.*, (2004), **378**, 1376-1381.
- [144] Burguera, J.L. *"Flow Injection Atomic Spectroscopy"* (1989) Marcel Dekker, Inc. New York.
- [145] Sanz-Medel, A. *"Flow analysis with Atomic Spectrometric Detectors"* (1999) Elsevier, Amsterdam.
- [146] Burguera, M., Burguera, J.L. *Anal. Chim. Acta*, (1988), **24**, 421-427.
- [147] Gluodenis, T.J., Tyson, Jr.F, Tyson, J. *J. Anal. At. Spectrom.*, (1992), **7**, 301-306.
- [148] Tyson, J.F., Bysouth, S.R., Grzeszyk, E.A., Debrah, E. *Anal. Chim. Acta*, (1992), **261**, 75-85.
- [149] Sweileh, J.A. *Microchem. J.*, (2000), **65**, 87-95.
- [150] Yebra, M.C., Enríquez, M.F., García, A., Moreno-Cid, A. *At. Spectrosc.*, (2000), **21**, 225-228.
- [151] Liva M., Muñoz-Olivas R., Cámara C. *Talanta*, (2000), **51**, 381-387.
- [152] Fernández, F.M., Tudino, M.B., Troccoli, O.E. *J. Anal. At. Spectrom.*, (2000), **15**, 687-695.
- [153] Yebra Biurrun, M.C., Enríquez Domínguez, M.F., Bermejo Barrera, M.P. *Analyst*, (1998), **123**, 105-108.
- [154] Cela, R., Blanco, M., Boqué, R., Coello, J., MasPOCH, S., Ortiz, M.C., Riba, J., Ruis, F.X., Ruiz, A., Sarabia, L.A., Tomás Y.X. *"Avance en Quimiometría Práctica"* (1994) Servicio de publicaciones de la Universidad de Santiago de Compostela. Santiago de Compostela, España, pp. 441-478.
- [155] Brereton, R.G. *"Chemometrics Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant"* (2003) John Wiley & Sons, Chinchester, Inglaterra, pp.15-102.
- [156] Box, G.E.P., Hunter, W.G., Hunter, JS. *"Estadística para Investigadores"* (1989) Reverté, Barcelona, España, pp. 385-429.
- [157] Deming, S.N., Morgan, S.L. *"Experimental design: a chemometric approach"* (1993) Elsevier, Amsterdam, pp. 342-348.

-
- [158] Plackett, R.L., Burman, H.D. *Biometrika*, (1946), **33**, 305-325.
- [159] Gardiner, W.P., Gettinby, G. "*Experimental Design Techniques in Statistical Practice-A Practical Software-based Approach*" (1998) Ellis Horwood, Chinchester, Sussex, UK, pp.227-228.
- [160] Wheeler, D.J. "*Tables of Screening Designs Statistical Process Controls*" (1989) Knoxville, Tennessee, USA.
- [161] Box, G.P.E., Hunter, W.G. *Technometrics*, (1961), **3**, 311-351; 449-458.
- [162] Ross, P.J. "*Taguchi Techniques for Quality Engineering: Loss Function, Orthogonal Experiments, Parameter and Tolerance Design*" (1988) Mc-Graw Hill, New York.
- [163] Jones, K. *Int. Lab.*, (1986), 32-45.
- [164] Statgraphic V.4.0 Statistical Package, (1997) Manugistic Inc., Rockville, MD, USA.
- [165] Hansen, E.H., Ruzicka, J. *Anal. Chim. Acta*, (1983), **148**, 11-125.
- [166] Valcárcel, M., Ríos, A. "*La calidad en los Laboratorios Analíticos*" (1992) Ed. Reverté, Barcelona, España.
- [167] Programa ULC (Calibración Lineal Univariante). Departamento de Química Analítica. Universidad de Tarragona.
- [168] Meloun, M., Milittky, M., Forina, M. "*Chemometric for Analytical Chemistry*" (1992) Ellis Horwood, Chinchester, England.

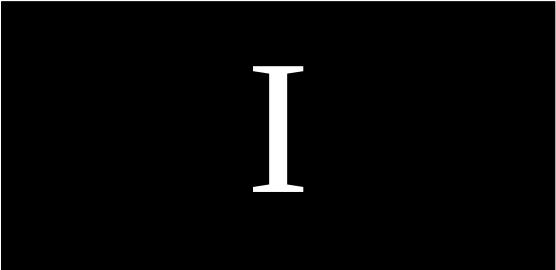
ANEXO: Trabajos publicados

Artículo I

**FLOW INJECTION DETERMINATION OF COPPER IN
MUSSELS BY FLAME ATOMIC ABSORPTION
SPECTROMETRY AFTER ON-LINE CONTINUOUS
ULTRASOUND-ASSISTED EXTRACTION**

A. Moreno-Cid & M.C. Yebra

Spectrochim. Acta, Part B: At. Spectrosc. (2002), **57B**, 967-974



I



ELSEVIER

Spectrochimica Acta Part B 57 (2002) 967–974

SPECTROCHIMICA
ACTA
PART B

www.elsevier.com/locate/sab

Flow injection determination of copper in mussels by flame atomic absorption spectrometry after on-line continuous ultrasound-assisted extraction

A. Moreno-Cid, M.C. Yebra*

Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Bromatology, Faculty of Chemistry, University of Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain

Received 7 December 2001; accepted 28 March 2002

A

Copper was extracted on-line from solid mussel samples by a simple and rapid continuous ultrasound-assisted extraction system (CUES). The CUES is connected to a flow injection manifold, which permits the on-line flame atomic absorption spectrometric determination of copper. The manifold is simple and the copper signal was obtained for a volume of 250 μl of acid leachate injected into an ultrapure water carrier stream. An experimental design was used for the optimization of the continuous leaching procedure. Compared to off-line ultrasonic-assisted extraction methods, sonication time is reduced by factors of 6–12, the leaching takes place at room temperature (20 $^{\circ}\text{C}$), and the analysis time is reduced because centrifugation was not necessary to separate the liquid phase. The method allowed a total sampling frequency of 11 samples h^{-1} , with a relative standard deviation for the complete procedure of 2.7% (for a sample containing 2.0 $\mu\text{g g}^{-1}$ copper (wet mass, $n=11$). The limit of detection was 0.06 $\mu\text{g g}^{-1}$ (wet mass) for 30 mg of sample. The analytical procedure was verified for a reference standard material (TORT-1). The analytical procedure was applied to mussel samples from Galicia (Spain). © 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Continuous ultrasound-assisted extraction system; Flame atomic absorption spectrometry; Copper determination; Mussels

Copper is an essential element for most organisms because it is involved in many metabolic processes. However, in high concentrations it can cause serious damage to living organisms [1].

Mussels are used as bioindicator organisms to assess bioavailable contaminant concentrations in seawater. Round bivalve molluscs are able to concentrate the copper concentration of seawater 3000-fold [2]. Hence, the determination of copper in mussels is an important aspect of food and environmental analysis.

Several methodologies have been proposed for the determination of trace metals in solid samples by electrothermal atomic absorption spectrometry

*Corresponding author. Tel.: +34-9-81-59-10-79; fax: +34-9-81-59-50-12.

E-mail address: qncayebi@usc.es (M.C. Yebra).

(ETAAS) and flame atomic absorption spectrometry (FAAS) [3–7]. Nevertheless, sample preparation is often the most time-consuming step of the analytical process and involves potential drawbacks, such as contamination or losses of some elements. Metal extraction can be achieved directly from the solid sample with some advantages, such as analysis of the undissolved sample, sample contamination is avoided and very low detection limits are achieved. However, this technique also has some drawbacks, such as the inability to achieve calibrations with solid standards, the presence of matrix interferences, non-homogeneity of the sample, poor precision of the results and the necessity of special atomizers [8]. As an alternative, the determination of trace metals in solid samples can be carried out with sample slurries, where the sample is introduced into the atomizer as an aliquot of a stable suspension. This method allows calibration with standard solutions, to which matrix modifiers may be added. The main problem of the slurry technique is heterogeneity of the samples. Conversion of the analyte to the liquid phase is possible in a wet acid extraction, microwave-assisted extraction or acid or alkaline ultrasound-assisted extraction. Flow injection (FI) digestion procedures involving microwave energy present some advantages over off-line methods, such as reduced digestion times, digestion of complex matrices and solubilization in a closed vessel (decreasing the losses of volatile analytes and atmospheric contamination, and increasing personal security). Due to the advantages offered, on-line microwave digestion has been used in different studies for the determination of trace metals in solid samples [9–11]. These systems present disadvantages, such as matrix interferences because sample matrix is introduced into the detector, and the need to insert a cooling area in the FI system due to the high temperature of the microwave oven. Ultrasound-assisted extraction is another way of converting the analyte to a liquid phase. This technique offers some advantages, such as a wide application field that includes any sample independent of form or size, the use of diluted acids and quantitative extraction of the analyte [12–15]. Nevertheless, these procedures are laborious and time-consuming because they involve

long sonication times (30–60 min) and a centrifugation step to separate the liquid phase. In none of these methods has FI been applied. Ultrasound-assisted extraction has only been applied in the continuous mode coupled on-line to a UV/Vis spectrometer for the determination of boron in soils [16] and iron in plant materials [17]. Nevertheless, these FI manifolds present several drawbacks, such as the need for a complicated sample cell, a flow of standard solution through the leaching circuit, which can produce carry-over, and continuous flow of acid extract through the detector, which can damage the metallic parts of the nebulizer.

In this paper a novel and simple continuous ultrasound-assisted extraction system (CUES) coupled to a FI manifold for the acid leaching of Cu and its determination by FAAS in solid mussel is described. This method combines the benefits of ultrasound-assisted extraction with those obtained for FI systems and avoids the drawbacks present in previous on-line approaches for ultrasonic extraction.

2.1. Instrumentation

A Perkin Elmer 5000 atomic absorption spectrometer with a copper hollow-cathode lamp was used. The wavelength was set at 324.8 nm. The aspiration flow rate of the nebulizer was adjusted to be the same as the flow rate of the carrier (3.5 ml min^{-1}). The spectrometer output was connected to a Perkin Elmer 50 servograph recorder with a range of 5 mV. The signal measured was the height of the absorbance peaks. The CUES comprises a Gilson Minipuls-3 peristaltic pump fitted with Viton tubes, an ultrasonic bath (Selecta) and a glass minicolumn (50 mm $\times$ 3 mm i.d., bed volume 350 μl ; Omnifit). The ends of the minicolumn were plugged with filter paper. The FI manifold for Cu determination comprises a Gilson Minipuls-3 peristaltic pump fitted with PVC tubes and three Rheodyne (models 5041 and 5301) injection or switching valves. PTFE tubes (0.8 mm i.d.) were employed.

Numerical analysis of experimental designs was performed by means of the STATGRAPHIC V.4.1 statistical package (Manugistic Inc, Rockville, MD, USA) [18].

2.2. Reagents

Ultrapure water of $18.3 \text{ M } \Omega \text{ cm}$ resistivity obtained from a Milli-Q water purification system (Millipore) was used for the preparation of samples, reagents and standards. The glassware used was cleaned in 4 M HNO_3 for 4 days and rinsed with ultrapure water before use. Hydrochloric acid, nitric acid and copper standard were of reagent grade (Merck). The certified reference material used was TORT-1, lobster hepatopancreas marine (National Research Council of Canada).

2.3. Sample preparation

Mussel samples were triturated, homogenized and freeze-dried, and then kept in clean, dry containers. After sieving, fractions with particle size under $100 \mu\text{m}$ were taken.

2.4. Procedure for copper determination in mussel samples

Mussel samples (30 mg) were directly weighed into the glass minicolumn. The minicolumn was then connected to the CUES. The continuous copper determination system is shown in Fig. 1. First, the CUES circuit (1.3 ml) was loaded with the acid leaching solution (3 M hydrochloric acid and 3 M nitric acid). Once the CUES circuit was closed, the leaching solution was circulated at 3.5 ml min^{-1} through the minicolumn for 5 min under ultrasonic treatment, changing the direction of the flow each 30 s in order to avoid sample accumulation at the minicolumn ends. The switching valve (SV) was then changed to its other position and the acid extract was homogenized on the mixing coil. A volume of $250 \mu\text{l}$ of acid extract was injected by means of the injection valve (IV) into an ultrapure water carrier stream and the copper signal was continuously monitored by FAAS. Aliquots of $250 \mu\text{l}$ of standard solutions containing between 0 and $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ of copper, in the same

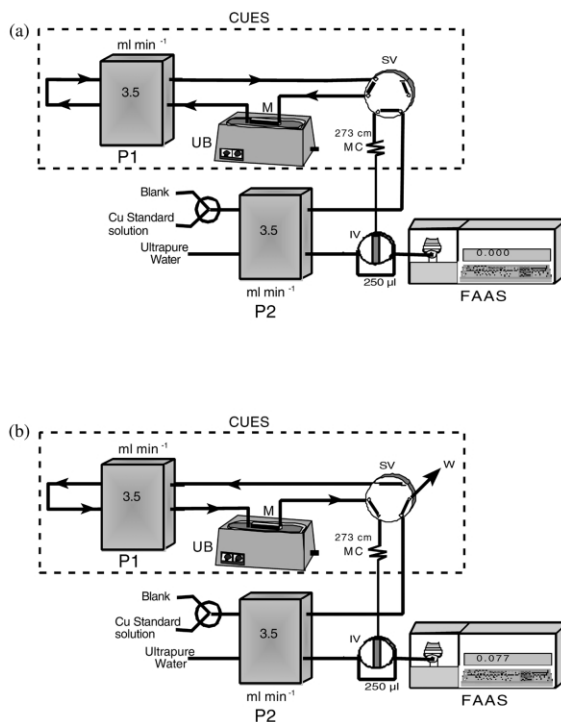


Fig. 1. Schematic diagram of the CUES and optimum working conditions for the on-line Cu determination: (a) on-line acid leaching step; (b) continuous detection of Cu. P1 and P2, peristaltic pumps; UB, ultrasonic bath; M, minicolumn; IV, injection valve; SV, switching valve; MC, mixing coil; W, waste; and FAAS, flame atomic-absorption spectrometer.

acid medium as the leaching solution, were injected by means of IV into an ultrapure water carrier stream. Blank determinations were performed using the acid leaching solution, and in all instances the absorbance was 0.000.

3.1. Optimization of the continuous ultrasonic extraction of copper from mussel samples

The number of variables that affect the CUES is very large: HNO_3 , HCl and H_2O_2 concentrations (leaching solution); sonication time; leaching temperature; flow rate of the CUES; and leaching volume. If a two-level full factorial design (2^7) is applied, 128 experiments need to be performed, besides the replicates needed for statistical evalu-

Table 1

Factor levels in Plackett Burman factorial design and their optimum values

Factor	Key	Low	High	Optimum
HNO ₃ concentration (M)	A	0	3	3
HCl concentration (M)	B	0	3	3
H ₂ O ₂ concentration (M)	C	0	1.5	0
Sonication time (min)	D	0.5	5	5
Leaching temperature (°C)	E	20	70	20
CUES flow rate (ml min ⁻¹)	F	3.5	6	3.5
Leaching volume (ml)	G	1.0	3	1.3

ation of the coefficients for the fitted model and the degree of coincidence of the hyperplane achieved with the true response surface. Plackett Burman designs are principally used when the number of variables having influence on the analytical system is very large. They are also appropriate when some of the variables may have negligible main effects and interactions, or when higher-order interactions are insignificant. Intentionally confounding some of the experimental effects, but still obtaining knowledge about system tendencies, can reduce the number of experimental runs [19].

In this paper, a Plackett Burman $2^7 \times 3/32$ factorial type III resolution design with one centerpoint has been selected, allowing four degrees of freedom (number of runs – number of factors – number of centerpoints – 1) which involved 13 non-randomized runs. In order to test statistical significance of the effects, ANOVA according to STATGRAPHIC V. 4.1 [18] was carried out. This same factorial design has been successfully applied by our investigation team for the optimization of a field flow preconcentration system (FFPS) and FI elution of copper from seawater samples [20]. In this work, the Plackett Burman $2^7 \times 3/32$ factorial design has been applied to a certified reference material (10 mg, TORT-1) with a copper content of $439 \pm 22 \mu\text{g g}^{-1}$. To optimize the CUES, copper was measured on-line in the leachate by FAAS with a flow system similar to that depicted in Fig. 1. The variable response was % Cu recovery.

Table 1 shows the lower and upper levels for each variable studied. These values were chosen

from the data available and experience developed in previous experiments. Table 2 summarizes the design matrix and the extraction yield obtained in each of the experiments; the results are expressed as percentages. The numerical analysis of the results given in the recovery column of Table 2 produced the standardized main-effects Pareto chart shown in Fig. 2. In this chart, bar lengths are proportional to the absolute value of the estimated effects, which helps in comparing the relative importance of effects. The conclusions from the data are that copper extraction was affected by three statistically significant factors, HNO₃ and HCl concentrations (leaching solution) and sonication time. Such factors were higher than the limit of statistical significance (at 95% confidence); all of them have a positive sign. This means that, for the levels tested, increasing these factors favors copper extraction efficiency. In the case of sonication time, this behavior is logical, because the contact time between sample and leaching solution is increased. Although H₂O₂ is another component of the leaching solution, it did not present statistical significance on copper recovery; this could be due to the generation of a great amount of bubbles produced by H₂O₂ at the experimentation phase. Therefore, in order to avoid bubble generation and due to a lack of knowledge about the leaching volume introduced into the

Table 2

Design matrix and response values in Plackett Burman factorial design

Experimental run	Factor							Copper recovery (%)
	A	B	C	D	E	F	G	
1	+	–	+	–	–	–	+	62
2	+	+	–	+	–	–	–	84
3	–	+	+	–	+	–	–	45
4	+	–	+	+	–	+	–	98
5	+	+	–	+	+	–	+	102
6	+	+	+	–	+	+	–	63
7	0	0	0	0	0	0	0	44
8	–	+	+	+	–	+	+	62
9	–	–	+	+	+	–	+	30
10	–	–	–	+	+	+	–	3
11	+	–	–	–	+	+	+	14
12	–	+	–	–	–	+	+	39
13	–	–	–	–	–	–	–	0

system when H_2O_2 was used as a component of the leaching solution, it has been necessary to fix this variable at the lowest value tested in the design (0%).

With the help of response surfaces estimated for the Plackett–Burman design, complementary knowledge about the system behavior or tendency is obtained, principally when the most significant factors are considered. The response surface in Fig. 3 obtained for the model considering HNO_3 and HCl concentrations shows that the copper extraction efficiency is proportional to both variables, and the best responses (Cu recovery %) are obtained at the highest levels tested for these variables. According to the results, a new experimental design shifted in the direction of higher values of HNO_3 and HCl concentrations and sonication time would be desirable. It must, however, be taken into account that elevated acid concentrations can produce serious damage to the spectrometer nebulizer, and good copper recovery values (approx. 100 %) are obtained for the high levels tested, so 3 M is a suitable concentration for HNO_3 and HCl solutions.

Leaching temperature and CUES flow rate show

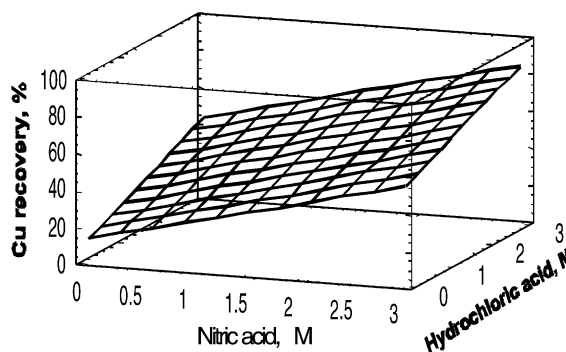


Fig. 3. Response surface estimated for the design obtained by plotting the HNO_3 and HCl concentrations.

a negative influence on copper leaching, which suggests that they inhibit the extraction at the highest levels tested. Leaching volume hardly affects copper recovery, although this variable will be fine-tuned in further experiments outside the framework of the design. A time of 5 min for sonication is enough to attain a close contact between the sample and leaching solution and to achieve a high sampling frequency. Due to the low influence of leaching volume on copper recovery,

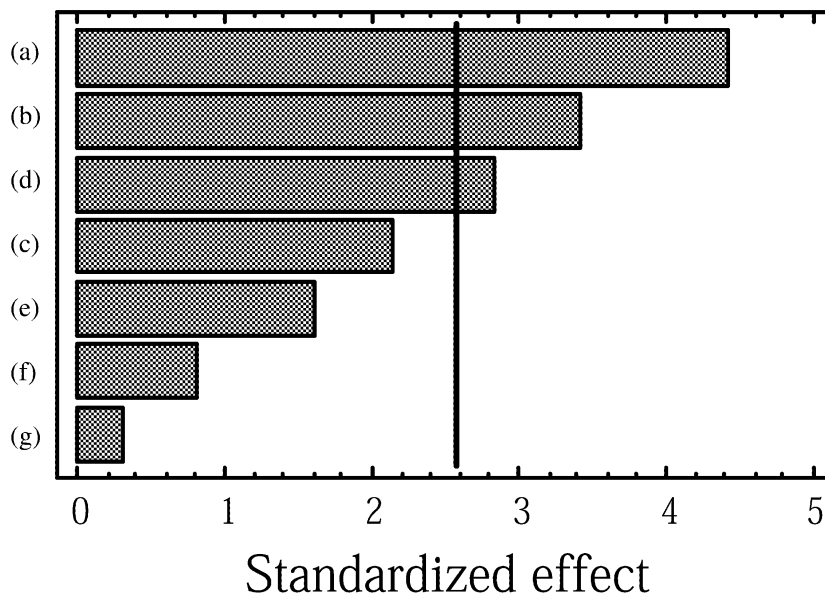


Fig. 2. Pareto charts of main effects for the Plackett Burman factorial design obtained using copper recovery values. The vertical lines indicate the statistical significance bound for the effects.

the maximum value is obtained at the highest level of HNO_3 concentration without leaching volume influence. Taking into account these results, further experiments were conducted to fine-tune the leaching volume. Two experiments were performed keeping the leaching volume at values lower than those fixed by the framework of design (1.0 and 1.3 ml). This proof was obtained to determine the experimental limitations imposed by the device. The best copper recovery values were obtained with a leaching volume of 1.3 ml.

Table 1 shows the optimum factor values affecting the CUES for copper extraction in mussel samples.

Two sample variables that can affect the acid extraction process have been studied: the mussel particle size and the amount of sample. Using the optimum CUES conditions, particle sizes of <30 and $30\text{--}100\text{ }\mu\text{m}$ were tested. The results obtained indicate that this variable does not affect the extraction process. This can be explained by the high energy supplied by the ultrasound energy (frequency of 40 kHz), which increases the contact between the sample and the leaching solution. As an amount of 10 mg was used to optimize the CUES system and optimum results were obtained, we suppose that smaller quantities would also be suitable. However, it is important to know the maximum amount of sample that is quantitatively leached in order to increase the sensitivity of the method. Sample amounts of $20\text{--}60\text{ mg}$ were studied. Results demonstrated that sample amounts greater than 30 mg produce high pressure in the CUES. Therefore, the maximum sample amount used is 30 mg.

The mixing coil length used to homogenize the acid extract was fixed at 273 cm (equivalent to 1.3 ml, the same as the volume of acid extract). The variables of this flow system studied (Fig. 1) were the carrier flow rate (ultrapure water) and the volume of acid extract injected. Carrier flow rates of $3\text{--}6\text{ ml min}^{-1}$ and injection volumes of acid extract of $100\text{--}400\text{ }\mu\text{l}$ were used. The aspiration flow rate of the nebulizer was adjusted to be the same as the flow rate of the carrier solution. Although a greater aspiration flow rate provides better sensitivity, this is accompanied by greater dispersion because the carrier flow-rate is increas-

ing. Therefore, a carrier flow rate of 3.5 ml min^{-1} was chosen as a compromise to obtain minimum dispersion in the flow system. With regard to the injection volume, it was verified that the sensitivity increased with increasing volume, as expected. Therefore, a volume of $250\text{ }\mu\text{l}$ was chosen; this also allows two injections of each acid extract, and thus it is possible to verify the sample homogeneity.

3.2. Analytical figures of merit

The calibration graph was run ($n=8$) under the optimal chemical and flow conditions for the global process; the equation was absorbance = $6.6 \times 10^{-4} + 0.046X$ ($X=0\text{--}5\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$).

The precision of the continuous analytical method obtained for the real samples was checked on a sample containing $2.0\text{ }\mu\text{g g}^{-1}$ (wet mass) copper ($n=11$). The relative standard deviation of the result was 2.7%. The limit of detection (LOD) based on three times the standard deviation ($n=30$) of the blank was found to be $0.31\text{ }\mu\text{g g}^{-1}$ (dry mass) or $0.06\text{ }\mu\text{g g}^{-1}$ (wet mass) for 30 mg of sample. The validation of the method was performed using a certified reference material, TORT-1 (lobster hepatopancreas) with a Cu content of $439 \pm 22\text{ }\mu\text{g g}^{-1}$. The Cu content obtained (mean $\pm$ S.D., $n=4$) was $438.7 \pm 0.2\text{ }\mu\text{g g}^{-1}$, which agrees with the certified value. The sample throughput, taking into account the global process, was ca. 11 samples h^{-1} .

The method was applied to determine Cu in various mussel samples collected from Galicia (Spain). The concentration of Cu in the mussel samples ranged between 1.2 and $3.6\text{ }\mu\text{g g}^{-1}$ (wet mass).

The continuous ultrasound-assisted extraction system (CUES) combined with a FI manifold has been demonstrated to be a rapid, precise and accurate sample pre-treatment procedure for the acid leaching of Cu and its determination by FAAS in solid samples. The main goals obtained with

the method proposed are a reduction in sample contamination and analyte losses. This is because less manipulation of the sample is required, reduced sample and reagent amounts are needed and a reduction in the sample preparation time is achieved. Compared to off-line ultrasonic-assisted extraction methods, the sonication time is reduced by a factor of 6–12 and the centrifugation step to separate the liquid phase is avoided. These two last advantages significantly increase the sample throughput.

This procedure combines the benefits of ultrasound-assisted extraction with those obtained for FI systems, and avoids the drawbacks that present the previous FI approaches for ultrasonic extraction that involve a complicated sample cell and the need to use a debubbler.

A

The authors are grateful for the financial support provided by the Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA). Ministerio de Ciencia y Tecnología (Project No CAL01-043).

- [1] E. Merian, *Metals and their Compounds in the Environment*, VCH, Weinheim, 1991.
- [2] J. Brown, A. Colling, D. Park, J. Phillips, D. Rothery, J. Wright, *Seawater: Its Composition, Properties and Behavior*, Pergamon Press, Oxford, 1989.
- [3] M.C. Yebra Biurrun, M.F. Enríquez Domínguez, M.P. Bermejo Barrera, Determination of cadmium in mussels by flame atomic absorption spectrometry with preconcentration on a chelating resin in a flow injection system, *Analyst* 123 (1998) 105–108.
- [4] M.C. Yebra, M.F. Enríquez, Optimized microwave digestion procedure for cadmium analysis of mussel samples, *Analysis* 126 (1998) 261–263.
- [5] J.A. Sweileh, On-line flow injection solid sample introduction digestion and analysis: spectrophotometric and atomic absorption determination of iron, copper and zinc in multi-vitamin tablets, *Microchem. J.* 65 (2000) 87–95.
- [6] M.C. Yebra, M.F. Enríquez, A. García, A. Moreno-Cid, Trace level determination of lead by flame AAS using on-line separation and preconcentration, *At. Spectrosc.* 21 (2000) 225–228.
- [7] M. Liva, R. Muñoz-Olivas, C. Cámara, Determination of Cd in sonicate slurries and leachates of biological and environmental materials by FI-CV-AAS, *Talanta* 51 (2000) 381–387.
- [8] E. Marlon de Moraes Flores, A. Ben da Costa, J. Smanioto Barin, V. Luis Dressler, J. Neri Gottfried Paniz, A. Figueiredo Martins, Direct flame solid sampling for atomic absorption spectrometry: determination of copper in bovine liver, *Spectrochim. Acta Part B* 56 (2001) 1875–1882.
- [9] E.R. Pereira, J.R. Rohwedder, M.A.Z. Arruda, On-line microwave slurry sample digestion using flow systems for the spectrophotometric determination of iron in seafood, *Analyst* 123 (1998) 1023–1028.
- [10] J.C. Mason, G. Coe, M. Edwards, P. Riby, Development of a wide-bore flow-through microwave digestion device for the determination of trace metals in soil, *Analyst* 125 (2000) 1875–1883.
- [11] M. Betinelli, G.M. Beone, S. Spezia, C. Baffi, Determination of heavy metals in soils and sediments by microwave-assisted digestion and inductively coupled plasma optical emission spectrometry analysis, *Anal. Chim. Acta* 424 (2000) 289–296.
- [12] L. Amoedo, J.L. Capelo, I. Lavilla, C. Bendicho, Ultrasound-assisted extraction of lead from solid samples: a new perspective on the slurry-based sample preparation methods for electrothermal atomic absorption spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* 14 (1999) 1221–1226.
- [13] P. Bermejo-Barrera, A. Moreda-Pineiro, O. Muniz-Naveiro, A.M.J. Gomez-Fernandez, A. Bermejo-Barrera, Optimisation of a microwave-pseudo-digestion procedure by experimental designs for the determination of trace elements in seafood products by atomic absorption spectrometry, *Spectrochim. Acta Part B* 55 (2000) 1351–1371.
- [14] P. Bermejo-Barrera, O. Muniz-Naveiro, A. Moreda-Pineiro, A. Bermejo-Barrera, The multivariate optimization of ultrasonic bath-induced acid leaching for the determination of trace elements in seafood products by atomic absorption spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 439 (2001) 211–227.
- [15] K. Ashley, R.N. Andrews, L. Cavazos, M. Demange, Ultrasonic extraction as a sample preparation technique for elemental analysis by atomic spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* 16 (2001) 1147–1153.
- [16] D. Chen, F. Lázaro, M.D. Luque de Castro, M. Valcárcel, Direct spectrophotometric determination of total boron in soils with ultrasonic leaching in automatic flow systems, *Anal. Chim. Acta* 226 (1989) 221–227.
- [17] F. Lázaro, M.D. Luque de Castro, M. Valcárcel, Direct introduction of solid samples into continuous-flow systems by use of ultrasonic irradiation, *Anal. Chim. Acta* 242 (1991) 283–289.

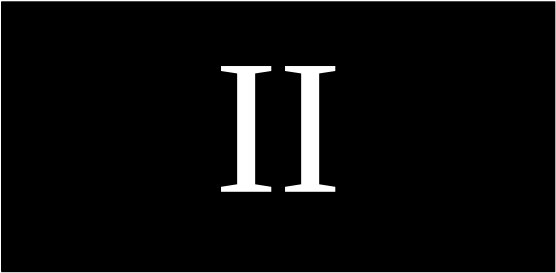
- [18] STATGRAPHIC V. 4.1 Statistical Package, Manugistic Inc, Rockville, MD, USA, 1997.
- [19] S.N. Deming, S.L. Morgan, *Experimental Design: A Chemometric Approach*, Elsevier, Amsterdam, 1993, Chapter 14.
- [20] M.C. Yebra, N. Carro, A. Moreno-Cid, Optimization of a field flow preconcentration system by experimental design for the determination of copper in seawater by flow-injection atomic absorption spectrometry, *Spectrochim. Acta Part B* 57 (2002) 85–93.

Artículo II

**CONTINUOUS ULTRASOUND-ASSISTED EXTRACTION OF
IRON FROM MUSSEL SAMPLES COUPLED TO A FLOW
INJECTION-ATOMIC SPECTROMETRIC SYSTEM**

M.C. Yebra & A. Moreno-Cid

J. Anal. At. Spectrom. (2002), **17**, 1425-1428



II

Continuous ultrasound-assisted extraction of iron from mussel samples coupled to a flow injection-atomic spectrometric system

M. C. Yebra* and A. Moreno-Cid

Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Bromatology, Faculty of Chemistry, University of Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain.
E-mail: qncayebi@usc.es; Fax: 34981595012

Received 26th April 2002, Accepted 3rd July 2002

First published as an Advance Article on the web 14th August 2002

Iron was extracted on-line from solid mussel samples by a simple continuous ultrasound-assisted extraction system (CUES) connected to a flow injection manifold, followed by on-line flame atomic absorption spectrometric determination. An experimental design was used for the optimisation of the CUES. The method allowed a total sampling frequency of 11 samples per hour, with a relative standard deviation for the complete procedure of 0.5% [for a sample containing $217.3 \mu\text{g g}^{-1}$ iron (dry mass)]. The detection limit was $0.7 \mu\text{g g}^{-1}$ (dry mass) for a sample amount of 30 mg. Accurate results were obtained by measuring TORT-1 certified reference material. The results demonstrated that this method was simple, quantitative and sufficiently sensitive for iron determination in mussel samples.

Introduction

Preparation of a solid sample for trace metal determination is often the most time consuming step of the analytical process and involves some potential drawbacks, such as contamination or losses of some elements.¹ Analyte detection can be realised by direct determination in solid samples or by slurry sampling. The direct utilisation of solid samples presents several advantages such as analysis of the undissolved sample (avoiding sample contamination) and low detection limits. However, this technique has also some drawbacks such as the inability of achieving calibrations with solid standards, the presence of matrix interferences, non-homogeneity of the sample, poor precision of the results and the necessity of special atomisers.²⁻⁴ As an alternative, determination of trace metals in solid samples can be carried out with sample slurries, where the sample is introduced into the atomiser as an aliquot of a stable suspension. This method allows calibration with standard solutions, to which matrix modifiers may be added. The main problem of the slurry technique is heterogeneity of the samples.⁵ Conversion of the analyte to the liquid phase is possible by wet acid extraction, microwave-assisted extraction, or acid or alkaline ultrasound-assisted extraction.⁶⁻⁸ Flow injection (FI) digestion procedures involving microwave energy present some advantages over their manual counterparts, such as smaller digestion times, easy digestion of complex matrices and the use of a closed vessel (decreasing the losses of volatile analytes and increasing personal safety). Due to these advantages, microwaves have been used on-line in different studies for the determination of trace metals.⁹⁻¹¹ However, these systems present some drawbacks such as matrix interferences (because the sample matrix is introduced into the detector) and the need of a cooling area in the FI system (due to the high temperature of the microwave oven). Ultrasound-assisted extraction is another way of converting the analyte to a liquid phase. This technique offers some advantages such as a wide application field that includes any sample, independent of form or size, the use of dilute acids and a quantitative extraction of the analyte. Nevertheless, these procedures are laborious and time consuming because they involve long sonication times (10–120 min), and a centrifugation step to separate the liquid phase (10–20 min).¹²⁻¹⁶ In

addition, none of these methods have applied FI to measure trace metals after ultrasonic extraction on-line. Ultrasound-assisted extraction has only been applied in the continuous mode coupled on-line to a UV-Vis spectrometer for the determination of boron in soils¹⁷ and iron in plant materials.¹⁸ Nevertheless, these FI manifolds present several drawbacks involving a complicated sample cell, standard solutions flowing through the leaching circuit, which can produce carry-over, and the acid extract arriving continuously to the detector, which could injure the metallic parts of the nebuliser.

For the first time, in this paper, a novel simple continuous ultrasound-assisted extraction system (CUES) incorporated to an on-line flow-injection manifold is described for the acid leaching of Fe and its determination by FI-FAAS in solid mussel samples. This procedure combines the benefits of ultrasound-assisted extraction with those obtained for FI systems and avoids the drawbacks of previous FI approaches for ultrasonic extraction.

Experimental

Apparatus

A PerkinElmer 5000 atomic absorption spectrometer furnished with an iron hollow-cathode lamp was used. The instrument was set at 248.3 nm. The aspiration flow rate of the nebuliser was adjusted to be the same as the flow rate of the carrier (3.5 ml min^{-1}). The spectrometer output was connected to a PerkinElmer 50 servograph recorder with a range of 5 mV. As can be seen in Fig. 1, the continuous ultrasound-assisted extraction system (CUES) comprised a Gilson Minipuls-3 peristaltic pump fitted with viton tubes, an ultrasonic bath (Selecta) and a glass minicolumn ($50 \text{ mm} \times 3 \text{ mm id}$, bed volume $350 \mu\text{l}$) (Omnifit). The ends of the minicolumn were plugged with filter paper (Whatman 541). The FI manifold for Fe determination comprised a Gilson Minipuls-3 peristaltic pump fitted with PVC tubes and three Reodyne (Models 5041 and 5301) injection or switching valves. PTFE tubes (0.8 mm id) were employed. Numerical analysis of experimental designs was performed by means of the Statgraphic V.4.1 statistical package (Manugistic, Inc. Rockville, MD, USA, 1997).

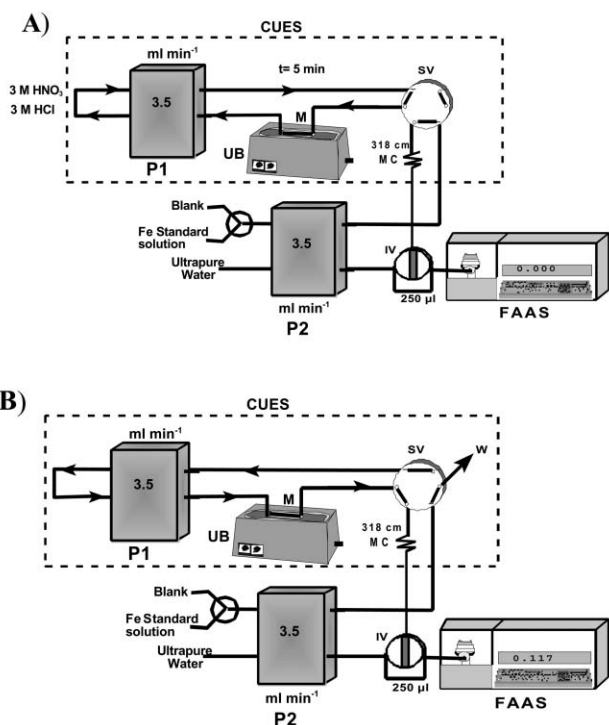


Fig. 1 Schematic diagram of the CUES and optimum working conditions for the on-line Fe determination: A) on-line acid leaching step; and B) continuous detection of Fe. P1 and P2, peristaltic pumps; UB, ultrasonic bath; M, minicolumn; IV, injection valve; SV, switching valve; MC, mixing coil; W, waste; and FAAS, flame atomic absorption spectrometer.

Reagents

Ultrapure water of 18.3 MΩ cm resistivity obtained from a Milli-Q water purification system (Millipore) was used for the preparation of samples, reagents and standards. The glassware used was cleaned in 4 M HNO₃ for 4 days and rinsed with ultrapure water before use. Hydrochloric acid, nitric acid, and the iron standard were of reagent grade (Merck). The certified reference material used was TORT-1, Lobster Hepatopancreas Marine (National Research Council of Canada).

Sample preparation

Mussel samples were triturated, homogenised and freeze-dried, and then kept in clean, dry containers. After sieving, fractions with particle sizes under 100 μm were taken.

Procedure for iron determination in mussel samples

Mussel samples, 30 mg, were directly weighed into a glass minicolumn, which was then connected to the CUES. The continuous iron determination system is shown in Fig. 1. First, the CUES circuit (1.6 ml) was loaded with the acid leaching solution (3 M nitric acid and 3 M hydrochloric acid). Once the CUES circuit was closed, the leaching solution was circulated at 3.5 ml min⁻¹ through the minicolumn for 5 min under ultrasonic treatment, changing the direction of the flow each 30 s in order to avoid sample accumulation in the minicolumn end. Then, the switching valve was switched to its other position and the acid extract was homogenised on the mixing coil. A volume of 250 μl of acid extract was injected by means of the injection valve into an ultrapure water carrier stream that swept it to the detector. 250 μl of a standard solution containing between 0 and 5 μg ml⁻¹ iron, in the same acid medium as leaching solution, were injected by means of the injection valve into an ultrapure water carrier stream. Using the acid leaching solution blank determinations were performed. In all instances, the absorbance was 0.000.

Results and discussion

Optimisation of the continuous ultrasonic extraction of iron from mussel samples

The number of variables that affect the CUES is very large: HNO₃ and HCl concentrations (leaching solution), sonication time, leaching temperature, flow rate of the CUES and leaching volume. Plackett Burman designs are used principally when the number of variables having an influence on the analytical system is very large because such designs permit the use of a full factorial design, obtaining numbers of factor combinations that are a multiple of four.¹⁹ In this paper, a Plackett Burman 2⁶ × 3/16 factorial type III resolution design (involving 12 experiments, 6 variables) with one centerpoint was selected, allowing 5 degrees of freedom (number of runs – number of factors – number of centerpoints – 1) which involve 13 non-randomised runs. In order to test the statistical significance of the effects, an ANOVA system was employed by Statgraphic V. 4.1. This factorial design was applied to a certified reference material (10 mg, TORT-1) with an iron content of 186 ± 11 μg g⁻¹. To optimise the CUES, iron was measured on-line in the acid extract by FAAS with a flow system similar to that depicted in Fig. 1. The variable response was %Fe recovery. Table 1 shows the lower and upper levels for each studied variable. Table 2 summarizes the design matrix and the extraction yield obtained in each of the experiments; the results are expressed as percentages. The numerical analysis of the results given in the recovery column of Table 2 produced the standardized main effects Pareto Chart (Fig. 2). The conclusions, extracted from analysis data, are that iron extraction appeared to be affected positively by three statistically significant factors: HNO₃ and

Table 1 Factor levels in Plackett Burman factorial design and their optimum values

Factor	Key	Low	High	Optimum
HNO ₃ concentration/M	A	0	3	3.0
HCl concentration/M	B	0	3	3.0
Sonication time/min	C	0.5	5	5
Leaching temperature/°C	D	20 ^a	70	20
Flow rate of the CUES/ml min ⁻¹	E	3.5	6	3.5
Leaching volume/ml	F	1.0	3.0	1.0 (10 mg of sample) 1.3 (20 mg of sample) 1.6 (30 mg of sample)

^aRoom temperature.

Table 2 Design matrix and response values in Plackett Burman factorial design

Experimental Runs	Factors						% Recovery
	A	B	C	D	E	F	
1	+	–	+	–	–	–	69.8
2	+	+	–	+	–	–	91.3
3	–	+	+	–	+	–	80.5
4	+	–	+	+	–	+	94.0
5	+	+	–	+	+	–	65.2
6	+	+	+	–	+	+	103.2
7	0	0	0	0	0	0	21.1
8	–	+	+	+	–	+	103.2
9	–	–	+	+	+	–	12.9
10	–	–	–	+	+	+	0
11	+	–	–	–	+	+	47.9
12	–	+	–	–	–	+	65.6
13	–	–	–	–	–	–	5.2

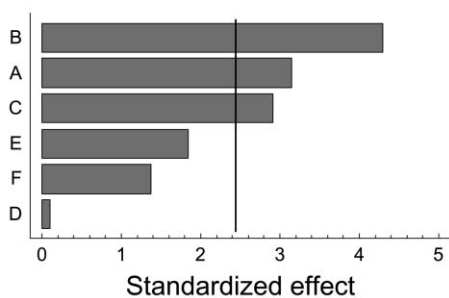


Fig. 2 Standardized ($P = 95\%$) main effects Pareto chart for the Plackett Burman design ($2^6*3/16$) for continuous ultrasonic acid extraction of iron from mussel samples.

HCl concentrations (leaching solution) and sonication time. Such factors overtake the limit of statistical significance (at 95% confidence). According to the results, a new experimental design shifted in the direction of higher values of HNO_3 and HCl concentrations and sonication time would be desirable. It must, however, be taken into account that elevated acid concentrations can produce serious damages in the spectrometer nebulizer, and quantitative iron recoveries (about 100%) were obtained with the upper levels tested. So 3 M HNO_3 and HCl solutions were chosen as optimum. A sonication time of 5 min was enough to attain a close contact between the sample and leaching solution and to achieve a high sampling frequency. Given these findings, we decided to work with the operational conditions of the CUES given in Table 1 under the optimum values heading.

Finally, two variables that can affect the acid extraction process were studied. These variables are the mussel particle size and the amount of sample. By using the optimum conditions of the CUES, particle sizes smaller than 30 μm and between 30–100 μm were tested. The results obtained indicated that this variable does not affect the extraction process. This is a result of the high energy supplied by the ultrasound energy (frequency of 40 KHz), which increases the contact between the sample and the leaching solution. As optimum results were obtained when a sample amount of 10 mg was used to optimise the CUES system, we presumed that smaller quantities would also be suitable. However, it is important to know the maximum amount of sample that is quantitatively leached in order to increase the sensitivity of the method. Therefore, sample amounts between 20 and 40 mg were studied and the results obtained demonstrated that iron was not quantitatively extracted from amounts of sample greater than 10 mg (71.8% recovery). Sample amounts greater than 10 mg required more leaching solution for quantitative iron recovery. Thus, 20 mg required 1.3 ml and 30 mg required 1.6 ml to obtain quantitative iron extraction. As sample amounts greater than 30 mg produced a great pressure in the CUES, the maximum sample amount that could be used was 30 mg with an optimum leaching solution volume of 1.6 ml.

With regard to the remaining parameters of the FI system, the mixing coil length, to homogenise the acid extract, was fixed at 318 cm (equivalent to 1.6 ml, the same volume of acid extract for 30 mg of sample). The FI variables studied were the carrier flow rate (ultrapure water) and the injected volume of the acid extract. The carrier flow rate was studied between 3 and 6 ml min^{-1} and the injected volume of acid extract between 100 and 400 μl . The aspiration flow rate of the nebuliser was adjusted to be the same as the flow rate of the carrier solution. Although the greater aspiration flow rate provided better sensitivity, a greater dispersion took place at the same time because the carrier flow rate was increasing. Therefore, a carrier flow rate of 3.5 ml min^{-1} (dispersion equal to 1.1) was chosen as a compromise to obtain the minimum dispersion in the flow system. With respect to the injected volume it was

verified that, when the volume was increased, the sensitivity increased. Therefore, a volume of 250 μl was chosen, which, in addition, allowed two acid-extract injections of each sample to verify its homogeneity.

Analytical figures of merit

The calibration graph was run ($n = 8$) under the optimal chemical and flow conditions for the global process. The equation was: absorbance = $6.2 \times 10^{-4} + 3.0 \times 10^{-2} X$ ($X = 0\text{--}5 \mu\text{g ml}^{-1}$) with an intercept standard error of 1.1×10^{-3} and a slope standard error of 4.0×10^{-4} . The linear range was between 5.0 and 293.3 $\mu\text{g g}^{-1}$.

The validation of the method was performed using 30 mg of a certified reference material, TORT-1 (Lobster Hepatopancreas) with an Fe content of $186 \pm 11 \mu\text{g g}^{-1}$. The Fe content obtained (mean $\pm$ SD, $n = 3$) was $188.0 \pm 1.0 \mu\text{g g}^{-1}$, which agrees with the certified value. The precision of the continuous analytical method obtained for the real samples was checked using a sample containing 217.3 $\mu\text{g g}^{-1}$ (dry mass) iron ($n = 11$). The result, expressed as relative standard deviation, was 0.5%. The precision was also checked on the certified reference material TORT-1 with an iron concentration lower than mussel samples. The result, expressed as relative standard deviation, was 0.7% ($n = 11$). The limit of detection (LOD) based on three times the standard deviation ($n = 30$) of the blank was found to be 0.7 $\mu\text{g g}^{-1}$ (dry mass) for 30 mg of sample. The sample throughput, taking into account the global process, was ca. 11 samples h^{-1} .

Analysis of mussel samples

The method was applied to the determination of Fe in various mussel samples collected from Galicia (Spain). The results obtained with the proposed method were compared with those achieved by a conventional off-line sample digestion method using concentrated nitric acid with subsequent iron determination by FAAS. To compare the results obtained by both methods, the paired t -test was applied.²⁰ As shown in Table 3, since the calculated t value was smaller than that obtained from the t -distribution table, the null hypothesis was retained: both methods do not give significantly different values for the iron concentration and thus, the agreement between the two methods is satisfactory. Table 3 shows that the recovery of iron is satisfactory.

Table 3 Paired t -test. X (mean difference) = -0.28 ; SD = 0.96; $n = 12$; $t = X/n/\text{SD} = 0.99$; critical value of t ($P = 0.05$) = 2.23

Sample No.	Fe/ $\mu\text{g g}^{-1}$ (dry mass)			
	Off-line acid digestion and FAAS determination ^a	Present method ^a	Difference	% Recovery ^b
1	255.8 $\pm$ 2.3	254.7 $\pm$ 1.0	+1.1	99.6
2	257.1 $\pm$ 2.3	257.1 $\pm$ 1.0	0.0	100.0
3	217.6 $\pm$ 2.3	216.0 $\pm$ 1.0	+1.6	99.3
4	220.2 $\pm$ 0.0	220.8 $\pm$ 1.0	-0.6	100.3
5	227.8 $\pm$ 0.0	227.9 $\pm$ 1.0	-0.1	100.0
6	239.3 $\pm$ 0.0	239.2 $\pm$ 1.0	+0.1	100.0
7	218.9 $\pm$ 2.3	220.2 $\pm$ 0.0	-1.3	100.6
8	212.5 $\pm$ 0.0	212.5 $\pm$ 1.0	0.0	100.0
9	253.3 $\pm$ 2.2	253.5 $\pm$ 0.0	-0.2	100.7
10	245.4 $\pm$ 2.5	247.0 $\pm$ 0.0	-1.6	100.6
11	230.3 $\pm$ 2.2	231.5 $\pm$ 1.0	-1.2	100.5
12	249.4 $\pm$ 2.2	250.5 $\pm$ 0.0	-1.1	100.4
^a Mean $\pm$ standard deviation	(SD) ($n = 3$).			
^b %Recovery =	$\frac{[\text{Fe}]_{\text{continuous acid leaching}}}{[\text{Fe}]_{\text{off-line acid digestion}}} \times 100$.			

Conclusions

A novel, simple, continuous ultrasound-assisted extraction system (CUES) incorporated with an on-line flow-injection manifold for the acid leaching of iron and its determination by FAAS in mussel samples is described for the first time in this paper. The main achievements with the proposed method were: reduction of sample contamination as well as analyte losses because less manipulation of the sample is required; reduction of the amount of sample and reagents; a reduced sample preparation time by factors of 6–27 compared to off-line ultrasonic assisted extraction methods; and avoidance of a centrifugation step to separate the liquid phase. These last two advantages significantly increase the sample throughput. This procedure combines the benefits of ultrasound-assisted extraction with those obtained for FI systems, and avoids the drawbacks of previous FI approaches for ultrasonic extraction that involved a complicated sample cell and the need for a debubbler.

Acknowledgements

The authors are grateful for the financial support provided by the Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Ministerio de Ciencia y Tecnología (Project no. CAL01-043). A.M.C.B. acknowledges a grant from the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, AP 2001-0367.

References

- 1 M. A. Z. Arruda, M. Gallego and M. Valcárcel, *Quim. Anal.*, 1995, **14**, 17.
- 2 M. A. Belarra, M. Resano and J. R. Castillo, *J. Anal. At. Spectrom.*, 1999, **14**, 547.

- 3 G. Nimmerfall and W. Schrön, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 2001, **370**, 760.
- 4 D. C. Baxter and W. Frech, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 1990, **337**, 253.
- 5 M. J. Cal-Prieto, M. Felipe-Sotelo, A. Carlosena, J. M. Andrade, P. López-Mahía, S. Muniategui and D. Prada, *Talanta*, 2002, **53**, 1.
- 6 M. F. Enriquez-Domínguez, M. C. Yebra-Biurrun and M. P. Bermejo-Barrera, *Analyst*, 1998, **123**, 105.
- 7 M. C. Yebra, M. F. Enriquez, A. García and A. Moreno-Cid, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 2001, **370**, 64.
- 8 E. C. Lima, F. Barbosa, F. J. Krug, M. Silva and M. G. R. Val, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2000, **15**, 995.
- 9 J. L. Burguera and M. Burguera, *Analyst*, 1998, **123**, 561.
- 10 J. L. Burguera and M. Burguera, *Anal. Chim. Acta*, 1998, **366**, 63.
- 11 E. R. Pereira, J. J. R. Rohwedder and M. A. Z. Arruda, *Analyst*, 1998, **123**, 1023.
- 12 E. C. Lima, F. Barbosa, F. J. Krug, M. Silva and M. G. R. Val, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2000, **15**, 995.
- 13 H. El Azouzi, M. L. Cervera and M. de la Guardia, *J. Anal. Spectrom.*, 1998, **13**, 533.
- 14 P. Bermejo-Barrera, A. Moreda-Piñeiro and A. Bermejo-Barrera, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2000, **15**, 121.
- 15 P. Bermejo-Barrera, O. Muñiz-Naveiro, A. Moreda-Piñeiro and A. Bermejo-Barrera, *Anal. Chim. Acta*, 2001, **439**, 211.
- 16 K. Ashley, R. N. Andrews, L. Cavazos and M. Demange, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2001, **16**, 1147.
- 17 D. Chen, F. Lázaro, M. D. Luque de Castro and M. Valcárcel, *Anal. Chim. Acta*, 1989, **226**, 221.
- 18 F. Lázaro, M. D. Luque de Castro and M. Valcárcel, *Anal. Chim. Acta*, 1991, **242**, 283.
- 19 S. N. Deming and S. L. Morgan, *Experimental Design: A Chemometric Approach*, Elsevier, Amsterdam, 1993.
- 20 J. C. Miller and J. N. Miller, *Statistics for Analytical Chemistry*, Ellis Horwood, Chichester, 1984.

Artículo III

**ON-LINE DETERMINATION OF MANGANESE IN SOLID
SAMPLES BY FLAME ATOMIC ABSORPTION
SPECTROMETRY**

M.C. Yebra & A. Moreno-Cid

Anal. Chim. Acta (2003), **477**, 149-155



III

On-line determination of manganese in solid seafood samples by flame atomic absorption spectrometry

M.C. Yebra*, A. Moreno-Cid

Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Bromatology, Faculty of Chemistry, University of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela 15782, Spain

Received 4 July 2002; received in revised form 14 October 2002; accepted 24 October 2002

A

Manganese is extracted on-line from solid seafood samples by a simple continuous ultrasound-assisted extraction system (CUES). This system is connected to an on-line manifold, which permits the flow-injection flame atomic absorption spectrometric determination of manganese. Optimisation of the continuous leaching procedure is performed by an experimental design. The proposed method allows the determination of manganese with a relative standard deviation of 0.9% for a sample containing $23.4 \mu\text{g g}^{-1}$ manganese (dry mass). The detection limit is $0.4 \mu\text{g g}^{-1}$ (dry mass) for 30 mg of sample and the sample throughput is ca. 60 samples per hour. Accurate results are obtained by measuring TORT-1 certified reference material. The procedure is finally applied to mussel, tuna, sardine and clams samples.

© 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Continuous ultrasound-assisted extraction system; Flame atomic absorption spectrometry; Manganese determination; Seafood

Manganese is in its inorganic species an ubiquitous, essential element in nature and it is occurring in concentrations hardly toxic. Environmental damage caused by this metal is not known so far [1]. Manganese is found at very high concentrations in waters, sediments and biota in areas where mining, crushing and ore activities are carrying out. To study their polluting effects and to be able to determine its concentration in seafood samples, it is necessary to have a method with robust and reliable control.

It is well known that preparation of a solid sample is the most time consuming step of the analytical

process and involves some potential drawbacks, such as contamination or losses of some elements during sample pre-treatment. As most of the analytical instruments require a liquid sample, metal detection is accomplished performing a previous sample treatment step. In this context, on-line microwave-assisted digestion methodology presents some advantages over their manual counterparts, such as smaller digestion times, easy digestion of complex matrices, and the process accomplishment in a closed vessel (decreasing the losses of volatile analytes and increasing personal safety) [2]. Different studies have been carried out using this methodology to determine metal ions in solid samples: Cu, Zn, Mn and Pb in soils and sediments, Fe in oyster, mussel and fish and Ca, Mg, Fe, Cd and Zn in cocoa powder [3–5]. Nevertheless, microwave-assisted extraction presents some disadvantages because the sample matrix is transported

* Corresponding author. Tel.: +34-9-815631004267;

fax: +34-9-81595012.

E-mail address: qncayebi@usc.es (M.C. Yebra).

towards the detector, causing interferences. Besides, it is necessary add a cooling area in the flow system, due to the high temperature reached in the microwave oven. Ultrasound-assisted extraction is another way for solid sample treatment. This technique presents some important advantages, such as its wide application field (any sample independently of their form or size), the use of diluted acids and the quantitative extraction of the analyte. Nevertheless, off-line ultrasound-assisted is a laborious and time-consuming procedure (30–60 min) that also requires a centrifugation step [6–10]. Our investigation team proposed successfully for first time an on-line ultrasound-assisted extraction system (CUES) coupled to a flow-injection flame atomic absorption spectrometry (FI-FAAS) manifold for copper determination in mussel samples [11].

In this paper, is described a simple and fast method using the CUES coupled to a FI manifold for the acid leaching of Mn and its determination by FAAS in seafood samples. Due to a great number of variables that can affect the extraction of manganese from seafood samples, a Plackett Burman design is used to evaluate the most important variables affecting the process. This method combines the benefits of ultrasound-assisted extraction with those obtained with FI systems.

2.1. Instrumentation

The continuous ultrasound-assisted extraction system (CUES) comprises an ultrasonic bath (Selecta), a glass minicolumn (50 mm $\times$ 3 mm i.d., bed volume 350 μ l) (Omnifit), and a Gilson Minipuls-3 peristaltic pump fitted with viton tubes (43.5 cm $\times$ 1.422 mm i.d.). The FI manifold for determination of Mn comprises a Gilson Minipuls-3 peristaltic pump fitted with PVC tubes (43.5 cm $\times$ 1.422 mm i.d.) and three Reodyne (models 5041 and 5301) injection or switching valves. A Perkin-Elmer 5000 atomic absorption spectrometer equipped with a manganese hollow-cathode lamp was used. The instrument was set at 279.5 nm. The aspiration flow-rate of the nebuliser was adjusted to be the same as the flow-rate of the carrier (3.5 ml min⁻¹). The spectrometer output is connected to a Perkin-Elmer 50 servograph recorder with a range of 5 mV.

Numerical analysis of experimental design was performed by means of the STATGRAPHIC V.4.1 statistical package (Manugistic Inc., Rockville, MD, USA).

2.2. Reagents

Hydrochloric acid, nitric acid, and manganese standard were of reagent grade (Merck). The certified reference material used was (TORT-1, lobster hepatopancreas marine, National Research Council of Canada). Ultrapure water of 18.3 M Ω cm resistivity obtained from a Milli-Q water purification system (Millipore) was used for the preparation of samples, reagents and standards. All the glassware used was cleaned in 4 M HNO₃ for 4 days and rinsed with ultrapure water before use.

2.3. Sample preparation

Fresh mussel and clam samples were collected from the Galician coast (northwest, Spain). These samples were triturated, homogenised, and freeze-dried, and then kept in clean, dry containers. Tuna and sardine samples were purchased in local markets. These samples were cleaned with ultrapure water and dried to constant mass in an oven at 60 $\pm$ 5 °C. After sieving, fractions with particle size under 100 μ m were taken.

2.4. Procedure for manganese determination in seafood samples

The continuous manganese determination system is shown in Fig. 1. Seafood samples, 30 mg, are directly weighted into a glass minicolumn, and in order to avoid sample losses over the CUES circuit, its ends are plugged with filter paper (Whatman 541). Then, the minicolumn is connected to the CUES.

First, the CUES circuit (1 ml) is on-line loaded with the acid leaching solution (1.5 M nitric acid) (Fig. 1A). Once closed the CUES circuit, the leaching solution is circulated at 3.5 ml min⁻¹ through the minicolumn during 0.5 min under ultrasonic treatment, changing the direction of the flow each 10 s in order to avoid the sample accumulation in the minicolumn ends (Fig. 1B). After, the SV is switched to its other position and the acid extract circulates towards the mixing coil in order to be homogenised, and a volume of 250 μ l of this acid extract is injected by means of IV

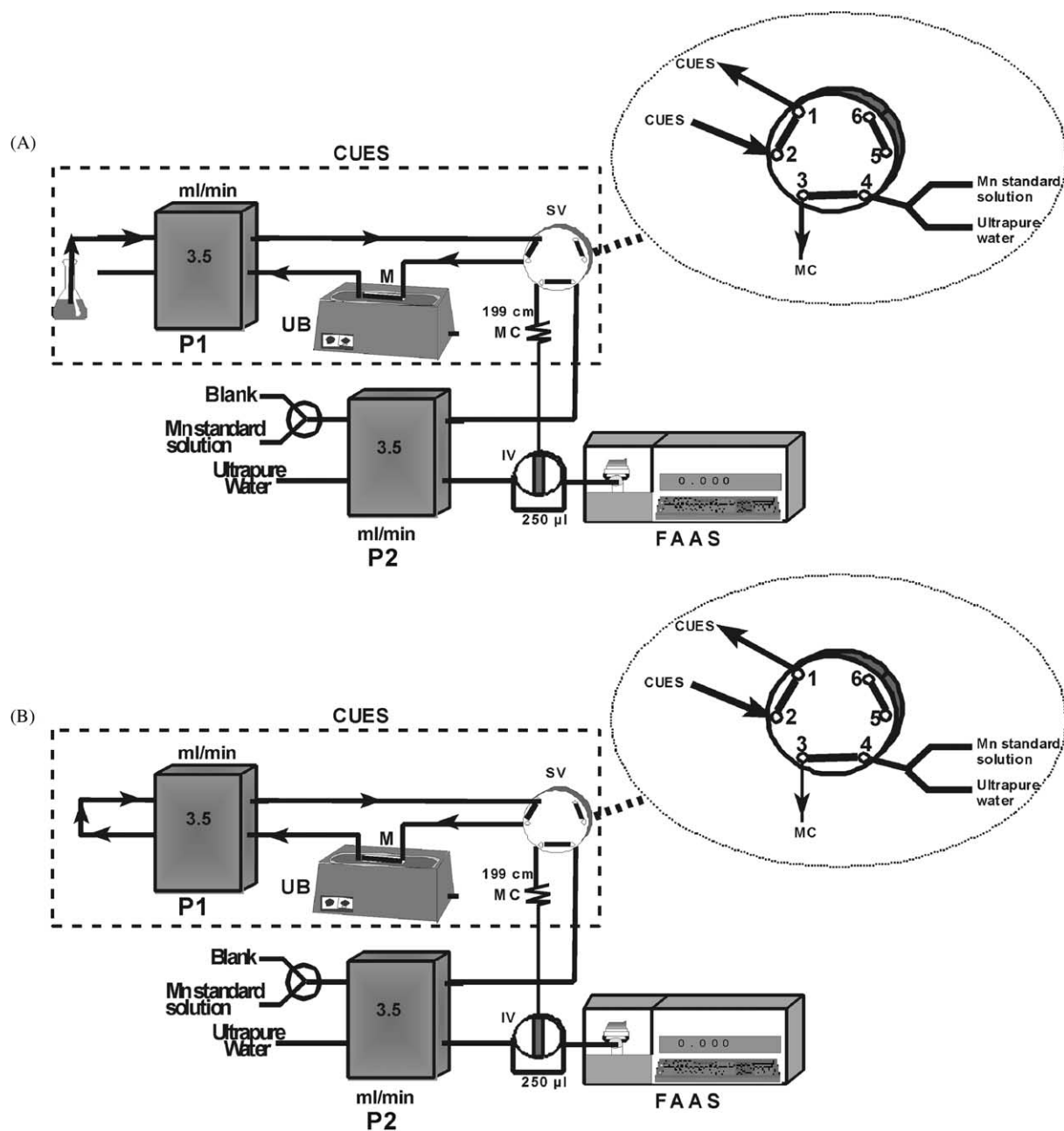


Fig. 1. Schematic diagram of the CUES and optimum working conditions for the on-line Mn determination. (A) On-line acid leaching solution loading. (B) On-line acid leaching step. (C) Continuous detection of Mn. P1 and P2, peristaltic pumps; UB, ultrasonic bath; M, minicolumn; IV, injection valve; SV, selecting valve; MC, mixing coil; W, waste; FAAS, flame atomic absorption spectrometer.

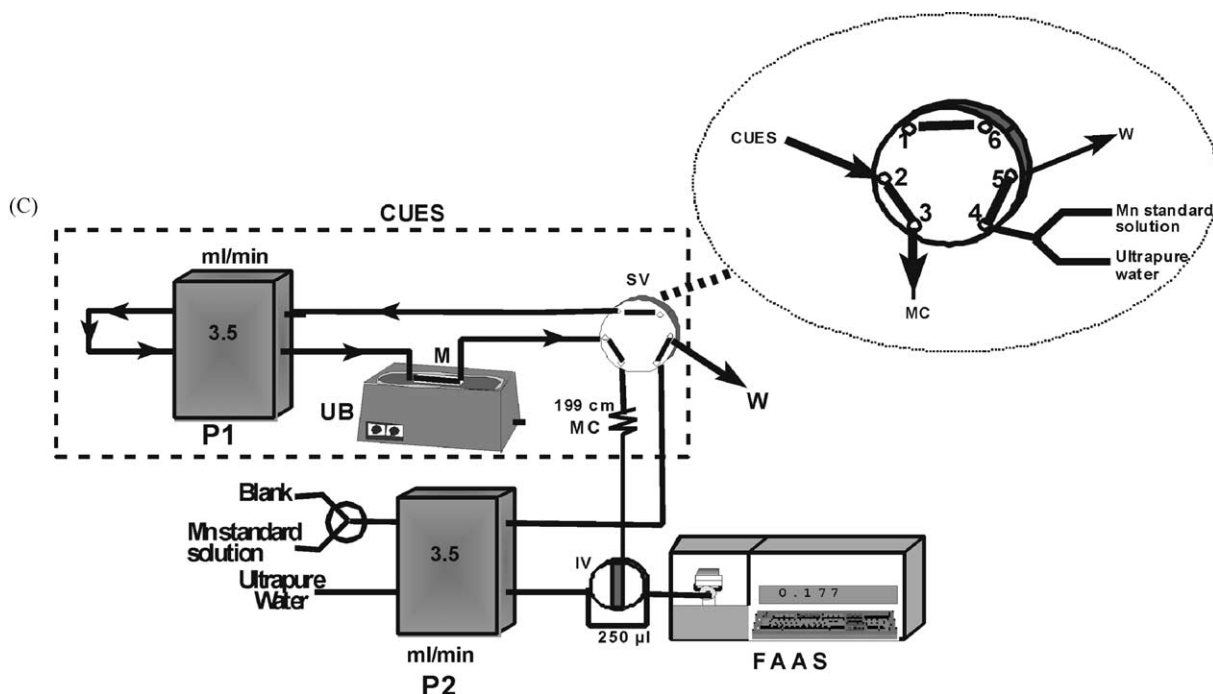


Fig. 1. (Continued).

into an ultrapure water carrier stream that transport it to the detector (Fig. 1C). While sample measurement is accomplished, the CUES circuit is washed with ultrapure water in order to avoid carry-over. Standard solutions containing between 0 and $2 \mu\text{g ml}^{-1}$ manganese ($250 \mu\text{l}$), in the same acid medium as leaching solution, are injected into an ultrapure water carrier stream by means of IV. Blank determinations are performed by using the acid leaching solution. In all instances, the absorbance is 0.000.

Six variables that could potentially affect the manganese extraction by the continuous acid ultrasound-extraction procedure (HNO_3 and HCl concentrations (leaching solution), sonication time, leaching temperature, flow-rate of the CUES and leaching volume) were studied. For this, a Plackett Burman $2^6 \times (3/16)$ factorial type III resolution design with one centerpoint was selected, allowing five degrees of freedom (number of runs-number of factors-number

of centerpoints-1) which involved 13 non-randomised runs. In order to test statistical significance of the effects, an ANOVA is employed by Statgraphic V. 4.1. This factorial design was applied to a certified reference material (30 mg, TORT-1) with a manganese content of $23.4 \pm 1.0 \mu\text{g g}^{-1}$. To optimise the CUES, manganese was measured on-line in the acid extract by FAAS with a flow system similar to that depicted in Fig. 1. The variable response (% Mn recovery) was calculated according to the following equation:

$$\text{recovery}(\%) = \frac{[\text{Mn}] \text{ continuous acid leaching}}{[\text{Mn}] \text{ off-line acid digestion}} \times 100$$

In Table 1, the experimental field definition for the Plackett Burman design is presented. Table 2 summarizes the design matrix and the extraction yield obtained in each one of the experiments (the results are expressed as percentage recovery). The numerical analysis of the results given in the recovery column of Table 2 produced the standardized main effects Pareto Chart (Fig. 2) [12]. Variables, such as sonication time and leaching volume (affected by a positive sign) and leaching temperature and flow-rate of the

Table 1
Factor levels in Plackett Burman factorial design and their optimum values

Factor	Key	Low	High	Optimum
HNO ₃ concentration (M)	A	0	3	1.5
HCl concentration (M)	B	0	3	0
Sonication time (min)	C	0.5	5	0.5
Leaching temperature (°C)	D	20	70	20
Flow-rate of the CUES (ml min ⁻¹)	E	3.5	6	3.5
Leaching volume (ml)	F	1.0	2	1.0

Table 2
Design matrix and response values in Plackett Burman factorial design

Experimental runs	Factors						Recovery (%)
	A	B	C	D	E	F	
1	+	−	+	−	−	−	96
2	+	+	−	+	−	−	101
3	−	+	+	−	+	−	96
4	+	−	+	+	−	+	105
5	+	+	−	+	+	−	101
6	+	+	+	−	+	+	105
7	0	0	0	0	0	0	100
8	−	+	+	+	−	+	101
9	−	−	+	+	+	−	16
10	−	−	−	+	+	+	0
11	+	−	−	−	+	+	101
12	−	+	−	−	−	+	101
13	−	−	−	−	−	−	0

CUES (affected by a negative sign) resulted no significant at a 95% confidence level for the continuous acid ultrasound-assisted extraction of manganese. While, variables, such as HNO₃ and HCl concentra-

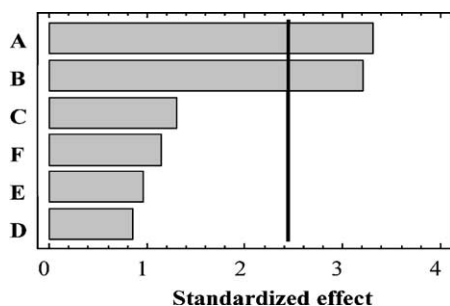


Fig. 2. Pareto charts of main effects for Plackett Burman factorial design, obtained by using manganese recoveries. The vertical lines indicate the statistical significance bound for the effects.

Table 3
Study the acid concentration of the leaching solution

HNO ₃ (M)	HCl (M)	^a Mn (μg g ⁻¹)	Recovery (%)
0.75	0	15.5	66.4
1.5	0	23.6	100.9
3	0	23.6	100.9
1.5	1.5	23.1	98.6

^a Certified reference material, TORT-1 with a Mn content of $23.4 \pm 1.0 \mu\text{g g}^{-1}$.

tions (leaching solution) are affected by a positive sign and resulted significant at a 95% confidence level. Therefore, the manganese extraction efficiency is directly proportional to these both variables and the best responses (Mn recovery %) is obtained at the highest levels tested of these variables. According to the results, a new experimental design shifted in the direction of higher values of HNO₃ and HCl concentrations would be desirable. After carrying out different experiments outside the framework of the design (Table 3), a leaching solution of HNO₃ 1.5 was enough to extract the Mn quantitatively.

The values of the following variables: leaching temperature (20 °C) and flow-rate of the CUES (3.5 ml min⁻¹) were chosen according to the conclusions extracted from the design (both are affected by a negative sign, and lower values tested were chosen). In order to improve the sensitivity of the method a leaching volume of 1 ml was chosen. Though this is affected by a positive sign, as can be seen in Table 2 (runs 1, 2, 3 and 5), this value is enough for quantitative manganese recovery.

In order to improve the analytical characteristics of the method, other experiments outside the framework of the design were carried out. The estimated effect of sonication time is positive, but is not significant at a 95% level. So, in order to increase the sampling frequency, lower sonication times were studied. In these experiments was determined that 0.5 min are enough to extract the Mn quantitatively. The Table 1 shows the optimum factor values affecting the CUES for manganese extraction in mussel samples.

In the Plackett Burman design were only considered the variables that affect to the CUES. The mixing coil length, to homogenise the acid extract, was fixed to 199 cm (equivalent to 1.0 ml, the same volume of acid extract). The variables tested for this

Table 4
Influence of size particle on manganese extraction

Size particle (μm)	Recovery (%)
<30	99.9
30–100	96.6

flow system (Fig. 1) were the carrier flow-rate (ultra-pure water) and the injected volume of acid extract. The carrier flow-rate was studied between 3 and 6 ml min^{-1} and the injected volume of acid extract between 100 and $400 \mu\text{l}$. Although the greater aspiration flow-rate provides better sensitivity, at the same time a greater dispersion takes place because the carrier flow-rate is increasing. Therefore, a carrier flow-rate of 3.5 ml min^{-1} (dispersion equal to 1.1) was chosen as a compromise to obtain the minimum dispersion. With respect to the injected volume it was verified that, as it is logical, when the volume was increased the sensitivity was increased. Therefore, a volume of $250 \mu\text{l}$ was chosen. In addition, this volume allows two injections of each acid extract and verify its homogeneity. Sample particle was studied by using the optimum conditions of the CUES. Particle sizes smaller than $30 \mu\text{m}$ and between 30 and $100 \mu\text{m}$ were tested. The results obtained indicated that this variable does not affect the extraction process (Table 4). This can be explained through the high energy supplied by the ultrasound energy (frequency of 40 KHz), which increases the contact between the sample and the leaching solution.

3.1. Analytical figures of merit

Characteristic data for the performance of the method are summarized in Table 5.

The validation of the method was performed using a certified reference material, TORT-1 (lobster hepatopancreas) with a Mn content of $23.4 \pm 1.0 \mu\text{g g}^{-1}$. The Mn content obtained (mean $\pm$ S.D., $n = 3$) was $23.4 \pm 0.3 \mu\text{g g}^{-1}$, which agrees with the certified value.

3.2. Analysis of seafood samples

The method was applied to determine Mn in various seafood samples. The concentration of Mn ranged

Table 5
Analytical performance of the method

Calibration graph ($n = 8$)	$A = 2.0 \times 10^{-4} + 0.062 C$ (A, absorbance; C, $\mu\text{g ml}^{-1}$)
Correlation coefficient	0.999
Working range ($\mu\text{g g}^{-1}$)	1.7–73.2
Blank standard deviation	3.4×10^{-4}
Detection limit ($\mu\text{g g}^{-1}$)	0.4
(3S) 30 mg of sample (dry mass)	
Quantification limit ($\mu\text{g g}^{-1}$) (10S) 30 mg of sample (dry mass)	1.7
Precision of the whole experimental procedure (R.S.D., $n = 11$), % Mn concentration in the sample $23.4 \mu\text{g g}^{-1}$ (dry mass)	0.9
Sample throughput of the whole experimental procedure, samples h^{-1}	60

between 2.4 and $15.9 \mu\text{g g}^{-1}$ (dry mass). Results obtained for manganese with the proposed method were compared with those achieved by a conventional off-line sample digestion with concentrated

Table 6
Determination of manganese in seafood samples and Paired *t*-test

Sample	Mn ($\mu\text{g g}^{-1}$, dry mass)		Difference	Recovery (%) ^a
	Off-line acid digestion and FAAS determination ^b	Present method ^b		
Mussel	5.8 ± 0.5	5.6 ± 0.3	+0.2	96.6
Mussel	4.8 ± 0.5	4.9 ± 0.3	−0.1	102.1
Mussel	2.7 ± 0.3	2.8 ± 0.3	−0.1	103.7
Mussel	5.8 ± 0.5	5.6 ± 0.3	+0.2	96.6
Mussel	2.7 ± 0.3	2.6 ± 0.0	+0.1	96.3
Mussel	2.4 ± 0.5	2.4 ± 0.3	0.0	100.0
Mussel	3.0 ± 0.3	2.9 ± 0.3	+0.1	96.7
Mussel	15.8 ± 0.3	15.9 ± 0.3	−0.1	100.7
Clam	4.8 ± 0.5	4.9 ± 0.3	−0.1	102.1
Clam	5.0 ± 0.3	4.9 ± 0.3	+0.1	98.0
Tune	5.8 ± 0.5	5.8 ± 0.0	0.0	100.0
Sardine	4.8 ± 0.5	4.7 ± 0.0	+0.1	97.9

X (mean difference): 3.33×10^{-2} ; S.D.: 0.11; n : 12; $t = X\sqrt{n}/\text{S.D.} = 1.00$; critical value of t ($P = 0.05$): 2.20.

^a Recovery(%) = ([Mn] continuous acid leaching/[Mn] off-line acid digestion) $\times$ 100.

^b Mean $\pm$ standard deviation (S.D.) ($n = 3$).

nitric acid and subsequent manganese determination by FAAS. To compare the results obtained by both methods, the Paired *t*-test was applied [13] and the agreement between the two methods is satisfactory (Table 6).

A simple and rapid continuous ultrasound-assisted extraction system (CUES) incorporated to an on-line flow-injection manifold for the acid leaching of Mn and its determination by FAAS in solid seafood samples is described in this paper. This procedure has demonstrated to be a precise and accurate solid sample pre-treatment procedure for the acid leaching of Mn from seafood and its determination by FAAS. The main advantages achieved with the proposed method are reduction of sample contamination as well as analyte losses because less manipulation of the sample is required, reduction of sample and reagents consumption (compared with off-line methods the amount of sample required is 3–10 fold smaller [9,10] and lower leaching solution concentration and volume are needed [10]). Sonication time is reduced by factors of 60 and avoids the centrifugation step to separate the liquid phase, which compared to off-line ultrasonic-assisted extraction methods reduced significantly the sample preparation time [6–10]. These two last advantages increase significantly the sample throughput. This procedure combines the benefits of ultrasound-assisted extraction with those obtained for FI systems.

A

The authors are grateful for the financial support provided by the Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA). Ministerio de Ciencia y Tecnología (Project no. CAL01-043). A.M.C.B. acknowledges a grant from the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, AP 2001-0367.

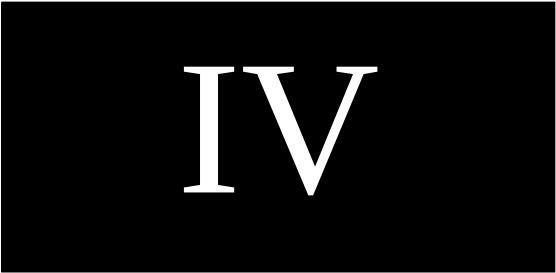
- [1] E. Merian, *Metals and their Compounds in the Environment*, VCH, Weinheim, 1991.
- [2] M. Burguera, J.L. Burguera, *Anal. Chim. Acta* 366 (1998) 63–80.
- [3] M. de la Guardia, V. Carbonell, A. Morales-Rubio, A. Salvador, *Talanta* 40 (1993) 1609–1617.
- [4] E.R. Pereira, J.R. Rohwedder, M.A.Z. Arruda, *Analyst* 123 (1998) 1023–1028.
- [5] T.J. Gluodenis, J.F. Tyson, *J. Anal. At. Spectrom.* 8 (1993) 697–704.
- [6] J.C. Mason, G. Coe, M. Edwards, P. Riby, *Analyst* 125 (2000) 1875–1883.
- [7] L. Amoedo, J.L. Capelo, I. Lavilla, C. Bendicho, *J. Anal. At. Spectrom.* 14 (1999) 1221–1226.
- [8] P. Bermejo-Barrera, A. Moreda-Piñeiro, O. Muñiz-Naveiro, A.M.J. Gomez-Fernandez, A. Bermejo-Barrera, *Spectrochim. Acta, Part B* 55 (2000) 1351–1371.
- [9] A.V. Filgueiras, I. Lavilla, C. Bendicho, *Fresenius J. Anal. Chem.* 369 (2001) 451–456.
- [10] P. Bermejo-Barrera, O. Muñiz-Naveiro, A. Moreda-Piñeiro, A. Bermejo-Barrera, *Anal. Chim. Acta* 439 (2001) 211–227.
- [11] A. Moreno-Cid, M.C. Yebra, *Spectrochim. Acta, Part B* 57 (2002) 967–974.
- [12] STATGRAPHIC V.4.1 Statistical Package, Manugistic Inc., Rockville, MD, USA, 1997.
- [13] J.C. Miller, J.N. Miller, *Statistics for Analytical Chemistry*, Ellis Horwood, Chichester, 1984.

Artículo IV

**FLOW INJECTION ON-LINE ULTRASOUND-ASSISTED
EXTRACTION OF IRON IN MEAT SAMPLES COUPLED TO A
FLAME ATOMIC ABSORPTION SPECTROMETRIC SYSTEM**

A. Moreno-Cid, M.C. Yebra, S. Cancela & R.M. Cespón,

Anal. Bioanal. Chem. (2003), **377**, 730-734



IV

A. Moreno-Cid · M. C. Yebra · S. Cancela · R. M. Cespón

Flow injection on-line ultrasound-assisted extraction of iron in meat samples coupled to a flame atomic absorption spectrometric system

Received: 25 April 2003 / Revised: 2 June 2003 / Accepted: 17 June 2003 / Published online: 25 July 2003

© Springer-Verlag 2003

Abstract Iron was extracted on-line from solid meat samples by a simple and rapid continuous ultrasound-assisted extraction system (CUES). The CUES is connected to a flow injection manifold, which allows the on-line flame atomic absorption spectrometric determination of iron. A Plackett–Burman design was used for the optimisation of the CUES. The method achieved a total sampling frequency of 11 samples per hour with a relative standard deviation for the complete procedure of 0.4%. The detection limit was $0.6 \mu\text{g g}^{-1}$ (dry mass) for a sample amount of 30 mg. Accurate results were obtained by measuring the certified reference materials BCR-186 (pig kidney) and BCR-184 (bovine muscle). The analytical procedure was applied to different real meat samples with satisfactory results.

Keywords Continuous ultrasound-assisted extraction system · Flame atomic absorption spectrometry · Iron determination · Meat samples

Introduction

Most solid sample pretreatments are still performed manually which makes them slow, complex, labour-intensive and difficult to control above all when many samples are involved. Moreover these procedures are the source of analytical errors and contamination problems [1]. Automation of the solid sample pretreatment in the analytical process is an arduous task due to complex sample matrices which require different pretreatments. In this sense, flow systems in general and flow injection (FI) methods in particular have proven to be a very useful tool for automating the solid sample pre-treatment. FI is an interest-

ing methodology characterised by a simple foundation, cheap device, simple and comfortable handling and high sample throughput, accuracy and precision [2, 3]. Batch solid sampling procedures follow two main guidelines: the use of energy sources to accelerate the sample dissolution (digestion) or leaching, or to obviate the sample pretreatment by direct measurement of the analytes in the solid. Direct determination of the analytes in the solid sample involves some advantages such as analysis of the undissolved sample (avoiding sample contamination) and increasing sensitivity [4]. However, this alternative has also some drawbacks such as the inability to achieve calibrations with solid standards, the presence of matrix interferences, non-homogeneity of the sample, poor precision of the results and the necessity of special atomisers [5, 6]. These drawbacks are solved by trace metal determination by slurry sampling where the sample is introduced into the atomisers as an aliquot of a stable suspension. The main problem with this methodology is the heterogeneity of the sample [7]. Pretreatment of a solid sample can be accomplished with energy supplies such as microwaves or ultrasound (acid or alkaline extraction) [8, 9, 10]. Manual sample pretreatments using these energies require drastic conditions or long times and involve potential interferences from the sample matrix in the determination step. On-line microwave sample treatment that includes a microwave oven in the FI manifold offers many advantages over their manual counterparts, since they enable completely automated operations, extensively reduce time delay between sample delivery and analysis, facilitate digestion of complex matrices, increase the personal safety and decrease the losses of volatile analytes [11, 12]. These advantages are accompanied by some drawbacks such as matrix interferences (because the sample matrix is introduced into the detector) and the need for a cooling area in the FI system (due to the high temperature achieved into the oven). Ultrasound-assisted extraction can also be coupled to a FI manifold. Ultrasound energy has a wide application field, and independent of the nature of the sample, it can achieve quantitative extractions using diluted acids. Nevertheless, these off-line procedures are work-intensive, time-con-

A. Moreno-Cid · M. C. Yebra (✉) · S. Cancela · R. M. Cespón
Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Bromatology,
Faculty of Chemistry, University of Santiago de Compostela,
15782 Santiago de Compostela, Spain
e-mail: qncayebi@usc.es

suming and require a centrifugation step to separate the liquid phase [13, 14, 15]. These drawbacks were avoided when our investigation team proposed a continuous ultrasound-assisted extraction system (CUES) incorporated into an on-line flow injection manifold for trace metals determination in seafood samples [16, 17, 18, 19]. CUES combines the benefits of ultrasound-assisted extraction and the FI systems. In this paper CUES was incorporated into an on-line flow injection manifold for iron determination in meat samples by flame atomic absorption spectrometry.

Experimental

Instrumentation

A Perkin–Elmer 5000 atomic absorption spectrometer furnished with an iron hollow cathode lamp and equipped with an air–acetylene flame was used. Background correction was performed by a deuterium lamp. The instrument was set at 248.3 nm. The aspiration flow rate of the nebuliser was adjusted to be the same as the flow rate of the carrier (3.5 mL min^{-1}). The spectrometer output was connected to a Perkin–Elmer 50 servograph recorder with a range of 5 mV. The signals measured were the heights of the absorbance peaks. As can be seen in Fig. 1, the continuous ultrasound-assisted extraction system (CUES) comprised a Rheodyne low-pressure switching valve (Model 5041, four-way valve), a Gilson Minipuls-3 peristaltic pump fitted with viton tubes, an ultrasonic bath (Selecta) and a glass minicolumn (50 mm×3-mm i.d., bed volume $350 \mu\text{L}$) (Omnifit). The ends of the minicolumn were plugged with filter paper (Whatman 541). The FI manifold for Fe determination comprised a Gilson Minipuls-3 peristaltic pump fitted with PVC tubes and three Reodyne (Models 5041 and 5301) low-pressure injection or switching valves. PTFE tubes (0.8-mm i.d.) were employed. Numerical analysis of experimental designs was performed by means of the Statgraphic V.4.1 statistical package [20].

Reagents

Ultrapure water of $18.3 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ resistivity obtained from a Milli-Q water purification system (Millipore) was used for the preparation of reagents and standards. The glassware used was cleaned in 4 M HNO_3 for 4 days and rinsed with ultrapure water before use. Hydrochloric acid, nitric acid and iron standard ($1,000 \text{ mg L}^{-1}$) were

of reagent grade (Merck). Two types of certified reference materials from the Community Bureau of Reference (BCR, Brussels, Belgium): BCR-186 (pig kidney) and BCR-184 (bovine muscle) with an iron certified concentration of $299 \pm 10 \mu\text{g g}^{-1}$ and $79 \pm 2 \mu\text{g g}^{-1}$, respectively.

Sample preparation

Meat samples were purchased in local markets, and 100 g was homogenized with a grinder and a blender and oven dried at $60 \pm 5^\circ \text{C}$ for 24 h. After sieving, fractions with particle size under $100 \mu\text{m}$ were taken.

Procedure for iron determination in meat samples

The continuous iron determination system is shown in Fig. 1. Meat samples (about 30 mg) are directly weighed into a glass minicolumn, and in order to avoid sample losses over the CUES circuit the ends are plugged with filter paper (Whatman 541). Then, the minicolumn is connected to the CUES. In first place, the CUES circuit (1 mL) is on-line loaded with the acid leaching solution (3 M HNO_3 –3 M HCl). Then, the SV1 is switched to its other position closing the CUES circuit. The leaching solution is circulated at 3.5 mL min^{-1} through the minicolumn for 5 min under ultrasonic treatment, changing the direction of the flow each 20 s in order to avoid the sample accumulation in the minicolumn ends. After, the SV2 is switched to its other position and the acid extract circulates towards the mixing coil in order to be homogenized, and a volume of $250 \mu\text{L}$ of this acid extract is injected by means of an injection valve (IV) into an ultrapure water carrier stream that transports it to the detector. While sample measurement is accomplished the CUES circuit is washed with ultrapure water in order to avoid carry-over. Standard solutions containing between 0 and $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ of iron, in the same acid medium as leaching solution, are injected into an ultrapure water carrier stream by mean of an IV.

Results and discussion

The optimisation of the CUES was realised by using a Plackett–Burman design ($2^6 \times 3/16$ factorial type, III resolution, with a centre point). This design was chosen because the CUES system was affected by a large number of variables (HNO_3 and HCl concentrations (leaching solution), sonication time, leaching temperature, flow rate of the CUES and leaching volume) and other designs would require a lot of experiments to achieve optimisation. Plackett–Burman design allows us to know how each variable affects the CUES within a relatively low number of experiments (13 experiments in such a case), so that we can tune towards the optimum value. In order to test statistical significance of the effects, an ANOVA is employed by using

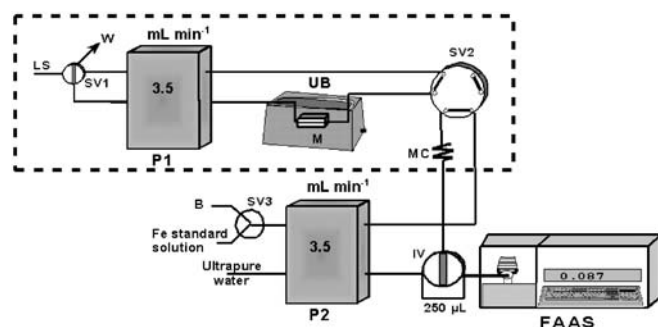


Fig. 1 Schematic diagram of the CUES and optimum working conditions for the on-line Fe determination. LS leaching solution, P1 and P2 peristaltic pumps, UB ultrasonic bath, M minicolumn, IV injection valve, SV1, SV2 and SV3 switching valves, MC mixing coil, W waste, B blank and FAAS flame atomic absorption spectrometer

Table 1 Factor levels in Plackett–Burman factorial design and their optimum values

Factor	Key	Low	High	Optimum
[HNO_3] (M)	A	0	3	3
[HCl] (M)	B	0	3	3
Sonication time (min)	C	0.5	5	5
Temperature ($^\circ \text{C}$)	D	20	70	20
CUES flow rate (mL min^{-1})	E	3.5	6.0	3.5
Leaching volume (mL)	F	1.0	3.0	1

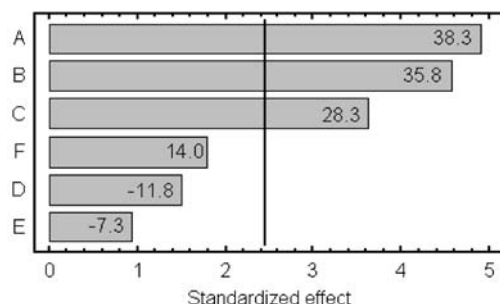


Fig. 2 Standardised Pareto chart for the Plackett–Burman design ($2^6 \times 3/16$) for the continuous ultrasonic acid extraction of iron from meat samples. The vertical lines indicate the statistical significance ($P=95\%$) bound for the effects and the numbers are their estimated effects

Statgraphic V4.1. For this optimisation low and high variable values were established based on previous studies and bibliographical data (Table 1). This factorial design was applied to a certified reference material (30 mg, BCR-186, pig kidney) with an iron content of $299 \pm 10 \mu\text{g g}^{-1}$. To optimise the CUES, iron was measured on-line in the acid extract by FI-FAAS and the variable response was a percentage extraction efficiency. The numerical analysis of the results produced the standardised Pareto chart (Fig. 2). Starting from this graph and the estimated effect values we concluded that there are three statistically significant factors with high and positive estimated effects: HNO_3 and HCl concentrations (leaching solution) and sonication time. So, when these factors achieve their high value establish in the design, the best results were obtained (% Fe extraction efficiency). This can be seen in the response surfaces (Fig. 3). The effect of increasing the high values of acid concentrations (leaching solution) was not studied because a higher concentration can produce serious damage to the spectrometer nebuliser, besides these acid concentrations (3 M) are enough to quantitatively extract the iron. A 5-min sonication time was enough to attain close contact between the sample and leaching solution and to achieve a high sampling frequency. The possibility of diminishing the time was not studied because starting from the extraction efficiency results obtained in the design it is observed that a smaller time is not enough to extract the whole iron quantitatively (Fig. 3). Leaching temperature and flow rate of the CUES were not statistically significant factors and the estimated effect was affected by a negative sign, so these factors were established in the low values of the factorial design (room temperature (20°C) and 3.5 mL min^{-1}). In such a case the leaching volume, although it was not a significant factor and the estimated effect was affected by a positive sign, was tuned outside the framework of the design in order to increase the sensitivity of the method. So the optimum value given by the design was compared with the lowest value established for the leaching volume (1 mL); under these circumstances a quantitative extraction efficiency was obtained (99.6%). Given these findings, we decided to work with the operational conditions of the CUES given in Table 1 under the optimum values heading.

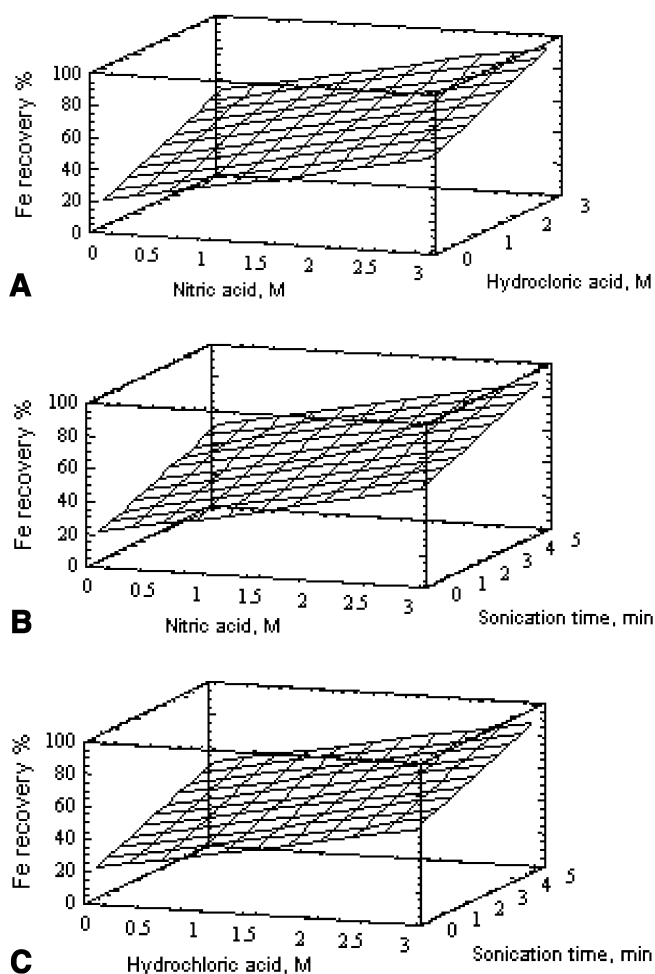


Fig. 3A–C Response surfaces estimated for the design obtained by plotting (A) HNO_3 and HCl concentrations; (B) HNO_3 concentration and sonication time; (C) HCl concentration and sonication time

Two additional variables can affect the acid extraction process: meat particle size and sample amount. These variables were studied by using the optimum conditions of the CUES. In order to study meat particle size, particle sizes smaller than $30 \mu\text{m}$ and between $30\text{--}100 \mu\text{m}$ were tested. The results obtained indicated that this variable does not affect the extraction process which can be explained as result of the high energy supplied by the ultrasound energy (frequency of 40 kHz) that increases the contact between the sample and the leaching solution. In the case of sample amount it was observed that amounts greater than 30 mg generated pressures inside the CUES that prevented the iron extraction from meat samples. Since 30 mg was the optimum amount to obtain good results with the CUES system, smaller quantities were analysed and the results were also suitable. Other flow parameters involving iron determination were also optimised. The mixing coil length was fixed to 200 cm (equivalent to 1 mL), because a smaller length would not achieve the total homogenisation of the extract and a greater length increases the analysis time, diminishing at the same time the sampling frequency. The

Table 2 Determination of iron in meat samples and Paired *t*-Test

$X(\text{mean difference})=0.23$,
 $SD=0.49$, $n=7$, $t=2.45$
 Critical value of $t=1.36$
^aExtraction efficiency
 (%)= $[(\text{Fe})_{\text{continuous acid leaching}}]/[(\text{Fe})_{\text{off-line acid digestion}}]\times 100$
^bMean $\pm$ standard deviation
 (SD) ($n=3$, referred to 3 independent extractions)

Sample	Fe ($\mu\text{g g}^{-1}$, dry mass)		Difference	% Extraction efficiency ^a
	Off-line acid digestion and FAAS determination ^b	Present method ^b		
Lamb kidneys	129.4 $\pm$ 1.0	129.0 $\pm$ 0.6	+0.4	99.7
Rabbit liver	278.8 $\pm$ 3.0	277.8 $\pm$ 1.9	+1.0	99.6
Chicken muscle	59.6 $\pm$ 1.0	60.0 $\pm$ 0.6	-0.4	100.7
Veal muscle	106.1 $\pm$ 1.0	106.0 $\pm$ 0.6	-0.1	99.9
Pig muscle	59.6 $\pm$ 1.0	58.8 $\pm$ 0.6	+0.8	98.8
Lamb muscle	64.6 $\pm$ 1.0	64.8 $\pm$ 0.6	-0.2	100.3
Turkey muscle	65.6 $\pm$ 1.0	65.5 $\pm$ 0.6	+0.1	99.8

carrier flow rate and the injected sample volume were also studied. The carrier flow rate was studied between 3 and 6 mL min⁻¹. The aspiration flow rate of the nebuliser was adjusted to be the same as the flow rate of the carrier solution. Although a higher aspiration flow rate provided better sensitivity, simultaneously high dispersion took place because the carrier flow rate was increasing. In order to obtain the minimum dispersion in the flow system, the optimum carrier flow rate was 3.5 mL min⁻¹ (dispersion equal to 1.1). With respect to the injected volume, a volume of 250 μL was chosen, since it allowed two acid-extract injections of each sample to verify its homogeneity.

Analytical figures of merit

The calibration graph of the method was run ($n=8$) under the optimal chemical and flow conditions for the global process. The equation was $\text{absorbance}=4.762\times 10^{-4}+0.0299X$ ($X=0-5 \mu\text{g mL}^{-1}$).

The validation of the method was performed using two certified reference materials: 10 mg of BCR-186 (pig kidney) and 30 mg of BCR-184 (bovine muscle) with a Fe certified concentration of 299 $\pm$ 10 $\mu\text{g g}^{-1}$ and 79 $\pm$ 2 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectively. The Fe content obtained (mean $\pm$ SD, $n=3$) was 300 $\pm$ 2 $\mu\text{g g}^{-1}$ and 79 $\pm$ 1 $\mu\text{g g}^{-1}$ for BCR-186 and BCR-184, respectively, which agrees with the certified values.

The precision of the continuous analytical method obtained for real samples was checked using a sample containing 129.4 $\pm$ 1.0 $\mu\text{g g}^{-1}$ (dry mass) of iron and the result expressed as relative standard deviation was 0.4% ($n=11$). The limit of detection (LOD) based on three times the standard deviation ($n=30$) of the blank was found to be 0.6 $\mu\text{g g}^{-1}$ (dry mass) for 30 mg of sample. The limit of quantitation (LOQ) based on ten times the standard deviation ($n=30$) of the blank was found to be 3.3 $\mu\text{g g}^{-1}$ (dry mass) for 30 mg of sample. The sample throughput, taking into account the global process, was 11 samples h⁻¹.

To evaluate the iron determination for possible sample matrix interferences, a standard addition method was performed. In this way, a sample (lamb kidney) was spiked with several iron standard solutions added as leaching solution (0–1.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Under these conditions, a standard calibration graph was run ($n=6$) under the optimal chemical and flow conditions for the global process; the equation

was $\text{absorbance}=0.117+0.0294[\text{Fe}]$ ($r=0.999$), where [Fe] is iron concentration, expressed as $\mu\text{g mL}^{-1}$. This equation and the calibration graph present similar slopes, demonstrating that Fe determination is free of matrix interferences.

Analysis of samples

The method was applied to the determination of iron in different meat samples. The results obtained by the proposed method were compared with those achieved by a conventional off-line sample digestion method using concentrated acid: an amount of 0.3 g of sample was mixed with nitric acid in a glass beaker and heated on a hot-plate until the sample was completely dissolved. Once cool, the solution was transferred into a 10-mL calibrated flask and made up to volume with ultrapure water with subsequent iron determination by FAAS. To compare the results obtained by both methods, the Paired *t*-Test [21] was applied and it concluded that both methods do not give significantly different values for the iron concentration and thus, the agreement between the two methods is satisfactory (Table 2).

Conclusions

The CUES has been demonstrated to be a simple, rapid, precise and accurate solid pretreatment procedure for iron leaching in meat samples. The reduction of sample amount (mg level) and reagents consumption are the main advantages achieved with the proposed method. Furthermore, the analytical process is easy to control systematically due to the little sample manipulation. Sample contamination and analyte losses are reduced, which are otherwise a great source of analytical error. Sonication time has also been reduced, and in the case of iron determination in meat samples this time was reduced by factors of 60 compared to off-line ultrasonic extraction systems; furthermore, the centrifugation step to separate the liquid phase is avoided. This procedure combines the benefits of ultrasound-assisted extraction with those obtained for FI systems.

Acknowledgements The authors are grateful to the financial support provided by the Instituto Nacional de Investigación y tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Ministerio de Ciencia y Tecnología (Project no. CAL01-043). A.M.C.B. acknowledges a grant from the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, Ap 2001-0367.

References

1. Arruda MAZ, Gallego M, Valcárcel M (1995) *Quim Anal* 14: 17-26
2. Valcárcel M, Luque de Castro MD (1990) *Fresenius J Anal Chem* 337:662-666
3. Zhi Z, Ríos A, Valcárcel M (1996) *Crit Rev Anal Chem* 26: 239-260
4. Miller-Ihli NJ (1993) *Fresenius J Anal Chem* 345:482-489
5. Baxter RDC, Frech W (1990) *Fresenius J Anal Chem* 337:253-263
6. Belarra MA, Resano M, Castillo JR (1999) *J Anal At Spectrom* 14:547-552
7. Miller-Ihli NJ (1992) *At Spectrosc* 13:1-6
8. Luque-García JL, Luque de Castro MD (2003) *Trends Anal Chem* 22:90-98
9. Yebra MC, Enríquez MF, García A, Moreno-Cid A (2001) *Fresenius J Anal Chem* 370:64-68
10. Lima EC, Barbosa F, Krug FJ, Silva M, Val MRG (2000) *J Anal At Spectrom* 15:995-1000
11. Burguera JL, Burguera M (1998) *Anal Chim Acta* 366:63-80
12. Pereira ER, Rohwedder JJR, Arruda MAZ (1998) *Analyst* 123:1023-1028
13. El Azouzi H, Cervera ML, de la Guardia M (1998) *J Anal At Spectrom* 13:533-538
14. Bermejo-Barrera P, Muñiz-Naveiro O, Moreda-Piñeiro A, Bermejo-Barrera A (2001) *Anal Chim Acta* 439:211-227
15. Ashley K, Andrews RN, Cavazos L, Demange M (2001) *J Anal At Spectrom* 16:1147-1153
16. Moreno-Cid A, Yebra MC (2002) *Spectrochim Acta Part B* 57:967-974
17. Yebra MC, Moreno-Cid A (2002) *J Anal At Spectrom* 17:1425-1428
18. Yebra MC, Moreno-Cid A (2003) *Anal Chim Acta* 477:149-155
19. Yebra MC, Moreno-Cid A, Cespón R M, Cancela S (2003) *At Spectrosc* 24:31-36
20. STATGRAPHIC V.4.1 (1997) Statistical Package, Manugistic Inc, Rockville, MD, USA
21. Miller JC, Miller JN (1984) *Statistics for analytical chemistry*. Ellis Horwood, Chichester

Artículo V

**FLOW INJECTION AAS DETERMINATION OF ZINC IN MILK
POWDER AND INFANT FORMULA USING CONTINUOUS
ULTRASOUND-ASSISTED DISSOLUTION FOR SOLUBLE
SOLID SAMPLE PREPARATION**

M.C. Yebra, A. Moreno-Cid, S. Cancela & R.M. Cespón,
At. Spectrosc. (2003), **24**, 218-221

A large, white, serif capital letter 'V' is centered within a solid black rectangular box.

Flow Injection AAS Determination of Zinc in Milk Powder and Infant Formula Using Continuous Ultrasound-Assisted Dissolution for Soluble Solid Sample Preparation

***M.C. Yebra, A. Moreno-Cid, S. Cancela, and R.M. Cespón**

Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Bromatology,

Faculty of Chemistry University of Santiago de Compostela, 15782-Santiago de Compostela, Spain

INTRODUCTION

When a solid sample is analyzed, pretreatment steps are still the most time-consuming stage of the whole analytical process. They are incompatible with the highly developed and automated instrumentation and data treatment used in the second and third stages of the analytical process. Since most analytical instruments such as atomic spectrometric detectors handle liquid samples, attention should be put to improve the solid sample pretreatment steps because they are time-consuming and prone to contamination or analyte loss. The characteristics of the sample matrix and the analytes to be determined dictate the selection of the pretreatment procedures. Ideally, these should fulfill the following requirements: rapid procedure comparable in time with the second and third stages of the analytical process, not result in sample contamination or analyte loss, increase worker safety and decrease exposure to chemical hazards, avoid environmental risks, dissolve the sample totally or extract quantitatively the analyte(s) of interest, require no expensive instrumentation, require a decreased amount of sample and reagents and also enable rapid analysis at low operational cost, facilitate continuous analytical processes and allow automation in order to integrate the overall analytical process management. In consideration of the

ABSTRACT

A flow injection system for the continuous ultrasound-assisted dissolution of solid soluble samples (CUDS) has been developed for the dissolution of milk powder and infant formula samples. This system is connected on-line to a flow injection flame atomic absorption spectrometer for continuous zinc monitoring. This methodology allows the analysis of samples without sample pretreatment, thus avoiding time-consuming traditional sample preparation methods. The proposed methodology was validated by the analysis of a certified reference material (BCR-063R Skim Milk Powder). The results agreed well with the certified values. The method is very sensitive (limit of detection = 0.3 µg/g) and precise (RSD = 0.4%) and was applied to real samples of milk powder and infant formula.

The advantages of this methodology are discussed with respect to improvement in sample throughput, analytical performance, and analytical figures of merit.

above requirements, the manual sample preparation methods do not meet the desired criteria listed above. Another traditional sample pretreatment method for powdered milk samples is dry ashing and wet or microwave digestion dissolution (1–7), but these procedures require laborious sample pretreatment, involve possible analyte loss and/or contamination, and use concentrated acids which can become a health risk to the analyst.

Since Burguera et al. (8) first introduced the use of a microwave oven in a flow injection system to digest solid samples, this sample pretreatment method has gained acceptance because it nearly fulfills all the desired requirements cited above. Nevertheless, there are some drawbacks such as the use of high acid concentrations, which produce matrix effects and damage the metallic parts of the nebulizer in atomic absorption spectrometers. Furthermore, the method produces nitrous vapors, which are highly carcinogenic and thus a health risk to the analyst, and the sample matrix causes interferences. An alternative approach to solid sample pretreatment is the employment of slurries, which are directly introduced into the atomic absorption spectrometer, thus avoiding complete sample digestion. This method allows calibration with standard solutions to which matrix modifiers may be added. The main problem of the slurry technique is heterogeneity of the samples (9). Continuous ultrasound-assisted methodologies are a valid alternative for solid sample pretreatment because they facilitate and accelerate some analytical steps such as leaching and dissolution, among others. Furthermore, this methodology combines the advantages of ultrasound-assisted extraction with flow injection systems (10–14).

In this paper we describe a novel and simple continuous ultrasound-assisted dissolution system (CUDS). It is connected to an on-line flow injection flame atomic absorption spectrometer (FI-FAAS) allowing

*Corresponding author.
e-mail: qncayebi@usc.es
Fax: 34981595012

the continuous ultrasound-assisted dissolution of a solid soluble sample and the direct measurement of zinc without any sample pretreatment. The method was applied to real samples (milk powder and infant formulas) for the determination of traces of zinc. The CUDS proposed in this paper is suitable for dissolving milk powder samples in order to obtain a homogeneous dispersion. The method can be easily extended to other analytes and is applicable to different soluble samples.

EXPERIMENTAL

Instrumentation

The manifold used for the sample dissolution and FI-FAAS continuous monitoring of zinc is shown in Figure 1. The CUDS is composed of a Minipuls™-3 peristaltic pump (Gilson, France) fitted with PTFE tubes, an ultrasonic bath (Selecta, Barcelona, Spain), a glass mini-column (50 mm x 3 mm i.d., bed volume 350 µL) (Omnifit, Cambridge, U.K.) used as the sample container (the ends of the mini-column were plugged with filter paper), and two Rheodyne® (Models 5041 and 5020) low pressure valves. The on-line monitoring of Zn was performed by a manifold that comprises a Gilson Minipuls-3 peristaltic pump fitted with PTFE tubes and two Rheodyne (Models 5020 and 5301) injection or switching valves. PTFE tubes (0.8 mm i.d.) were employed to connect the PerkinElmer® Model 5000 atomic absorption spectrometer (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Shelton, CT, USA), equipped with a zinc hollow cathode lamp. The instrument was set at 213.9 nm. The spectrometer output was connected to a PerkinElmer 50 servograph recorder with a range of 5 mV. Numerical analysis of the experimental designs was performed by means of the ANOVA Statgraphic

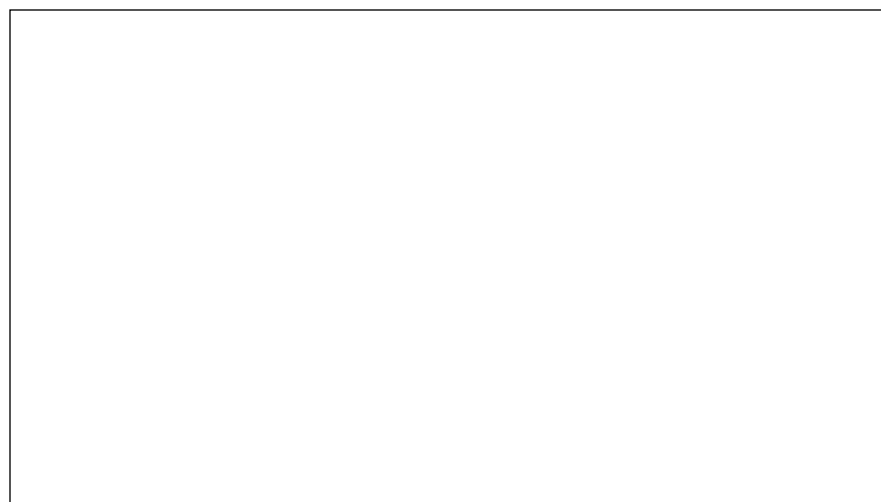


Fig. 1. Schematic of CUDS and FI-FAAS manifold. B=blank; DS=dissolving solution; FAAS= flame atomic-absorption spectrometer; IV= injection valve; M= mini column containing the sample; MC=mixing coil; P1 and P2=peristaltic pumps; SV1, SV2, and SV3=selection valves; UB=ultrasonic bath; = waste.

V. 4.1 statistical software (Manugistic, Inc., Rockville, MD, USA).

Reagents and Solutions

Zinc standard solution (1000 mg/L) was of analytical reagent grade (Merck, Darmstadt, Germany). Ultrapure water of 18.3 MΩ.cm resistivity was obtained from a Milli-Q™ water purification system (Millipore, Bedford, MA, USA). The glassware was cleaned in 4M HNO₃ for four days and rinsed with ultrapure water before use. The certified reference material was BCR-063R Skim Milk Powder [Community Bureau of Reference (BCR), Brussels, Belgium].

Procedure

Powdered milk and infant formula samples (10 mg) were weighed directly into the glass mini-column connected to the CUDS. First, the CUDS circuit (1 mL) was loaded with the dissolving solution (DS) (ultrapure water). Once filled, the SV1 valve was switched to its alternate position and a water stream was circulated at 6.0 mL/min through the mini-column for 0.5 min under ultrasonic treatment. The direction

of the flow was changed each 10 s in order to avoid sample accumulation at the end of the mini-column and to facilitate sample dissolution. Then, the SV2 valve was switched to its alternate position and the solubilized sample was homogenized on the mixing coil (MC). On-line analyte monitoring was performed by injecting a 250-µL solubilized sample into an ultrapure water carrier stream with subsequent continuous measurement of zinc by FAAS. Then, 250 µL of standard solution containing between 0 and 1 µg/mL zinc was injected into the ultrapure water carrier stream.

RESULTS AND DISCUSSION

In order to optimize the variables that affect to the CUDS (i.e., the nature of the dissolving solution, sonication time, dissolution temperature, flow rate, and dissolving solution volume), a factorial design (Plackett-Burman 2⁶*3/16 factorial type III resolution design with one centerpoint) was employed. The statistical significance of the effects was tested using the ANOVA Statgraphic V. 4.1 program. This factorial

design was applied to a certified reference material (CRM-063R Skim Milk Powder) with a zinc content of $49.0 \pm 0.6 \mu\text{g/g}$. The variable response was % recovery.

Table I shows the lower and upper levels for each studied variable. These values were chosen from available data and from previous experiments. The numerical analysis of the results produced the standardized main effects Pareto Chart. In this chart, the bar lengths are proportional to the absolute value of the estimated effects and help in comparing the relative importance of the effects. The conclusions extracted from the analytical data are that a continuous sample dissolution appeared to be affected by two statistically significant factors, sonication time and flow rate, and these factors overtake the limit of statistical significance. It was found that for the levels tested, these factors increase and the result is a better sample dissolution efficiency. Therefore, the sample dissolution efficiency is directly proportional to both variables and the best responses are obtained at the highest levels tested for these variables.

The results showed that higher sonication times and flow rates would be desirable with CUDS. However, it must be noted that the Zn recovery results were quantitative (better than 95%) when the sonication time was lowest (0.5 min) and the flow rate of the CUDS was highest (6 mL/min). The reasons are that a high flow rate increases the system dynamism and the contact between the dissolving solution and the sample equalizes with reduced sonication time. Since there were no statistically significant factors, their lowest values achieved quantitative recoveries (100%). This is an important fact because it simplifies CUDS: a temperature control is not necessary (room temperature is optimum), the dissolving solution can be ultra-

pure water and requires only 1 mL for complete sample dissolution, and the sensitivity of the FI-FAAS method is increased. Table I lists the optimum values chosen for CUDS.

For homogenization of the sample, the length of the mixing coil was fixed at 199 cm (equivalent to 1.0 mL, the same volume as the dissolving solution). The dissolved sample (1 mL) is not introduced directly into the detector in order to control the aspiration flow rate, achieve the maximum analytical signal, and to prove sample homogeneity. Therefore, the variables tested involving this FI system were the carrier flow rate (ultrapure water) and the injected volume of the sample. The carrier flow rate studied ranged from 3–6 mL/min and the injected volume of the dissolved sample ranged from 100–400 μL . The aspiration flow rate of the nebulizer was adjusted to be the same as the flow rate of the carrier solution. A carrier flow rate of 3.5 mL/min was chosen as a compromise to obtain minimum dispersion in the FI system. A volume of 250 μL was selected, which allows two injections of each sample and verifies its homogeneity.

Features of the Method

The calibration graph was run ($n=7$) under optimum chemical and flow conditions for the global process; absorbance = $5.24 \times 10^{-4} + 0.209 X$ (X : 0–1 $\mu\text{g/mL}$).

The precision of the continuous analytical method obtained for the real samples was checked on a sample (milk powder) containing 49.1 $\mu\text{g/g}$ Zn ($n=11$). The result expressed as relative standard deviation was 0.4 %. The limit of detection (LOD) based on three times the standard deviation ($n=30$) of the blank was 0.3 $\mu\text{g/g}$ for 10 mg of sample.

Validation of the method was performed using a certified reference material, BCR-063R Skim Milk Powder, natural) with a Zn content of $49.0 \pm 0.6 \mu\text{g/g}$. The Zn content obtained (mean $\pm$ SD, $n=3$) was $49.1 \pm 0.3 \mu\text{g/g}$, which agrees with the certified value. The sample throughput, taking into account the whole analytical process, was about 80 samples/h.

Determination of Zn in Real Samples

Milk powder samples (whole and skim) and infant formulas were purchased in local markets. The results of their analysis, expressed as $\mu\text{g/g}$ Zn, and their precision ($n=3$) are listed in Table II. In addition, the same samples were prepared by the AOAC (Association of Official Analytical Chemists) standard method based on acid digestion (15) and by sample dissolution using ultrapure water (according to the manufacturer's instructions). In both instances, zinc measurement was performed by off-line FAAS. The results obtained by these two

TABLE I
Factor Levels in Plackett Burman Factorial Design
and Their Optimum Values

Factor	Low	High	Optimum
HNO ₃ concentration (M)	0	3	0
HCl concentration (M)	0	3	0
Sonication time (min)	0.5	5	0.5
Dissolution temperature (°C)	20	70	20
Flow rate of CUDS (mL/min)	3.5	6	6
Dissolving solution (mL)	1	3	1

TABLE II
Determination of Zinc in Powdered Milk Samples
and Infant Formulas

Sample	Concentration of Zinc ^a (µg/g)		
	Official Method (A) ^b	Sample Dissolution (B) ^c	Present Method (C)
Milk powder 1	48.9 ± 0.9	48.3 ± 1.3	49.1 ± 0.3
Milk powder 2	42.8 ± 0.9	43.1 ± 1.3	43.1 ± 0.3
Infant formula 1	39.3 ± 0.9	39.0 ± 1.3	39.2 ± 0.3
Infant formula 2	39.3 ± 0.9	39.6 ± 1.3	39.6 ± 0.3
Infant formula 3	47.1 ± 0.9	46.6 ± 1.3	46.7 ± 0.3
Infant formula 4	70.9 ± 0.5	70.6 ± 0.9	70.5 ± 0.0
Infant formula 5	46.3 ± 0.9	46.8 ± 1.3	46.9 ± 0.3

^a Average of three individual determinations ± S.D.

^b Comparison between A and C: X (mean difference), 0.07; standard deviation (S.D.), 0.38 (n=7). $t = X \text{ pn} / \text{S.D.} = 0.50$; critical value of "t" (P=0.05), 2.45.

^c Comparison between B and C: X (mean difference), 0.07; standard deviation (S.D.), 0.38 (n=7). $t = X \text{ pn} / \text{S.D.} = 0.50$; critical value of "t" (P=0.05), 2.45.

pretreatment methods are listed in Table II. The results obtained by the CUDS-FI-FAAS methodology and those obtained by the alternative sample preparation methods were compared using the paired t-test. Table II shows that the calculated t-values are smaller than those obtained from the t-distribution table; thus, the null hypothesis is retained. Both methods do not result in significantly different values for zinc concentration and the agreement between the two methods is satisfactory in both instances.

CONCLUSION

A continuous ultrasound-assisted dissolution system (CUDS) incorporated into an on-line flow injection (FI) manifold is proposed for the automatic dissolution of milk powder and infant formula samples and the direct measurement of zinc by flame atomic absorption spectrometry (FAAS) without sample pretreatment. This on-line coupled assembly offers all of the inherent advantages of automatic methods such as low sample and reagent consumption, minimal manipulation, high throughput, and accurate and reproducible results.

Furthermore, tedious manual operations are avoided and the method proposed fulfills the requirements for an ideal sample pretreatment of soluble samples.

Received April 28, 2003.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful for the financial support provided by the Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Ministerio de Ciencia y Tecnología (Project no. CAL01-043). A. Moreno-Cid is also grateful to the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, for a FPU scholarship (AP 2001-0367).

REFERENCES

1. A.N. Araujo, J. Gracia, J.L.F.C Lima, M. Poch, M. Lúcia, and M.F.S. Saraiva, Fresenius' J. Anal. Chem. 357, 1153 (1987).
2. M. Burguera, J.L. Burguera, A.M. Garaboto, and O.M. Alarcón, Quim. Anal. 6, 427 (1987).
3. R. W. Dabeka and A.D. McKenzie, J. AOAC Int. 75, 954 (1992).
4. M.A. De la Fuente, G. Guerrero, and M.J. Juárez, J. Agric. Food Chem. 43, 2406 (1995).
5. K.K. Cook, J. AOAC Int. 80, 834 (1997).
6. J.L.F.C Lima, C. Delerue-Matos, and M.C.V.F. Vaz, Food Chem. 62, 117 (1998).
7. K. Chen and S. Jiang, Anal. Chim. Acta 470, 223 (2002).
8. M. Burguera, J.L. Burguera, and O.M. Alarcón, Anal. Chim. Acta 179, 351 (1986).
9. M.J. Cal-Prieto, M. Felipe-Sotelo, A. Carlosena, J.M. Andrade, P. López-Mahía, S. Muniategui, and D. Prada, Talanta 53, 1 (2002).
10. A. Moreno-Cid and M.C. Yebra, Spectrochim. Acta 57B, 967 (2002).
11. M.C. Yebra and A. Moreno-Cid, J. Anal. At. Spectrom. 17, 1425 (2002).
12. M.C. Yebra and A. Moreno-Cid, Anal. Chim. Acta 477, 149 (2003).
13. M.C. Yebra, A. Moreno-Cid, R.M. Cespón, and S. Cancela, At. Spectrosc. 24, 31 (2003).
14. J.L. Luque-García and M.D. Luque de Castro, Trends in Anal. Chem. 22, 90 (2003).
15. Official Methods of Analysis, 17 th Ed., AOAC, Arlington, VA, USA, Sec. 50.1.15 (2002).

Artículo VI

**PREPARATION OF A SOLUBLE SOLID SAMPLE BY A
CONTINUOUS ULTRASOUND ASSISTED DISSOLUTION
SYSTEM FOR THE FLOW-INJECTION ATOMIC
ABSORPTION SPECTROMETRIC DETERMINATION OF IRON
IN MILK POWDER AND INFANT FORMULA**

M.C. Yebra, A. Moreno-Cid, R.M. Cespón & S. Cancela,
Talanta (2004), **62**, 403-406



VI

Preparation of a soluble solid sample by a continuous ultrasound assisted dissolution system for the flow-injection atomic absorption spectrometric determination of iron in milk powder and infant formula

M.C. Yebra*, A. Moreno-Cid, R. Cespon, S. Cancela

*Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Bromatology, Faculty of Chemistry,
University of Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain*

Received 7 May 2003; received in revised form 4 July 2003; accepted 12 August 2003

A

A simple and new flow-injection manifold (CUDS) for the continuous ultrasound assisted dissolution of a soluble solid sample coupled to a flow-injection flame atomic absorption spectrometric manifold for the continuous iron determination is described. An experimental design was used for the evaluation of factors involving the CUDS. The method was applied to a certified reference material (CRM-151, skim milk powder) for quality assurance/validation and to real samples (milk powder and infant formulas). The total sampling frequency achieved was 80 samples per hour with a relative standard deviation for the complete procedure of 1.1%. The detection limit was $0.60 \mu\text{g g}^{-1}$ for a sample amount of 30 mg. The results demonstrated that the CUDS is an innovative and efficient tool as compared to the manual-traditional sample preparation methods, but with drastic increase of both sample throughput and precision.

© 2003 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Continuous ultrasound-assisted dissolution system; Flame atomic absorption spectrometry; Iron; Solid soluble samples

Minimise the time required for the whole analytical process is a very important target goal of the present analytical chemistry. Previous steps (including sample preparation) are still the most time consuming stage and a bottleneck of the analytical process when trace metals are determined in a solid sample. This step tends to be labour-intensive and incompatible with the highly developed and automated instrumentation and data treatment that are used in the second and third stages of the analytical process, respectively. Since most analytical instruments such as atomic spectrometric detectors handle liquid samples, attention should be put to improve the solid sample pre-treatment [1]. If the analytical sample is soluble, such as occurs with certain foods (powdered milk, sweets, soluble cocoa and coffee, etc.) sample dissolution is carried out by manual or mechanical stirring, with warming or at room tempera-

ture [2–7]. Manual sample preparation methods based on stirring and glassware to dissolve milk powder samples are time-consuming, no miniaturised, produce sample losses as result of their manipulation and present random errors associated to glassware calibration. Ultrasound is an alternative for solid samples pre-treatment because this energy facilitates and accelerates some analytical steps such as leaching and dissolution among others [8,9]. In this sense, the continuous ultrasound assisted extraction has been proposed as an efficient methodology for separation of trace metals from solid matrices, so as to facilitate their analytical determination avoiding the drawbacks of traditional sample pre-treatment methods. Furthermore, this methodology combines the advantages of ultrasound-assisted extraction with those obtained for flow-injection systems [10–14].

In this paper, we have utilised the latter approach to develop a new and simple continuous ultrasound-assisted dissolution system (CUDS) coupled to a flow-injection (FI) manifold that permits the continuous ultrasound assisted dissolution of solid soluble samples and direct measurement by flame atomic absorption spectrometry

* Corresponding author. Tel.: +34-981563100; fax: +34-981595012.
E-mail address: qncayebi@usc.es (M.C. Yebra).

(FAAS). The method was applied to a certified reference material (CRM-151, skim milk powder) for quality assurance/validation and to real samples (milk powder and infant formulas) for the determination of traces of iron. The CUDS proposed in this paper is suitable to dissolve powder milk samples to obtain an homogeneous dispersion, and can be easily extended to other analytes and soluble matrices.

2.1. Apparatus

The overall manifold for sample dissolution and detection is shown in Fig. 1. It has the following parts. (a) The CUDS is composed of a Gilson Minipuls-3 peristaltic pump fitted with PTFE tubes, an ultrasonic bath (Selecta) programmable for temperature and time and with a frequency of 40 kHz for the ultrasound energy, a glass minicolumn (50 mm $\times$ 3 mm i.d., bed volume 350 μ l) (Omnifit) used as sample container (the ends of the minicolumn were plugged with filter paper) and two Reodyne (models 5041 and 5020) low pressure valves. PTFE tubes (0.8 mm i.d.) were employed as CUDS circuit. (b) The on-line detection is performed by a manifold that comprises a Gilson Minipuls-3 peristaltic pump fitted with PTFE tubes and two Reodyne (models 5020 and 5301) injection or switching valves. PTFE tubes (0.8 mm i.d.) are employed to connect to a Perkin-Elmer 5000 atomic absorption spectrometer furnished with an iron hollow-cathode lamp. The instrument is set at 248.3 nm. The spectrometer output is connected to a Perkin-Elmer 50 servograph recorder with a range of 5 mV. Numerical analysis of experimental designs was performed by means of the

STATGRAPHIC V.4.1 statistical package (Manugistic, Inc., Rockville, MD, USA).

2.2. Reagents

Iron standard solution (1000 mg μ l⁻¹) was of analytical-reagent-grade (Merck). Ultrapure water of 18.3 M Ω cm resistivity obtained from a Milli-Q water purification system (Millipore) was used. The glassware used was cleaned in 4 M HNO₃ for 4 days and rinsed with ultrapure water before use. The certified reference material used was CRM-151, skim milk powder (Community Bureau of Reference (BCR), Brussels, Belgium).

2.3. Procedure

Powdered milk and infant formula samples, 30 mg, were directly weighted into the glass minicolumn. Then, the minicolumn was connected to the CUDS. First, the CUDS circuit (1 ml) was loaded with the dissolving solution (ultrapure water). Once filled the CUES circuit, the SV1 was switched to its other position and a water stream was circulated at 6.0 ml min⁻¹ through the minicolumn during 0.5 min under ultrasonic energy. The direction of the flow was changed each 10 s in order to avoid the sample accumulation in the minicolumn end and to facilitate sample dissolution. Then, the SV2 was switched to its other position and the solubilised sample is homogenised within the mixing coil. The on-line analyte detection was performed by the injection of a volume of 250 μ l of the solubilised sample by means of IV into an ultrapure water carrier stream and the iron was continuously monitored by FAAS. 250 μ l of standard solutions containing between 0 and 5 μ g ml⁻¹ iron are injected by means of IV into the ultrapure water carrier stream.

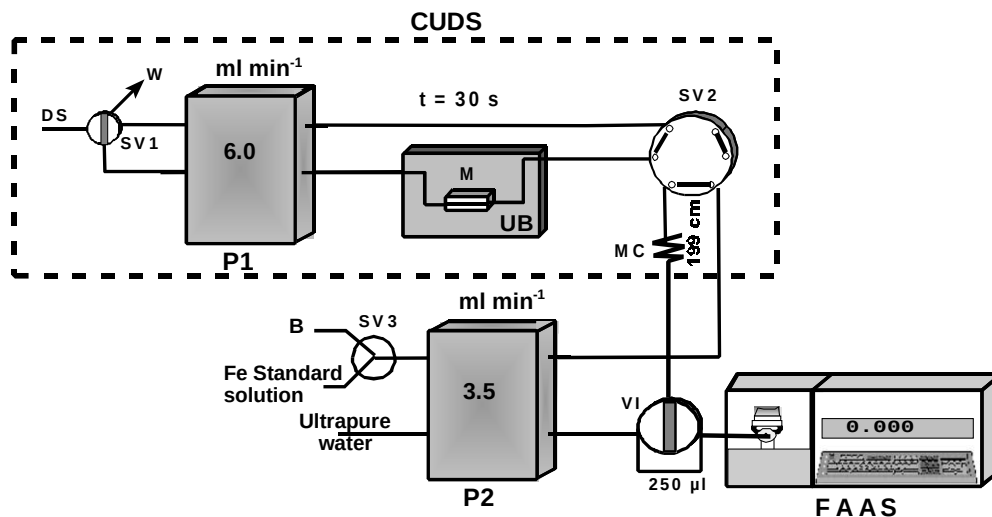


Fig. 1. Schematic diagram of the CUDS and FI-FAAS manifold. B, blank; DS, dissolving solution; FAAS, flame atomic absorption spectrometer; IV, injection valve; M, minicolumn containing the sample; MC, mixing coil; P1 and P2, peristaltic pumps; SV1, SV2 and SV3 selection valves; UB, ultrasonic bath; W, waste.

3.1. Screening of factors involved the CUDS

With the aim of establish the optimum operating conditions involving continuous sample dissolution (nature of dissolving solution, sonication time, dissolution temperature, flow rate of the CUDS and dissolving solution volume), a factorial design (Plackett-Burman $2^6 \times 3/16$ factorial type III resolution design with one centerpoint) was employed. This experimental design involves 13 non-randomised runs. In order to test statistical significance of the effects, an ANOVA is employed by Statgraphic V.4.1. Experiments were performed with a certified reference material (CRM-151, skim milk powder) as target sample with an iron content of $50.1 \pm 1.3 \mu\text{g g}^{-1}$. The variable response was % recovery. Table 1 shows the lower and upper levels for each studied variable. Conclusions extracted from analysis data expressed the statistical significance of two factors (positive sign): sonication time and flow rate of the CUDS, since these factors overtake the limit of statistical significance (95%). However, it must be taken into account that the results of Fe recovery were quantitative (>95%) when sonication time value was the lowest (0.5 min) and the flow rate of the CUDS value was the highest (6 ml min^{-1}). This can be explained because a high flow rate increases the system dynamism and the contact between the dissolving solution and the sample, which equalise the decrease of the sonication time. With regard to the no significative parameters, has been verified that their lowest values achieved quantitative recoveries (better than 95%). This is an important fact because simplifies the CUDS device: is not necessary a temperature control (a room temperature was chosen as optimum) and the dissolving solution can be ultrapure water. Furthermore, as a volume of 1 ml of ultrapure water was enough for the complete sample dissolution, the sensitivity of the FI-FAAS was favoured. Table 1 shows the optimum factor values involving the CUDS.

In the Plackett-Burman design have only been considered the involved variables of the CUDS. The mixing coil length, to homogenise the dissolved sample, was fixed to 199 cm (equivalent to 1.0 ml). The variables tested involving this FI system (Fig. 1) were the carrier flow rate (ultrapure water) and the injected volume of dissolved sample. The carrier flow rate was studied between 3 and 6 ml min^{-1} and the in-

jected volume of dissolved sample between 100 and $400 \mu\text{l}$. The aspiration flow rate of the nebuliser was adjusted to be the same as the flow rate of the carrier solution. Although the greatest aspiration flow rate provides better sensitivity, at the same time a greater dispersion takes place because the carrier flow rate is increased. Therefore, a carrier flow rate of 3.5 ml min^{-1} was chosen as a compromise to obtain the minimum dispersion in the FI system. With regard to the injected sample volume, it was verified that, as it is logical, when the volume was increased the sensitivity is also increased as result of a decreasing of the FI system dispersion. Therefore, a volume of $250 \mu\text{l}$ was chosen, which in addition, allows carry out two injections of each sample and verify its homogeneity.

3.2. Analytical performance and validation

The equation for the linear range of the calibration graph ($n = 7$) was the following: absorbance = $0.030[\text{Fe}] + 4.8 \times 10^{-4}$ ($r = 0.9999$), where [Fe] is Fe concentration, expressed as $\mu\text{g ml}^{-1}$.

To evaluate the possible sample matrix interferences in the iron determination, a standard addition method was performed. In this way, the certified reference material (CRM-151) was spiked with several iron standard solutions, added as dissolving solution into the CUDS ($0\text{--}3 \mu\text{g ml}^{-1}$). In these conditions, an addition calibration graph was run ($n = 7$) under the optimal chemical and flow conditions for the whole process. The equation was: absorbance = $0.030[\text{Fe}] + 0.046$ ($r = 0.9999$), where [Fe] is Fe concentration, expressed as $\mu\text{g ml}^{-1}$. This equation and the calibration graph have the same slope, demonstrating that Fe determination is free of matrix interferences.

The precision and accuracy of the overall continuous analytical method (continuous dissolving and FI detection by FAAS) were determined with 30 mg of CRM-151 (skim milk powder with an iron content of $50.1 \pm 1.3 \mu\text{g g}^{-1}$) under the optimum working conditions. The average concentration of iron found in the CRM (mean $\pm$ S.D., $n = 11$) was $50.3 \pm 0.6 \mu\text{g g}^{-1}$, which agrees with the certified value. The R.S.D. was 1.1% ($n = 11$).

The limit of detection (LOD) was $0.60 \mu\text{g g}^{-1}$, and was calculated as $3 \times \text{S.D.}/m$, where S.D. is the standard deviation of 30 consecutive blank measurements and m is the slope of the corresponding calibration graph.

The sample throughput, taking into account the whole analytical process was ca. 80 samples h^{-1} .

3.3. Analysis of real samples

Various milk powder samples (whole and skim) and infant formulas were analysed by the proposed procedure. The results obtained by the proposed method were compared with those achieved by a conventional off-line sample digestion method. The results, expressed as $\mu\text{g g}^{-1}$ Fe, and their precision ($n = 3$) are shown in Table 2. To compare the results

Table 1
Factor levels in the Plackett-Burman $2^6 \times 3/16$ factorial design and their optimum values

Factor	Low	High	Optimum
HNO_3 concentration (mol l^{-1})	0	3	0
HCl concentration (mol l^{-1})	0	3	0
Sonication time (min)	0.5	5	0.5
Leaching temperature ($^{\circ}\text{C}$)	20 ^a	70	20
Flow rate of the CUES (ml min^{-1})	3.5	6	6
Leaching volume (ml)	1.0	3	1.0

^a Room temperature.

Table 2
Determination of iron in powdered milk samples and infant formulas

Sample	Fe ($\mu\text{g g}^{-1}$)	
	Off-line acid digestion and FAAS determination ^a	Present method ^a
(1) Milk powder	91 $\pm$ 3	91.1 $\pm$ 0.6
(2) Milk powder	64 $\pm$ 3	62.6 $\pm$ 0.6
(3) Infant formula	66 $\pm$ 3	65.5 $\pm$ 0.6
(4) Infant formula	86 $\pm$ 2	84.8 $\pm$ 0.6
(5) Infant formula	97 $\pm$ 2	97.4 $\pm$ 0.0
(6) Infant formula	82 $\pm$ 2	80.4 $\pm$ 0.6
(7) Infant formula	41 $\pm$ 3	41.4 $\pm$ 0.6

$\bar{X}$ (mean difference): 0.33; S.D.: 0.63; $n = 7$; $t = 2.45$; critical value of $t = 1.38$.

^a Mean $\pm$ S.D. ($n = 3$).

obtained by both methods, the paired t -test was applied and it concluded that both methods do not give significantly different values for the iron concentration and thus, the agreement between the two methods is satisfactory (Table 2).

A

The authors are grateful for the financial support provided by the Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Ministerio de Ciencia y Tecnología (Project no. CAL01-043). A. Moreno-Cid is also

grateful to the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte for a FPU scholarship (AP 2001-0367).

- [1] B. Welz, M. Sperling, Atomic Absorption Spectrometry, Wiley-VCH, Weinheim, 1999.
- [2] Z.A. Khammas, J. Marshall, D. Littlejohn, J.M. Ottaway, S.C. Stephen, Mikrochim. Acta 1 (1985) 333.
- [3] D.J. Hutchinson, F.J. Disinski, C.A. Nardelli, J. Assoc. Off. Anal. Chem. 69 (1986) 60.
- [4] D. Wagley, G. Schmiedel, E. Mainka, H.J. Ache, Atom. Spectrosc. 10 (1989) 106.
- [5] S. Stürup, A. Büchert, Fresenius J. Anal. Chem. 354 (1996) 232.
- [6] N. Campillo, P. Viñas, I. López-García, M. Hernández-Córdoba, Talanta 46 (1998) 615.
- [7] M.E. Soares, M.L. Bastos, M. Ferreira, J. AOAC Int. 83 (2000) 220.
- [8] M.D. Luque de Castro, J.L. Luque-García, Acceleration and Automation of Solid Sample Treatment, Elsevier, Amsterdam, 2002.
- [9] J.L. Luque-García, M.D. Luque de Castro, Trends Anal. Chem. 480 (2003) 231.
- [10] A. Moreno-Cid, M.C. Yebra, Spectrochim. Acta 57B (2002) 967.
- [11] M.C. Yebra, A. Moreno-Cid, J. Anal. Atom. Spectrom. 17 (2002) 1425.
- [12] M.C. Yebra, A. Moreno-Cid, Anal. Chim. Acta 477 (2003) 149.
- [13] M.C. Yebra, A. Moreno-Cid, R.M. Cespón, S. Cancela, Atom. Spectrosc. 24 (2003) 31.
- [14] J. Ruiz-Jiménez, J.L. Luque-García, M.D. Luque de Castro, Anal. Chim. Acta 480 (2003) 231.

Artículo VII

**CONTINUOUS ULTRASOUND-ASSISTED EXTRACTION
COUPLED TO A FLOW INJECTION-FLAME ATOMIC
ABSORPTION SPECTROMETRIC SYSTEM FOR CALCIUM
DETERMINATION IN SEAFOOD SAMPLES**

A. Moreno-Cid & M.C. Yebra

Anal. Bioanal. Chem. (2004), **379**, 77-82



VII

A. Moreno-Cid · M. C. Yebra

Continuous ultrasound-assisted extraction coupled to a flow injection-flame atomic absorption spectrometric system for calcium determination in seafood samples

Received: 29 September 2003 / Revised: 20 November 2003 / Accepted: 28 November 2003 / Published online: 22 January 2004
© Springer-Verlag 2004

Abstract Calcium was extracted on-line from solid seafood samples by a simple and rapid continuous ultrasound-assisted extraction system. This system is connected to a flow injection manifold, which allows the on-line flame atomic absorption spectrometric determination of calcium. This method enables the analysis of solid samples avoiding time-consuming traditional sample preparation methods and their inherent errors. The on-line manifold for calcium determination is the simplest possible, because a volume of 250 μ L of acid extract is injected into an ultrapure water carrier stream. The acid extract was diluted on-line with lanthanum, which also acts as masking agent in order to avoid chemical interferences. The continuous monitoring of the calcium signal was accomplished by flame atomic absorption spectrometry. A Plackett-Burman experimental design was used for the optimisation of the continuous leaching procedure. The method allowed a total sampling frequency of 40 samples per hour, with a relative standard deviation for the complete procedure of 0.9% (for a sample containing 3414.35 mg/kg calcium (dry mass)). The limit of detection was found to be 44.4 mg/kg (dry mass) for 5 mg of sample. The analytical procedure was applied to real seafood samples.

Keywords Continuous ultrasound-assisted extraction system · Flame atomic absorption spectrometry · Calcium determination · Seafood

Introduction

Calcium is an essential element in the human diet and the most abundant mineral in our bodies. It intervenes in numerous health critical roles, such growth and reproduction

in the human body, and it is essential for the formation and maintenance of healthy bones and teeth [1]. This is the reason that calcium forms a critical part of a healthy daily diet. Recommended dietary calcium intake per day varies, depending on factors such age and gender. Milk, green leafy vegetables and seafood are important sources of calcium to humans. So it is of great interest to determine the amount of Ca metal in these foods.

Calcium is one of the elements most frequently determined by atomic absorption spectrometry (AAS), since the sensitivity of the graphite furnace technique is rarely required [2]. The problems involved with calcium determination by AAS are the chemical interferences in the atomisation cell when aluminium, silicon and phosphate are present. In these cases, when the Ca(II) reacts with the above-mentioned anions, refractory compounds are formed, resulting in a lower Ca atom population in the AAS, and so a decrease in the Ca concentration and an erroneously low analyte signal [3, 4]. The use of the hot nitrous oxide-acetylene flame [5, 6] will cause higher dissociation and better results than the air acetylene flame, but this is not necessarily the best method for overcoming this problem because this type of flame is more dangerous. Therefore, these interferences are usually eliminated using releasing agents. The releasing agents react preferentially with the interfering species and avoid reactions with calcium. For example, strontium [7] or lanthanum [8, 9, 10] are added as releasing agents in the determination of calcium to minimize the phosphate interference. Protective reagents such as EDTA, 8-hydroxyquinoline and the ammonium salt of pyrrolidine-1-carbodithioic acid [3] which form stable and volatile compounds with calcium, can also be used.

The conventional way to determine trace metals by means of atomic absorption spectrometry requires a suitable solution of these metals from the solid sample to be introduced into the analytical instrument. This step is currently the major limiting step in the analytical process. Ultrasound energy is a great help for sample pretreatment. Ultrasound-assisted leaching is an effective way to extract the analytes from different types of solid samples. This methodology offers several advantages over other sample

A. Moreno-Cid · M. C. Yebra (✉)
Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Bromatology,
Faculty of Chemistry, University of Santiago de Compostela,
15782 Santiago de Compostela, Spain
e-mail: qncayebi@usc.es

pretreatments, such as a wide application field that includes any sample independently of their form or size, a quantitative extraction of the analyte, and a short extraction time [11, 12]. Nevertheless, these off-line procedures are laborious and time-consuming because they involve large sonication times and a centrifugation step to separate the liquid phase. Continuous ultrasound-assisted extraction coupled to an on-line flow injection-flame atomic absorption spectrometric manifold (FI-FAAS) avoids all of these drawbacks. This approach was used successfully to determine copper, iron and manganese in seafood samples [13, 14, 15]. In this work, a continuous ultrasound-assisted extraction system (CUES) was used to determine calcium in seafoods such as mussel, tune, sardine, hake, crab, prawn, nazor-shell, scallops, cockle and clam. The manifold was modified, since it requires a dilution channel due to the high concentrations of calcium present in the samples. Furthermore, since phosphate interferes in the calcium determination, this interference was masked by a lanthanum salt (III) solution used also as dilution solution.

Experimental

Apparatus

The overall manifold consists of the following two parts (see Fig. 1): (I) the continuous ultrasound extraction system (CUES), which accomplishes the sample lixiviation, and (II) calcium dilution/masking with lanthanum solution and subsequent FAAS monitoring (Fig. 1). The CUES was composed of a Gilson Minipuls-3 peristaltic pump fitted with PTFE tubes, an ultrasonic bath (Selecta), a glass minicolumn (50 mm×3 mm i.d., bed volume 350 μ L) (Omnifit) which was used as sample container (the ends of the minicolumn were plugged with filter paper), and two Reodyne (models 5041 and 5020) low pressure valves. The on-line calcium monitoring was performed by a manifold that comprises a Gilson Minipuls-3 peristaltic pump fitted with PTFE tubes and two Reodyne (model 5020 and 5301) injection or switching valves. PTFE tubes (0.8 mm i.d.) were employed to connect the FI manifold to a Perkin Elmer 5000 atomic absorption spectrometer with a deuterium background correction. This analytical instrument was furnished with a calcium

hollow-cathode lamp and was set at 422.7 nm. A standard air/acetylene flame was used. The spectrometer output was connected to a Perkin Elmer 50 servograph recorder with a range of 5 mV. The signals measured were the heights of the absorbance peaks. Numerical analysis of experimental designs was performed by means of the STATGRAPHIC v.4.1 statistical package (Manugistic, Inc. Rockville, MD, USA).

Reagents and solutions

Ultrapure water of 18.3 M Ω cm resistivity obtained from a Milli-Q water purification system (Millipore) was used for the preparation of samples, reagents and standards. All glassware used was cleaned in 4 M HNO₃ for four days and rinsed with ultrapure water before use. Hydrochloric acid and nitric acid were both reagent grade (Merck, Darmstadt, Germany). The calcium stock solution was prepared by dissolving 2.9500 g of analytical reagent grade Ca(NO₃)₂·4H₂O (Merck, Darmstadt, Germany) carefully in 0.5 L of 0.07 M nitric solution. Therefore, a solution containing 1000 μ g/mL of calcium was obtained. Working solutions containing calcium in the range 10–50 μ g/mL were prepared by suitable dilution of the stock solution. The lanthanum solution (0.14 M) was prepared by dissolving 13.3700 g of LaCl₃·7H₂O (Merck, Darmstadt, Germany) in 250 mL of ultrapure water.

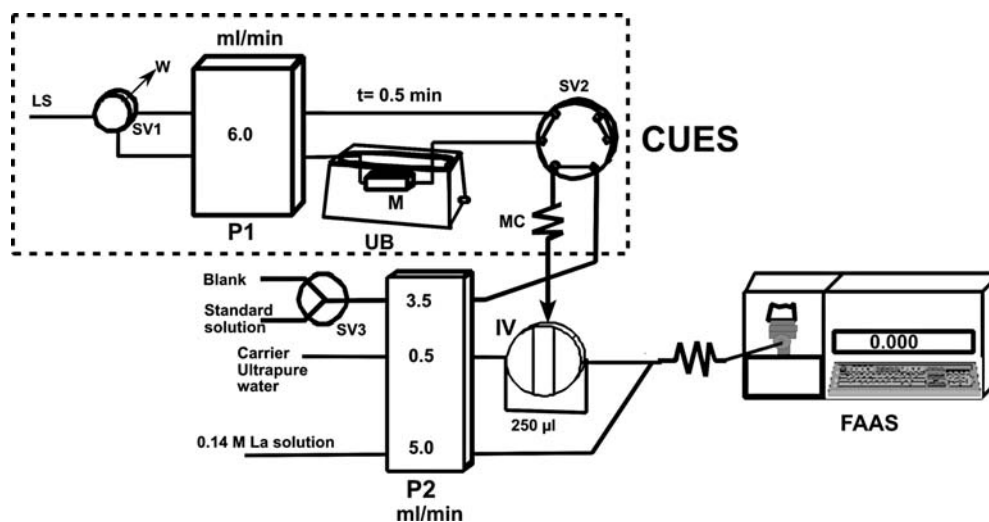
Sample preparation

Fresh mussel and clam samples were collected from the Galician coast (northwest Spain). The other seafoods were purchased in local markets. The samples were triturated, grinded, blended, homogenised, freeze-dried, and then kept in clean, dry containers. In all cases, after sieving, fractions with particle size under 100 μ m were taken.

Procedure

Seafood samples, 5 mg, were directly weighed into a glass minicolumn. Then the minicolumn was connected to the CUES. First, the CUES circuit (1.0 mL) was loaded with the acid leaching solution (3 M nitric acid). Once the CUES circuit was filled, the SV1 was switched to its other position and the acid leaching solution flowed at 6.0 mL/min through the minicolumn for 0.5 min under ultrasonic treatment (changing the direction of the flow each 10 s in order to avoid compacting the sample in the minicolumn). With this time elapsed, the SV2 was switched to its other position. Then, a volume of 250 μ L of acid extract was injected by means of IV

Fig. 1 Schematic diagram of the CUES and optimum working conditions for the on-line Ca determination: I) on-line acid leaching step, and; II) continuous detection of Ca. P1 and P2, peristaltic pumps; UB, ultrasonic bath; M, minicolumn; IV, injection valve; SV1, SV2 and SV3, switching valves; MC, mixing coil; W, waste; B, blank and FAAS, flame atomic absorption spectrometer



into an ultrapure water carrier stream at a flow rate of 0.5 mL/min. In order to avoid chemical interferences in the calcium determination and to obtain an analytical signal within the linear range, a 0.14 M lanthanum diluent/masking agent channel, at a flow rate of 5.0 mL/min, was inserted in the FI manifold. Finally, once these two streams were converged, the diluted acid extract was swept to the detector where it was monitored at 422.7 nm. 250 μ L of standard solutions containing between 10 and 50 mg/L of calcium in the same acid medium as the leaching solution were then injected by means of IV into an ultrapure water carrier stream, diluted with La 0.14 M, and swept to the detector. Blank determinations were performed in the same way and for all instances the absorbance was close to 0.000.

Results and discussion

Optimisation of calcium extraction

The optimisation of the whole proposed procedure was focused on the continuous ultrasound extraction step. The determination step was optimised taking into account the optimum values found for the CUES.

The variables studied in theory are those involving the CUES (nitric acid concentration, hydrochloric acid concentration, sonication time, leaching temperature, flow rate and leaching volume of the CUES) and the lanthanum solution concentration used as dilution/masking solution. In order to study the behaviour of these variables, a factorial Plackett-Burman $2^7 \times 3/32$ type III resolution design allowing five degrees of freedom plus one centre point was built. The lower and upper values given to each variable were chosen from the available data and from experience gathered in previous experiments (Table 1). This experimental design involves 13 non-randomised runs. In order to test the statistical significance of the effects, an ANOVA was employed by Statgraphic v. 4.1. This factorial design has been applied on 5 mg of a mussel sample with a calcium content of 3414.35 ± 38.98 mg/kg (dry mass) (this calcium concentration was determined in triplicate by using a conventional digestion procedure with concentrated nitric acid and off-line FAAS detection). To optimise the CUES, calcium was measured on-line in the leachate by FAAS with a flow system identical to that depicted in Fig. 1. The variable response was % Ca recovery. The numerical analysis of the results produced the standardised main effects Pareto Chart (Fig. 2). In this chart, bar lengths are proportional to the absolute value of the

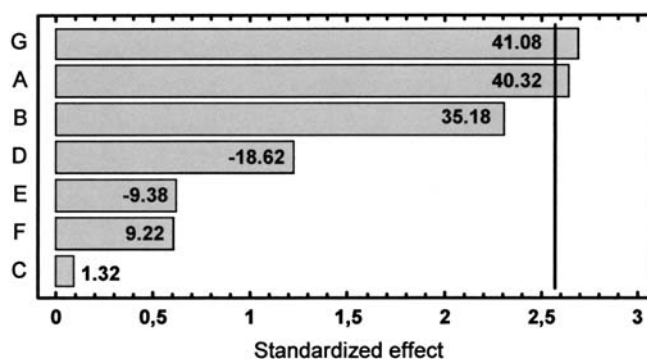


Fig. 2 Standardised Pareto Chart for the Plackett Burman design ($2^7 \times 3/32$) for the continuous ultrasonic acid extraction of calcium from seafood samples. The vertical line indicates the statistical significance ($P=95\%$) bound for the effects, and the numbers are their estimated effects

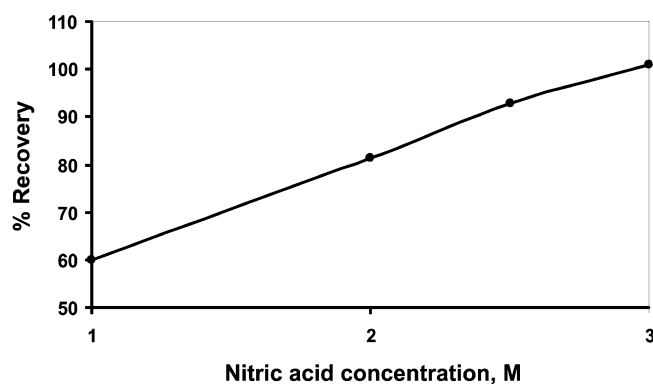


Fig. 3 Optimisation of nitric acid concentration (leaching solution)

estimated effects, which help to compare their relative importance. The main conclusion of this screening study is that the nitric acid and lanthanum solution concentrations are influential factors within the ranges studied because these factors exceed the limit of statistical significance (95%). Both factors have a positive influence, which means that an increase of these factors provides the best calcium recoveries (for the levels tested). Hydrochloric acid concentration, sonication time and leaching volume are affected by a positive estimated effect, but they are not statistically influential factors for the levels tested. The leaching temperature and the flow rate of the CUES are not statistically influential factors, but in this case they are affected by a negative estimated effect.

As the Plackett-Burman design only provides the tendencies to the optimum values of the variables, these factors were fine-tuned outside the framework of the design. In the case of the acids (leaching solution), the goal was to decrease these concentrations, because a high acid concentration can produce serious damage in the spectrometer nebuliser of FAAS. In this sense, several experiments were carried out to study the optimum concentration of the acids. These experiments showed that a 3 M nitric acid solution used as leaching solution (without hydrochloric

Table 1 Factor levels in Plackett-Burman factorial design, and their optimum values

Factor	Key	Low	High	Optimum
[HNO ₃](M)	A	0	3	3
[HCl](M)	B	0	3	0
Sonication time (min)	C	0.5	5	0.5
Temperature (°C)	D	20	70	20
CUES flow rate (mL/min)	E	3.5	6.0	6.0
Leaching volume (mL)	F	1.0	5.0	1.0
[La] (M)	G	0.07	0.36	0.14

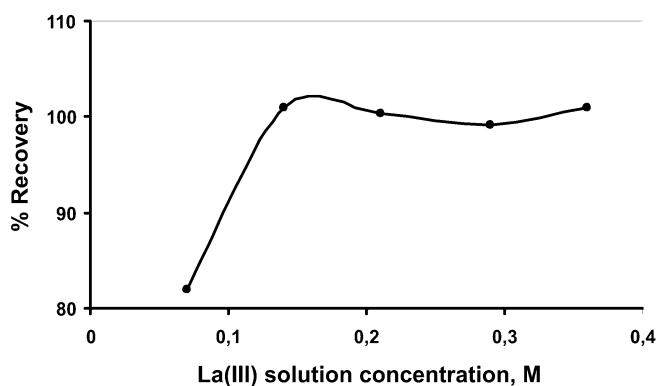


Fig. 4 Optimisation of La(III) solution concentration (diluent/masking agent solution)

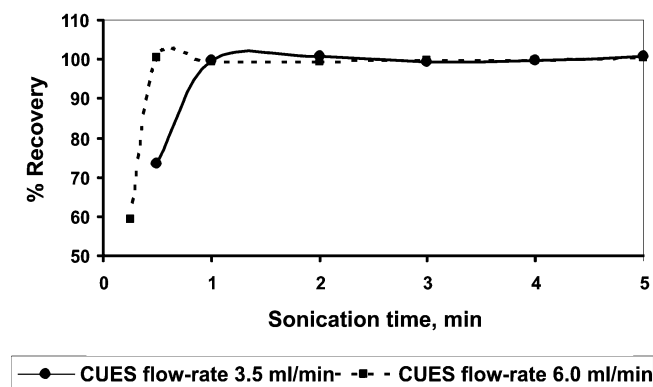


Fig. 5 Optimisation of sonication time for two CUES flow-rates

acid) was enough to obtain a quantitative calcium recovery (100.3%). Nevertheless, a lower nitric acid concentration (2 M) achieved a non-quantitative recovery (81.3%), as can be seen in Fig. 3. Due to its high cost, the La (III) solution concentration was also fine-tuned in order to determine the lowest concentration necessary to avoid chemical interference. This variable was tested between 0.07–0.36 M and the results are shown in Fig. 4. It can be seen that a 0.14 M lanthanum solution concentration was enough to avoid all of the chemical interferences. With regard to the CUES flow rate and sonication time, both not statistically influential factors, they were also fine-tuned outside of the framework of the design. In this way, the sonication time was studied at two flow rates: 3.5 and 6.0 mL/min. In the first case, the minimum sonication time to obtain a quantitative recovery was 1 min. On the other hand, at a flow rate of 6.0 mL/min the minimum time necessary to obtain a quantitative recovery was 0.5 min (Fig. 5). Therefore, in order to achieve the highest sampling frequency, the optimum values chosen for these factors were 6.0 mL/min and 0.5 min, respectively. The leaching temperature is not a statistically significant variable and it presents a negative estimated effect. Then, room temperature was chosen as optimum value because this variable does not affect the extraction process, and this value also simplifies the FI system because there is no need for a temperature control.

The estimated effect of leaching volume is positive, but it is also not significant. Nevertheless, is important to diminish this variable in order to increase the sensitivity of the method. The experimental results showed that 1.0 mL of leaching solution is enough to quantitatively extract the Ca present in the sample.

The sample particle size and the amount of sample were studied by an univariate method. By using the optimum conditions of the CUES, particle sizes smaller than 30 μm and between 30–100 μm were tested. The results obtained indicated that this variable does not affect the extraction process within the range tested. This can be explained by the high energy supplied by the ultrasound (frequency of 40 KHz), which increases the contact between the sample and the leaching solution. As a sample amount of 5 mg was used to optimise the CUES system and we obtained good results, we suppose that smaller quantities would also be suitable. However, is important to determine the maximum sample amount that the CUES is able to leach quantitatively in order to increase the sensitivity of the method. For this purpose we studied sample amounts between 10–15 mg with successfully results. Sample amounts higher than these were not studied because calcium concentration exceeded the linear range for this metal and it would be necessary to make a higher dilution of the acid extract. The mixing coil length was fixed at 199 cm (equivalent to 1.0 mL, the same volume of acid extract).

The flow injection variables studied (Fig. 1) were the carrier flow rate (ultrapure water), the diluent/masking agent flow rate and the injected volume of acid extract. The carrier and the diluent/masking agent (La 0.14 M) flow rates were established taking into account the necessary dilution of the acid extract for calcium determination. Therefore, the optimum values established for these variables were 0.5 and 5.0 mL/min, respectively. With regard to the injected volume of the acid extract, it was verified that, as is logical, when the volume was increased the sensitivity increased too. Therefore, a volume of 250 μL was chosen, which in addition allows us to make two injections of each acid extract and verify its homogeneity.

Analytical figures of merit

The calibration graph was run ($n=8$) under the optimal chemical and flow conditions for the global process; the equation for absorbance was $\text{absorbance} = 2.9 \times 10^{-4} + 0.0034 [\text{Ca}]$ ($r=0.9999$), where $[\text{Ca}]$ is Ca concentration, expressed as mg/L.

To evaluate the calcium determination for possible sample matrix interferences, a standard addition method was performed. In this way, a sample with a calcium content of $3414.35 \pm 38.98 \text{ mg/kg}$ (dry mass) was spiked with several calcium standard solutions added to the leaching solution (0–35 mg/L). In these conditions, an additional calibration graph was derived ($n=7$) under the optimal chemical and flow conditions for the global process; here the absorbance equation was $\text{absorbance} = 5.8 \times 10^{-2} [\text{Ca}] + 0.0034$

Table 2 Determination of calcium in seafood samples and paired t-test

Sample	Ca (mg/kg dry mass)		<i>D</i>	<i>R</i> (%) ^a
	Off-line acid digestion and FAAS determination ^b	Present method ^b		
Mussel 1	5687.37±38.98	5668.92±34.08	18.45	99.7
Mussel 2	3661.91±38.98	3662.17±34.08	-0.26	100.0
Mussel 3	3234.31±67.52	3249.02±34.08	-14.71	100.5
Mussel 4	4832.18±38.98	4842.61±34.08	-10.43	100.2
Mussel 5	3414.35±38.98	3426.08±34.08	-11.73	100.3
Mussel 6	3954.48±38.98	3917.93±34.08	36.55	99.1
Mussel 7	3796.94±38.98	3799.89±34.08	-2.95	100.1
Mussel 8	4021.99±38.98	4016.30±34.08	5.69	99.9
Mussel 9	3391.85±38.98	3386.73±34.08	5.12	99.8
Mussel 10	4067.00±38.98	4075.32±34.08	-8.32	100.2
Tuna	1546.42±67.52	1576.73±59.02	-30.31	102.0
Sardine	6767.62±38.98	6731.31±34.08	36.31	99.5
Hake	1748.97±67.52	1753.79±59.02	-4.82	100.3
Crab	4472.09±38.98	4449.13±34.08	22.96	99.5
Prawn	6857.64±38.98	6849.35±34.08	8.29	99.9
Nazor-shell	3459.36±38.98	3445.76±34.08	13.60	99.6
Scallops	2356.61±67.52	2344.01±59.02	12.60	99.5
Cockle	2626.67±67.52	2619.45±34.08	7.22	99.7
Clam 1	4269.55±38.98	4272.06±34.08	-2.51	100.1
Clam 2	3999.49±38.98	3976.95±34.08	22.54	99.4

X (mean difference): 5.164;
S.D.: 17.027; *n*=20; *t*=2.09.

Critical value of *t*=1.36.

^a Recovery (%) = $\frac{[(\text{Ca}) \text{ continuous acid leaching}]}{[(\text{Ca}) \text{ off-line acid digestion}]} \times 100$;

^b mean±standard deviation (S.D.) (*n*=3), sample amount is about 5 mg. *D*: difference; *R*: recovery

(*r*=0.9999), where [Ca] is Ca concentration, expressed as mg/L. This equation and the calibration graph have the same slope, demonstrating that the Ca determination is free of matrix interferences. Therefore, one can make the calibration graph with Ca standard solutions to avoid the spiking process and so speed up the analysis time.

The precision of the overall continuous analytical method (continuous extraction and FI Ca monitoring by FAAS) was checked with a mussel sample with a calcium content of 3414.35±38.98 mg/kg (dry mass) (*n*=11). The result, expressed as relative standard deviation, was 0.9%.

The limit of detection (LOD) based on three times the standard deviation (*n*=30) of the blank was found to be 44.4 mg/kg (dry mass) for 5 mg of sample.

The sample throughput, taking into account the global analytical process was ca. 40 samples/h.

Validation of the method

To check the validity of the proposed method, several seafood samples were analysed for the determination of Ca. The results obtained by the proposed method were compared with those achieved by a conventional off-line acid digestion: 0.3 g of sample was mixed with concentrated nitric acid in a glass beaker and heated on a hot-plate until the sample was completely dissolved. Once cool, the solution was transferred into a 25 mL calibrated flask and made up to volume with ultrapure water. An aliquot of 1 mL of this solution was transferred to a 25 mL calibrated flask and made up to volume with La(III) solution in order to obtain a concentration of 0.14 M La(III). The cal-

cium concentration in this diluted solution was measured by FAAS.

The results, expressed as mg/kg Ca, and their standard deviation (*n*=3) obtained by these two methods are shown in the Table 2. According to the paired t-test (*P*=0.05) the results are in agreement, so both methods are statistically comparable.

Conclusions

The continuous ultrasound-assisted extraction system (CUES) incorporated into an on-line flow-injection manifold has been demonstrated to be a rapid, precise and accurate sample pre-treatment procedure for the acid leaching of Ca and its determination by FAAS in solid seafood samples. The on-line coupled assembly is simple and robust, and the system offers all of the inherent advantages of the automatic methods, such as low sample and reagent consumption, minimal manipulation, high throughput, and accurate and reproducible results.

The use of this automatic manifold allowed the extraction of the target analyte from the sample in a time shorter than that required by tedious manual methodologies such as dry ashing, wet or microwave digestion, and slurry preparation, providing similar results and better precisions because these other methodologies are time-consuming, not miniaturized, not automated, produce sample losses as a result of intensive sample manipulations, and present random errors associated with glassware calibration and difficult sample homogenisation. Our method is also implemented in a closed system, offering protection from potential contamination from the environment.

This procedure combines the benefits of the ultrasound-assisted extraction with those obtained by the FI systems, and avoids the drawbacks associated with the previous FI approaches for ultrasonic extraction, that involve a complicated sample cell, and the need to use a debubbler.

Acknowledgements The authors are grateful for the financial support provided by the Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Ministerio Ciencia y Tecnología (Project no. CAL01-043). A.M.B. acknowledges a grant from the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, AP2001-0367.

References

1. Townshed A, Worsfold P, Haswell S, Werner H, Macrae R, Wilson I (1995) (eds) *Encyclopedia of analytical science*. Academic, London
2. Welz B (1985) *Atomic absorption spectrometry*. VCH, Weinheim
3. Vandecasteele C, Block CB (1993) *Modern methods for trace element determination*. Wiley, Chichester
4. Alfassi ZB (ed)(1994) *Determination of trace elements*. VCH, Weinheim
5. Van Staden JF, Van Rensburg A (1990) *Fresen J Anal Chem* 337:393–397
6. Van Staden JF, Van Rensburg A (1990) *Analyst* 115:605–608
7. Salinas F, Mahedero MC, Jiménez Arrabal M (1992) *Quim Anal* 11:11–16
8. Welch MW, Hamar DW, Fettman MJ (1990) *Clin Chem* 36: 351–354
9. Arslan Z, Tyson JF (1999) *Talanta* 50:929–937
10. Udoh AP (2000) *Talanta* 52:749–754
11. Luque de Castro MD, Luque-García JL (2002) *Acceleration and automation of solid sample treatment*. Elsevier, Amsterdam
12. Luque-García JL, Luque de Castro MD (2003) *Trends Anal Chem* 22:41–47
13. Moreno-Cid A, Yebra MC (2002) *Spectrochim Acta B* 57:967–974
14. Yebra MC, Moreno-Cid A (2002) *J Anal Atom Spectrom* 17: 1425–1428
15. Yebra MC, Moreno-Cid A (2003) *Anal Chim Acta* 477:149–155

Artículo VIII

**FLOW INJECTION DETERMINATION OF COPPER AND
IRON IN SEAFOODS BY A CONTINUOUS ULTRASOUND-
ASSISTED SYSTEM COUPLED TO FAAS**

M.C. Yebra, A. Moreno-Cid & S. Cancela

Int. J. Environ. Anal. Chem. (2005). Aceptado.

VIII

Flow injection determination of copper and iron in seafoods by a continuous ultrasound-assisted extraction system coupled to FAAS

M^a DEL CARMEN YEBRA*, AMADA MORENO-CID and SHEILA CANCELA

Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Bromatology, Faculty of Chemistry,
University of Santiago de Compostela, 15782-Santiago de Compostela, Spain

(Received 21 April 2004; in final form 20 October 2004)

Copper and iron were extracted on-line from solid seafood samples by a robust, fast and simple continuous ultrasound-assisted extraction system (CUES). CUES is connected to a flow-injection manifold, which allows on-line flame atomic absorption spectrometric determination of copper and iron. Experimental designs were used to optimize the continuous leaching procedures. These methods allowed a total sampling frequency of 46 and 18 samples per hour, with relative standard deviations of 1.6% and 0.3%, for copper and iron, respectively (for a sample containing 13.6 µg/g of copper and 217.3 µg/g of iron (dry mass)). The limits of detection for 30 mg of sample were 0.3 µg/g for copper and 0.6 µg/g for iron (dry mass). Analytical procedures were verified by the analysis of a standard reference material (lobster hepatopancreas marine, TORT-1) and were applied to several real seafood samples from the estuaries of Galicia (Spain) with satisfactory results.

Keywords: Continuous ultrasound-assisted extraction system; Flame atomic absorption spectrometry; Copper determination; Iron determination; Seafood samples

1. Introduction

Copper and iron are closely implicated in metabolic processes of the human metabolism. In addition to their nutritional interest, the determination of these elements in seafood samples contributes to obtain environmental information [1]. Seafoods are important biological monitors because the metal concentrations founded in them are closely related to the degree of environmental contamination of the surrounding environment [2].

Several methodologies have been proposed for the determination of trace metals in solid samples, above all involving electrothermal atomic absorption spectrometry (ETAAS) and flame atomic absorption spectrometry (FAAS) detectors [3–8]. Nevertheless, the preparation of a solid sample is often the most problematic analytical

*Corresponding author. Fax: 34981595012. E-mail: qncayebi@usc.es

step because it is time-consuming and presents several potential drawbacks. Most solid-sample pretreatment procedures are still performed manually, making them slow, complex, tedious and usually the source of analytical errors (random errors are mainly associated with glassware calibration) and contamination problems [9]. Automation of the solid sample pretreatment in the analytical process is an arduous task. In this sense, flow-injection (FI) techniques have been shown to be very useful in automating solid-sample pre-treatment [10]. Generally, when continuous flow techniques are used for the pretreatment of solid samples, external energy, such as ultrasonic or microwave energy, is utilized. The insertion of a microwave oven into an FI manifold offers many advantages over off-line digestion methodologies: it enables automated operations, minimizes extensively the time delay between sample delivery and analysis, allows easy digestion of complex matrices, improves personal safety, and decreases any losses of volatile analytes [11,12]. Nevertheless, these advantages are accompanied by certain drawbacks such as matrix interference, since the sample matrix is introduced into the detector, and a cooling area in the FI system is needed due to the high temperature achieved in the oven. Ultrasound has emerged as an alternative method for solid-sample pre-treatment and is used in quantitative extraction of metal ions using diluted acids [13–15]. FI-ultrasound assisted extraction has several advantages over its off-line counterparts, such as minimization of sonication time (reduced by a factor of 6–12) and reagent consumption. Furthermore, the centrifugation step to separate the liquid phase (which usually requires 10–20 min) is removed, thus simplifying the process considerably [16–17].

In this paper, a continuous ultrasound extraction system (CUES) incorporated into an on-line flow injection manifold is described and optimized for copper and iron determination in seafood samples.

2. Experimental

2.1 Instrumentation

The overall manifold consists of the following: (A) the CUES, which carries out the sample lixiviation; and (B) copper or iron analysis by FAAS (figure 1). The CUES is composed of a Gilson Minipuls-3 peristaltic pump fitted with PTFE tubes, an ultrasonic bath (Selecta), a glass minicolumn (50 mm × 3 mm i.d., bed volume 350 µL) (Omnifit) used as a sample container (the ends of the minicolumn were plugged with filter paper (Whatman 541)) and two Reodyne (models 5041 and 5020) low-pressure valves. The on-line copper or iron monitoring was performed by a manifold comprising a Gilson Minipuls-3 peristaltic pump fitted with PTFE tubes and two Reodyne (model 5020 and 5301) injection or switching valves. PTFE tubes (0.8 mm i.d.) were used to connect the FI manifold to a Perkin Elmer 5000 atomic absorption spectrometer with deuterium background correction. This analytical instrument was furnished with a suitable hollow-cathode lamp and set at 324.8 or 248.3 nm, for copper or iron, respectively. A standard air/acetylene flame was used. The spectrometer output was connected to a Perkin Elmer 50 servograph recorder with a range of 5 mV. The signals measured were the heights of the absorbance peaks. Numerical analyses of experimental designs were performed by means of the Statgraphic V.4.1 statistical package (Manugistic, Rockville, MD).

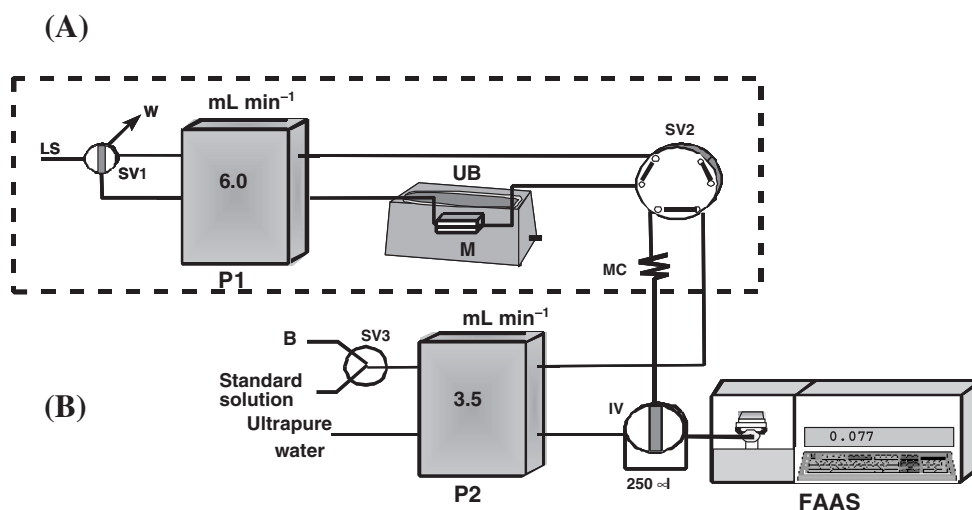


Figure 1. Schematic diagram of the CUES and optimum working conditions for the on-line Cu and Fe determination: (A) on-line acid leaching step; and (B) on-line Cu/Fe monitoring. P1 and P2: peristaltic pumps; UB: ultrasonic bath; M: minicolumn; IV: injection valve; SV: switching valves; MC: mixing coil; W: waste; B: blank and FAAS. flame atomic absorption spectrometer.

2.2 Material, reagents and solutions

Ultrapure water of 18 M Ω cm resistivity obtained from Milli-Q water purification system (Millipore) was used for the preparation of samples, reagents and standards. The glassware used was cleaned in 4 M HNO₃ for 4 days and rinsed with ultrapure water before use. Hydrochloric acid, nitric acid, copper (1000 μ g/mL) and iron (1000 μ g/mL) standards were of reagent grade (Merck). The certified reference material used to validate the proposed method was TORT-1 (lobster hepatopancreas marine, National Research Council of Canada) with a certified concentration of $439 \pm 22 \mu$ g/g for Cu and $186 \pm 11 \mu$ g/g for Fe.

2.3 Sample preparation

Fresh mussel and clam samples were collected from Galician coast (Northwest, Spain). Other seafoods were purchased in local markets. The samples were triturated, grinded, blended, homogenized, freeze-dried, and then kept in clean, dry containers. In all cases, after sieving, fractions with particle size under 100 μ m were taken.

2.4 Procedure for copper and iron determination in seafood samples

The continuous copper and iron determination system is shown in figure 1. Seafood samples (30 mg) were directly weighted into a glass minicolumn. Then, the minicolumn was connected to the CUES. First, the CUES circuit (1 mL) was loaded on-line with the acid leaching solution (3 M nitric acid). Then, the SV1 was switched to its other position, thereby closing the CUES circuit. The leaching solution was circulated

at 6.0 mL/min under ultrasonic irradiation through the minicolumn for 1 min for copper and 3 min for iron extraction, changing the direction of the flow each 20 s to prevent sample accumulation at the minicolumn ends. Then, the SV2 was switched to its other position, the acid extract circulated towards the mixing coil to be homogenized, and finally, 250 μ L of this acid extract was injected by means of an IV into an ultrapure water carrier stream transporting it to the detector. After the sample measurement was accomplished, the CUES circuit was washed with ultrapure water to avoid carryover, and a new minicolumn was inserted into the closed circuit for the next analysis. Standard solutions containing 0–5 μ g/mL of copper or iron, in the same acid medium as the leaching solution, were injected into an ultrapure water carrier stream by IV. Blank determinations were done using the acid leaching solution, and in all instances the absorbance was close to 0.000.

For routine analysis, 20 minicolumns were sufficient for several analytical cycles in a working day. The time required to clean up and dry these type of minicolumns was about 2 min.

3. Results and discussion

Optimization of the whole proposed procedure focused on the continuous ultrasound extraction step. The detection step was optimized taking into account the optimum values found for the CUES.

To study the behaviour of the variables involving the CUES (nitric acid concentration, hydrochloric acid concentration, sonication time, leaching temperature, flow rate of the CUES and leaching volume), a factorial Plackett-Burman $2^6 \times 3/16$ type III resolution design allowing 5 degrees of freedom plus one centre point was built. The lower and upper values assigned to each variable were chosen from the available data and experience from previous experiments (table 1). This experimental design involves 13 non-randomised runs. To test the statistical significance of the effects, an ANOVA (from Statgraphic V. 4.1) was used. This factorial design has been applied to a certified reference material (10 mg, TORT-1). To optimize the CUES, copper and iron were measured on-line in the leachate by FAAS with a flow system similar to that depicted in figure 1. The variable response was %Cu and %Fe recovery. The numerical analysis of the results produced the standardized main effects Pareto Chart (figure 2). In this chart, the bar lengths are proportional to the absolute value of the estimated effects, to help compare their relative importance. The conclusion

Table 1. Factor levels in the Plackett Burman factorial designs and their optimum values for copper and iron determination.

Factor	Key	Low	High	Optimum for copper determination	Optimum for iron determination
HNO ₃ concentration (M)	A	0	3	3	3
HCl concentration (M)	B	0	3	0	0
Sonication time (min)	C	0.5	5	1	3
Leaching temperature (°C)	D	20	70	20	20
Flow rate of the CUES (mL/min)	E	3.5	6	6	6
Leaching solution volume (mL)	F	1	3	1	1

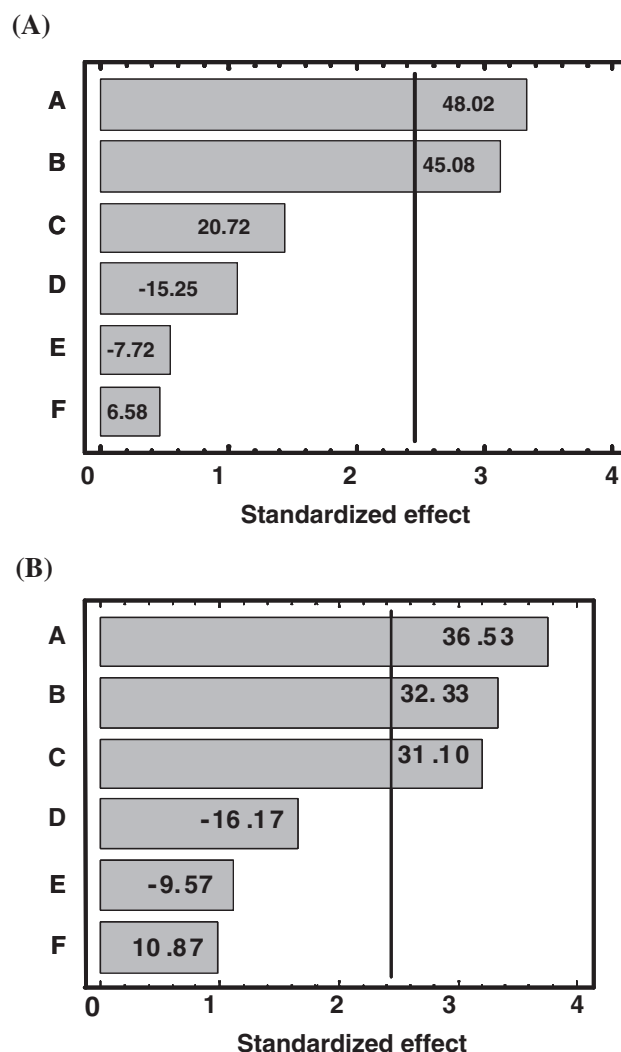


Figure 2. Standardized Pareto charts for the Plackett Burman design $2^6 \times 3/16$ for the continuous ultrasonic acid extraction of (A) copper and (B) iron from seafood samples. The vertical line indicates the statistical significance ($P=95\%$) bound for the effects.

from the copper extraction screening study is that the concentrations of nitric and hydrochloric acids are influential positive factors between the ranges studied because these factors overtake the limit of statistical significance (95%). With regard to the non-significant variables, sonication time and leaching volume present, a positive estimated effect and leaching temperature and flow rate of the CUES have a negative effect. The iron-extraction screening study reflected three factors of statistical significance (concentration of nitric and hydrochloric acids, and sonication time with a positive estimated effect). A non-significant variable, such as leaching volume, presents a positive estimated effect, while leaching temperature and flow rate of the CUES have a negative effect. Since the Plackett-Burman design only provides the tendencies

to the optimum, the variables were fine-tuned outside the framework of the design. In the case of concentrated acids (leaching solution), the aim was to decrease these concentrations because high acid concentrations can produce serious damage in the spectrometer nebulizer of FAAS. In this sense, several experiments were carried out, demonstrating that a nitric acid concentration of 3 M (without hydrochloric acid) as leaching solution was sufficient to obtain quantitative copper and iron recoveries (99.3% and 96.1%, respectively). With regard to the flow rate of the CUES and sonication time, they were also fine-tuned outside the framework of the design to achieve the highest sampling frequency for each determination. In this way, the sonication time was studied at a flow rate of 3.5 and 6.0 mL/min for both trace metals. It was observed that the minimum sonication time to obtain a quantitative recovery was 1 min for copper and 3 min for iron at a flow rate of 6 mL/min. Thus, these values were chosen as an optimum for these variables. Quantitative recoveries from leaching processes were achieved at room temperature; in addition, this optimum value simplified the FI system because there was no need for temperature control. It is important diminish the value of the leaching volume to increase the sensitivity of the method. The experimental results showed that 1.0 mL of leaching solution is sufficient to extract quantitatively the copper and the iron present in the sample.

There are two additional variables that can affect the acid-extraction process: seafood particle size and sample amount. These variables were studied using the optimum conditions established for the CUES. The sample particle size was studied using a size smaller than 30 μm and between 30 and 100 μm . The results obtained showed that this variable does not affect the extraction process, which can be explained as a result of the high energy supplied by the ultrasound energy (frequency of 40 kHz) that increases the contact between the sample and the leaching solution. In terms of the amount of sample, it was found that sample amounts greater than 30 mg generated pressures inside the CUES. Other flow parameters involving copper and iron determination were also optimized. The mixing coil length was fixed to 200 cm (equivalent to 1 mL); a shorter length does not lead to total homogenization of the extract, and a longer length increases the analysis time too much, thus reducing the sampling frequency. The carrier flow rate and injected volume were also studied. The carrier flow rate was studied between 3.0 and 6.0 mL/min. The aspiration flow rate of the nebulizer was adjusted to be the same as the flow rate of the carrier solution. Although the higher aspiration flow rate provided a better sensitivity, at the same time a higher degree of dispersion took place because the carrier flow rate was increasing. To obtain the minimum dispersion in the flow system, the optimum carrier flow rate was 3.5 mL/min (dispersion equal to 1.1). In relation to the injected acid extract volume, 250 μL was chosen as the optimum because this volume allowed two acid-extract injections for each sample, thus confirming its homogeneity.

4. Analytical figures of merit

The calibration graphs ($n = 8$) were run under the optimal chemical and flow conditions for the whole process. The equations for copper and iron were, respectively, absorbance = $6.7 \times 10^{-4} + 0.046 [\text{Cu}]$ ($[\text{Cu}] = 0\text{--}5 \mu\text{g/mL}$) and absorbance = $4.8 \times 10^{-4} + 0.030 [\text{Fe}]$ ($[\text{Fe}] = 0\text{--}5 \mu\text{g/mL}$).

Analytical procedures were verified by the analysis of a standard reference material (10 mg of TORT-1, lobster hepatopancreas marine). The Cu and Fe concentrations obtained (mean $\pm$ SD, $n = 3$) were $438.7 \pm 1.3 \mu\text{g/g}$ and $186.6 \pm 1.9 \mu\text{g/g}$, respectively, which agrees with the certified values.

The precisions of the continuous analytical method obtained for real samples were checked using a sample containing $13.6 \pm 0.7 \mu\text{g/g}$ of Cu and $217.3 \pm 1.1 \mu\text{g/g}$ of Fe (dry mass). The results expressed as relative standard deviation were 1.6% and 0.3% ($n = 11$) for Cu and Fe, respectively. The limits of detection (LOD) based on three times the standard deviation of the blank ($n = 30$) were $0.3 \mu\text{g/g}$ for copper and $0.6 \mu\text{g/g}$ for iron (dry mass) for 30 mg of sample. The sample throughputs, taking into account the whole process, were 46 and 18 samples per hour for copper and iron determination, respectively.

5. Analysis of samples

The method was used to determine copper and iron in several seafood samples (table 2). The results obtained by the proposed method were compared with those achieved by a conventional off-line sample digestion method using concentrated nitric acid with subsequent copper and iron determination by FAAS. The paired t -test [18] was used to compare the results obtained by both methods; it was concluded that neither method gives significantly different values for the copper and iron concentration, and thus, the agreement between the two methods is satisfactory. The results obtained were also analysed by hierarchical cluster analysis. This analysis was used, searching

Table 2. Determination of Cu and Fe in seafoods and paired t -test (mean $\pm$ S.D., $n = 3$).

Sample	Cu ($\mu\text{g/g}$ dry mass)		Fe ($\mu\text{g/g}$ dry mass)	
	Reference method ^a	Present method	Reference method ^a	Present method
Mussel 1	13.6 ± 0.7	13.8 ± 0.5	255.9 ± 1.9	255.1 ± 1.0
Mussel 2	12.9 ± 0.7	12.8 ± 0.5	257.8 ± 1.9	256.2 ± 1.0
Mussel 3	13.4 ± 0.4	13.1 ± 0.5	218.5 ± 1.1	217.0 ± 1.0
Mussel 4	10.9 ± 0.7	11.3 ± 0.5	221.1 ± 1.1	221.2 ± 1.0
Mussel 5	13.2 ± 0.4	13.1 ± 0.5	227.4 ± 1.9	227.7 ± 1.0
Mussel 6	11.2 ± 0.4	11.6 ± 0.0	242.6 ± 1.9	240.2 ± 1.0
Mussel 7	16.2 ± 0.7	16.0 ± 0.5	254.6 ± 1.1	255.6 ± 0.0
Mussel 8	18.2 ± 0.7	18.8 ± 0.5	246.4 ± 1.9	246.1 ± 1.0
Mussel 9	13.6 ± 0.7	13.1 ± 0.5	229.3 ± 1.9	229.5 ± 1.0
Mussel 10	14.0 ± 0.4	14.4 ± 0.0	248.3 ± 1.9	248.5 ± 0.0
Tune	10.9 ± 0.7	11.3 ± 0.5	64.2 ± 1.9	65.7 ± 1.0
Sardine	12.3 ± 0.7	12.2 ± 0.5	94.0 ± 1.1	94.7 ± 1.0
Hake	5.9 ± 0.4	5.9 ± 0.0	51.6 ± 1.1	51.4 ± 1.0
Crab	6.3 ± 0.7	6.3 ± 0.5	37.0 ± 1.1	37.2 ± 1.0
Prawn	9.0 ± 0.7	9.4 ± 0.5	144.6 ± 1.1	144.0 ± 1.0
Razor-shell	7.0 ± 0.7	6.9 ± 0.0	59.8 ± 1.1	59.7 ± 0.0
Scallops	10.3 ± 0.7	10.3 ± 0.5	136.3 ± 1.9	136.9 ± 1.0
Cockle	8.3 ± 0.7	8.4 ± 0.5	115.5 ± 1.9	116.1 ± 1.0
Clam 1	10.9 ± 0.7	10.9 ± 0.5	219.8 ± 1.9	220.0 ± 0.0
Clam 2	12.9 ± 0.7	13.1 ± 0.5	211.6 ± 2.9	212.3 ± 1.0

^aOff-line acid digestion and FAAS determination. Critical value of $t = 2.09$. For Cu: X (mean difference): -8.300×10^{-2} ; S.D.: 0.263; $n = 20$; $t = 1.41$. For Fe: X (mean difference): -2.350×10^{-2} ; S.D.: 0.907; $n = 20$; $t = 0.12$.

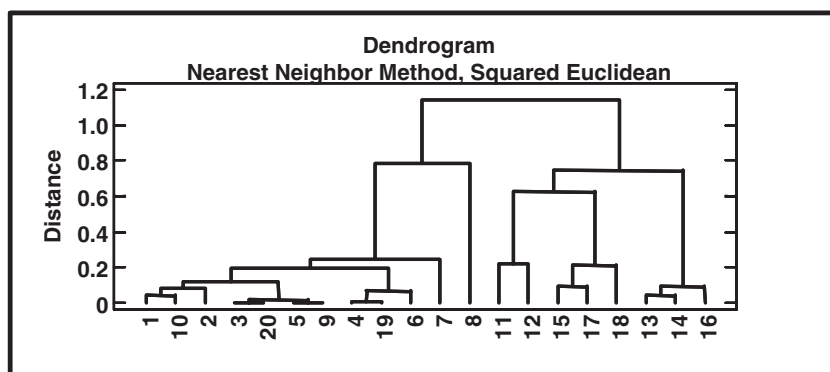


Figure 3. Dendrogram showing the results of a hierarchical cluster analysis according to Cu and Fe concentrations in seafood samples.

natural groupings among the samples looking for one preliminary way to study the data structure. Cluster analysis describes the similarity between seafood samples in terms of their copper and iron concentrations. In this case, a matrix consisting of the squared Euclidean distance was used as a similarity matrix. A hierarchical agglomerative method (Ward's method) was used to obtain clusters by using the statistical software packaging Statgraphic v. 4.1. As described by Meloun *et al.* [19], this procedure takes into account in each step the heterogeneity of the deviation (the sum of the squares of the distance of an object from the varycentre of the cluster). The results obtained showed that Cu and Fe concentrations contain useful information for the category classification of the seafood samples. Seafoods can be classified into two main clusters (figure 3). The first consists of mussels and clams. The seafoods that contain the highest Cu and Fe concentrations form this cluster. The other cluster is found in samples, which show lower Cu and Fe concentrations. This cluster shows three different subclusters in decreasing order of Cu and Fe concentrations: one found in tuna and sardine, one found in prawn, scallop and cockle, and one found in hake, crab and razor-shell.

Acknowledgements

The authors are grateful for the financial support provided by the Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Ministerio de Ciencia y Tecnología (Project no. CAL01-043). A.M.C.B. acknowledges a grant from the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, Ap 2001-0367.

References

- [1] E. Merian, *Metals and their Compounds in the Environment*, pp. 221–231, VCH, Weinheim (1991).
- [2] R.W. Furness, P. S. Rainbow, *Heavy Metals in the Marine Environment*, p. 82, CRC Press, Boca Raton, FL (1990).
- [3] M.C. Yebra, M.F. Enríquez, A. García, A. Moreno-Cid, *At. Spectrosc.*, **21**, 225–228 (2000).
- [4] M. Liva, R. Muñoz-Olivas, C. Cámara, *Talanta*, **51**, 381–387 (2000).
- [5] F.M. Fernández, M.B. Tudiño, O.E. Troccoli, *J. Anal. At. Spectrom.*, **15**, 687–695 (2000).

- [6] J. Wang, E. H. Hansen, *J. Anal. At. Spectrom.*, **17**, 248–252 (2002a).
- [7] J. Wang, E. H. Hansen, *J. Anal. At. Spectrom.*, **17**, 1284–1289 (2002b).
- [8] J.L. Burguera, M. Burguera, C. Rondón, *Talanta*, **58**, 1167–1175 (2002).
- [9] M.A.Z. Arruda, M. Gallego, M. Valcárcel, *Quim. Anal.*, **14**, 17–26 (1995).
- [10] Z. Zhi, A. Ríos, M. Valcárcel, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **26**, 239–260 (1996).
- [11] J.L. Burguera, M. Burguera, *Anal. Chim. Acta*, **366**, 63–80 (1998).
- [12] E.R. Pereira, J.J.R. Rohwedder, M.A.Z. Arruda, *Analyst*, **123**, 1023–1028 (1998).
- [13] E.C. Lima, F. Barbosa, F.J. Krug, M. Silva, M.R.G. Val, *J. Anal. At. Spectrom.*, **15**, 995–1000 (2000).
- [14] H. El Azouzi, M.L. Cervera, M. de la Guardia, *J. Anal. At. Spectrom.*, **13**, 533–538 (1998).
- [15] K. Ashley, R.N. Andrews, L. Cavazos, M. Demange, *J. Anal. At. Spectrom.*, **16**, 1147–1153 (2001).
- [16] M.C. Yebra, A. Moreno-Cid, *Anal. Chim. Acta*, **477**, 149–155 (2003).
- [17] M.C. Yebra, A. Moreno-Cid, R.M. Cespón, S. Cancela, *At. Spectrosc.*, **24**, 31–36 (2003).
- [18] J.C. Miller, J.N. Miller, *Statistics for Analytical Chemistry*, Ellis Horwood, Chichester, UK, (1984).
- [19] M. Meloun, M. Milittky, M. Forina, *Chemometric for Analytical Chemistry*, Ellis Horwood, Chichester, UK (1992).

Artículo IX

**FAST ON-LINE ULTRASOUND-ASSISTED EXTRACTION
COUPLED TO A FLOW INJECTION-ATOMIC ABSORPTION
SPECTROMETRIC SYSTEM FOR ZINC DETERMINATION IN
MEAT SAMPLES**

M.C. Yebra, A. Moreno-Cid & S. Cancela

Talanta (2005). Aceptado.



IX



Fast on-line ultrasound-assisted extraction coupled to a flow injection-atomic absorption spectrometric system for zinc determination in meat samples

M.C. Yebra-Biurrun*, A. Moreno-Cid, S. Cancela-Pérez

Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Bromatology, Faculty of Chemistry, University of Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain

Received 14 July 2004; received in revised form 29 October 2004; accepted 1 December 2004

Abstract

A continuous ultrasound-assisted extraction system connected to a flow injection manifold has been used for the on-line determination of zinc in meat samples by flame atomic absorption spectrometry. An experimental design was used for the optimisation of the continuous manifold. This flow injection methodology allowed a sampling frequency of ca. 80 samples per hour with a relative standard deviation for the whole procedure of 0.3% (for a sample containing $163.6 \mu\text{g g}^{-1}$ Zn). The detection limit was $0.6 \mu\text{g g}^{-1}$ for a sample amount of 5 mg. Accurate results were obtained by measuring certified reference materials (BCR-186 (pig kidney) and BCR-184 (bovine muscle)). The analytical procedure was applied to different real meat samples with satisfactory results.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Continuous ultrasound-assisted extraction system; Flame atomic absorption spectrometry; Zinc determination; Meat samples

1. Introduction

Zinc is an essential trace metal for human beings. Disorders of zinc metabolism are usually due to a deficiency rather than a surplus of this metal [1]. Hence, the determination of zinc in meat samples is an important aspect of food analysis. Nevertheless, meat samples are solid complex matrices that involve an arduous task when sample preparation is accomplished. Nowadays, the solid sample preparation is one of the target goals of present analytical chemistry. This analytical step tends to be labour-intensive and incompatible with the highly developed and automated instrumentation and data treatment that are used in the second and third stages of the analytical process, respectively. Most solid sample pretreatments procedures are still performed manually, which makes them slow, complex, and labour-intensive, being the source of analytical errors and contamination problems [2]. In this

sense, several strategies have been proposed to achieve easier, faster and automated solid sample preparation, which include fusion [3,4], heating block digestion [5,6], microwave assisted digestion [7,8], acid or alkaline leaching [9,10] and slurry sampling [11–13].

Flow injection (FI) techniques have demonstrated to be a very useful tool for solid sample pretreatment automation. These methodologies have a simple foundation, simple and comfortable handling, great capacity to achieve accurate and precise results, and very high sample throughput [14]. In this way, the incorporation of a microwave oven into a FI manifold offers many advantages over its off-line counterpart: it enables completely automated operations, reduces extensive time delay between sample delivery and analysis, easy digestion of complex matrices, a safety increase for the analyst and a decrease in the losses of volatile analytes [15–20]. However, these advantages are accompanied by some drawbacks such as matrix interferences (the sample matrix is introduced into the detector) and the need of incorporating a cooling area into the FI system due to the high temperature achieved into the

* Corresponding author. Tel.: +34 981563100; fax: +34 981595012.
E-mail address: qncayebi@usc.es (M.C. Yebra-Biurrun).

oven. Ultrasound-assisted extraction can also be coupled to a FI manifold. Using this energy the direct leaching of a solid sample can be accomplished by using a closed loop including a sample container. This sample container is immersed in a thermostated water bath, and ultrasonic irradiation and heating are used for accelerating the extraction of analyte(s) from the sample. FI-ultrasound-assisted extraction methodology presents several advantages over its off-line counterpart, like as a shorter sonication time (reduced by factors of 6–12) and the centrifugation step to separate the liquid phase (10–20 min) is avoided. Therefore, the simplification of the analytical process is considerable. These advantages were experimented when our investigation team proposed a continuous ultrasound-assisted extraction system (CUES) incorporated to an on-line flow injection manifold for the determination of trace metals in seafood samples [21–24]. The CUES combines the benefits of ultrasound-assisted extraction and those achieved by FI systems. In this paper the CUES is coupled to an on-line flow injection manifold and this FI system was optimised for zinc determination in complex solid matrices such as meat samples.

2. Experimental

2.1. Instrumentation

The overall manifold, as can be seen in Fig. 1, comprised two parts: (a) the continuous ultrasound extraction system (CUES), which accomplishes the sample lixiviation and (b) FI-FAAS continuous monitoring of zinc. The CUES is composed of a Gilson Minipuls-3 peristaltic pump fitted with PTFE tubes (P1), an ultrasonic bath (UB) (Selecta), a glass minicolumn (M) (50 mm $\times$ 3 mm i.d., bed volume 350 μ l) (Omnifit) used as sample container (the ends of the minicolumn were plugged with filter paper) and two Reodyne (models 5041 and 5020) low pressure valves (SV1 and SV2). The

on-line zinc monitoring was performed by a manifold that comprises a Gilson Minipuls-3 peristaltic pump (P2) fitted with PTFE tubes and two Reodyne (model 5020 and 5301) injection or switching valves (IV and SV3, respectively). PTFE tubes (0.8 mm i.d.) were employed to connect the FI manifold to a Perkin-Elmer 5000 atomic absorption spectrometer with a deuterium background correction (FAAS). This analytical instrument was furnished with a zinc hollow-cathode lamp and it was set at 213.9 nm. A standard air/acetylene flame was used. The spectrometer output was connected to a Perkin-Elmer 50 servograph recorder with a range of 5 mV. The signals measured were the heights of the absorbance peaks. Numerical analysis of experimental designs were performed by means of the STATGRAPHICS V.4.1 statistical package (Manugistic, Inc., Rockville, MD, USA, 1997) [25].

2.2. Material, reagents and solutions

Ultrapure water of 18.2 M Ω cm resistivity obtained from a Milli-Q water purification system (Millipore) was used for the preparation of samples, reagents and standards. The glassware used was cleaned in 4 M HNO₃ for 4 days and rinsed with ultrapure water before use. Hydrochloric acid, nitric acid and zinc standard were of reagent grade (Merck). The zinc stock solution was prepared by dilution of the zinc standard, which contains 1000 mg l⁻¹ of zinc. Thus, a solution containing 10 μ g ml⁻¹ of zinc was obtained. Working solutions containing zinc in the range 0–1 mg l⁻¹ were prepared by a suitable dilution of the stock solution.

2.3. Reference materials

Two kinds of samples were used to validate the method proposed: BCR-186 (pig kidney) with certified concentration of $128 \pm 3 \mu\text{g g}^{-1}$ Zn and BCR-184 (bovine muscle) with certified concentration of $166 \pm 3 \mu\text{g g}^{-1}$ Zn (Community Bureau of Reference, Belgium).

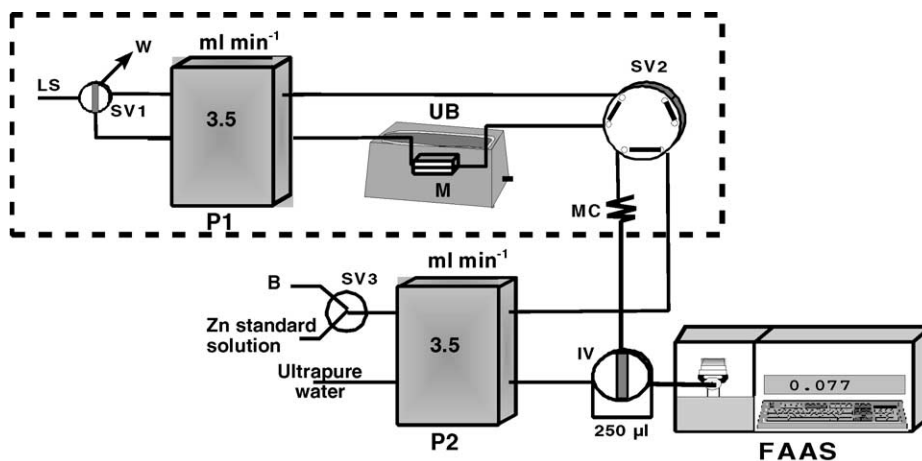


Fig. 1. Schematic diagram of the CUES and optimum working conditions for the on-line Zn determination: (I) on-line acid leaching step; (II) on-line Zn monitoring. P1 and P2, peristaltic pumps; UB, ultrasonic bath; LS, leaching solution; M, minicolumn; IV, injection valve; SV1, SV2 and SV3, switching valves; MC, mixing coil; W, waste; B, blank; FAAS, flame atomic absorption spectrometer.

2.4. Sample preparation

Meat samples were purchased in local markets. These samples were triturated, homogenised, freeze-dried, and then kept in clean, dry containers. After sieving, fractions with particle size under 100 μm were taken.

2.5. Procedure for zinc determination in meat samples

The continuous zinc determination system is shown in Fig. 1. Meat samples 5 mg, are directly weighted into a glass minicolumn, and in order to avoid sample losses into the CUES circuit, its ends are plugged with filter paper (Whatman 541). Then, the minicolumn is connected to the CUES. First, 1 ml of leaching solution (LS; 0.75 M nitric acid or 0.75 M hydrochloric acid) is aspirated and directed into the CUES circuit. Then, the SV1 is switched to its other position to close the CUES circuit. The leaching solution is circulated at 3.5 ml min^{-1} through the minicolumn during 0.5 min under the action of ultrasound energy. Elapsed this time, the SV2 is switched to its other position and the acid extract circulates towards the mixing coil (MC; total length 2 m) in order to be homogenised. A volume of 250 μl of this acid extract is injected by means of a IV into an ultrapure water carrier stream that transport it to the detector for on-line Zn monitoring. While the sample measurement is accomplished, the CUES circuit is washed with ultrapure water in order to avoid carry-over and a new minicolumn is inserted in the leaching circuit for the next analysis. Standard solutions containing between 0 and 1 mg l^{-1} of zinc, in the same acid medium as leaching solution, are injected into an ultrapure water carrier stream by mean of IV.

The samples were also analysed by a conventional off-line sample digestion method using a concentrated acid: an amount of 0.5 g of sample was mixed with nitric acid in a glass beaker and heated on a hot-plate until complete sample dissolution. Once cool, the solution was transferred into a 100 ml calibrated flask and made up to volume with ultrapure water with subsequent zinc determination by FAAS.

3. Results and discussion

3.1. Optimisation of the variables involving the CUES

The optimisation of the whole proposed procedure was focussed to the continuous ultrasound-assisted extraction step. The detection step was optimised taken into account the optimum values founded for the CUES. Therefore, the variables studied to start with the optimisation process are those involving the CUES (nitric acid concentration, hydrochloric acid concentration, sonication time, leaching temperature, flow-rate of the CUES and leaching solution volume). In order to study the behaviour of these variables, a factorial Plackett-Burman $2^6 \times 3/16$ type III resolution design involving 12 runs plus one center point was built. This factorial design has

Table 1

Factor levels in the Plackett-Burman factorial design and their optimum values

Factor	Key	Low	High	Optimum
HNO_3 concentration (M)	A	0	3	0.75 or 0 ^a
HCl concentration (M)	B	0	3	0 or 0.75 ^a
Sonication time (min)	C	0.5	5	0.5
Leaching temperature ($^{\circ}\text{C}$)	D	20	70	20
Flow-rate of the CUES (ml min^{-1})	E	3.5	6	3.5
Leaching solution volume (ml)	F	1	3	1

^a The optimum leaching solution is $[\text{HNO}_3] = 0.75 \text{ M}$ or $[\text{HCl}] = 0.75 \text{ M}$.

been applied on 5 mg of a reference material (BCR-184) with a zinc content of $166 \pm 3 \mu\text{g g}^{-1}$. To optimise the CUES, zinc was measured on-line in the leachate by FAAS with a flow system similar to that depicted in Fig. 1. Table 1 shows the lower and upper levels for each studied variable. These values were chosen from available data and experiences developed in previous experiments. The variable response was % Zn extraction efficiency. The numerical analysis of the results produced the standardized main effects Pareto Chart (Fig. 2). The conclusions of this screening study are that concentration of nitric and hydrochloric acids are influential factors because these factors overtake the limit of statistical significance (95%). Both significative factors have a positive influence, this means that for the levels tested, an increase of these factors would provide a better efficiency in the zinc extraction. Sonication time and leaching volume are affected by a positive estimated effect, but they are not statistically influential factors for the levels tested. With regard to the leaching temperature and flow-rate of the CUES are also not statistically influential factors, but in this case they are affected by a negative estimated effect.

Since the Plackett-Burman design only provides the tendencies to the optimum of the variables, these factors were fine tuning outside the framework of the design. Although the concentrated acids (leaching solution) are statistically influential factors, the goal to achieve was decreased by these concentrations because high acid concentrations can produce serious damages in the spectrometer nebuliser of FAAS. In

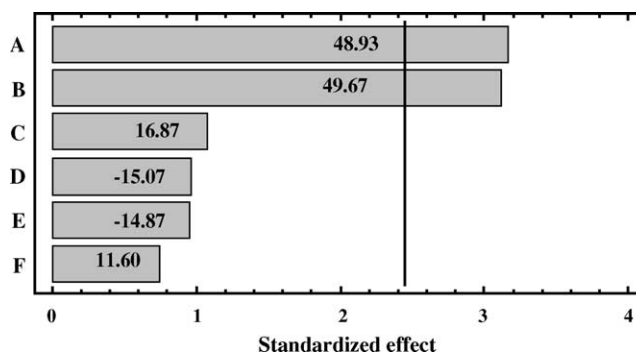


Fig. 2. Standardized Pareto chart for the Plackett-Burman design ($2^6 \times 3/16$) for the continuous ultrasonic acid extraction of zinc from meat samples. The vertical line indicates the statistical significance ($P=95\%$) bound for the effects.

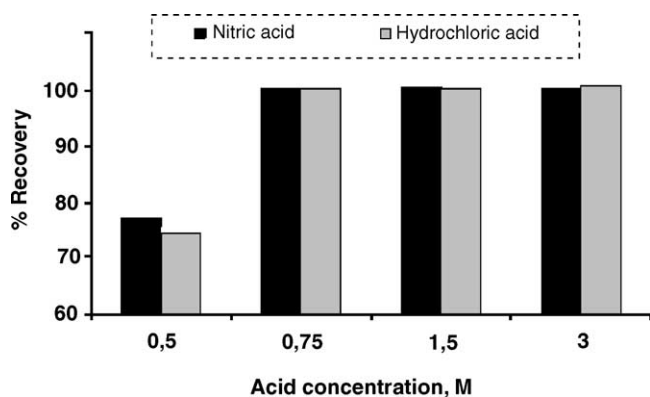


Fig. 3. Optimisation outside the framework of the design of the acids concentration as leaching solution.

this sense, several experiments were carried out to study the optimum acids concentration (Fig. 3). These experiments showed that a nitric acid concentration of 0.75 M (without hydrochloric acid) or hydrochloric acid concentration 0.75 M (without nitric acid) as leaching solutions were enough to obtain a quantitative extraction efficiency for Zn (100.2 and 100.1%, respectively). Nevertheless, a lower acid concentration (0.5 M) produced a no quantitative extraction efficiency (77.4 and 74.7%, respectively). With regard to sonication time and leaching solution volume, with the aim of achieve higher sampling frequency and more sensitive results, was developed a study (outside the framework of the design) to diminish the values of these variables. In this study, it was observed that 0.5 min of sonication time and 1 ml of leaching solution provided quantitative recoveries (100.6 and 100.3%, respectively). In the case of the no significative factors leaching temperature and flow-rate of the CUES, they were not fine tuning because the optimum values proposed by the design (20 °C and 3.5 ml min⁻¹) simplifies the manifold, because a temperature control was not necessary. Given these findings, we decided to work with the operational conditions of the CUES given in Table 1 under the optimum values heading.

Another variable that can affect the acid extraction process is the sample particle size. This variable was studied by using the optimum conditions of the CUES. Thus, particle sizes smaller than 30 µm and between 30–100 µm were tested. The results obtained indicated that this variable does not affect the extraction process, which can be explained as result of the high energy supplied by the ultrasounds (frequency of 40 kHz), which increases the contact between the sample and the leaching solution. The variable sample amount was not studied due to the high zinc concentration founded in the samples. Sample amounts higher than 5 mg provided absorbance signals that overtake the lineal range for this metal in the FAAS detector.

Other flow parameters involving zinc determination were also optimised. The mixing coil length was fixed to 200 cm (equivalent to 1 ml of leachate), because shorter lengths would not achieve the total homogenisation of the extract and a longer lengths would increase too much the time of analysis,

diminishing in this way the sampling frequency. The carrier flow-rate was studied between 3 and 6 ml min⁻¹ and the injected volume of the acid extract between 100 and 400 µl. The aspiration flow-rate of the nebuliser was adjusted to be the same as the flow-rate of the carrier solution. Although the highest aspiration flow-rate provides better sensitivity, at the same time a higher dispersion takes place because the carrier flow-rate is increasing. Therefore, a carrier flow-rate of 3.5 ml min⁻¹ (dispersion coefficient equal to 1.1) was chosen as a compromise to obtain the minimum dispersion in the flow system. With regard to the injected volume it was verified that, as it is logical, when the volume was increased the sensitivity was increased. Therefore, a volume of 250 µl was chosen, which, in addition, allows making at least two injections of each acid extract verifying its homogeneity.

3.2. Analytical figures of merit

The calibration graph of the method was run ($n=8$) under the optimal chemical and flow conditions for the whole process. The equation was: absorbance = $5.24 \times 10^{-4} + 0.21$ [Zn] ($r=0.999$; [Zn] = 0–1 mg l⁻¹).

To evaluate the zinc determination for possible sample matrix interferences, a standard addition method was performed. In this way, a sample with a zinc content of $163.6 \pm 0.9 \mu\text{g g}^{-1}$ was spiked with several zinc standard solutions added to the leaching solution into the CUES (0–0.1 mg l⁻¹). In these conditions, an addition calibration graph was run ($n=7$) under the optimal chemical and flow conditions for the whole process, the equation was absorbance = $1.72 \times 10^{-1} + 0.21$ [Zn] ($r=0.999$), where [Zn] is zinc concentration, expressed as mg l⁻¹. This equation and the calibration graph present the same slope, demonstrating that Zn determination is free of matrix interferences. Therefore, one can make the calibration graph with Zn standard solutions to avoid the spiking process and so, speed up the analysis time.

The validation of the method was performed using 5 mg of two certified reference materials, BCR-186 (pig kidney) and BCR-184 (bovine muscle) with a Zn certified concentration of 128 ± 3 and $166 \pm 3 \mu\text{g g}^{-1}$, respectively. The Zn contents obtained (mean $\pm$ S.D., $n=3$) were 128.2 ± 0.6 and $166.4 \pm 0.6 \mu\text{g g}^{-1}$ for BCR-186 and BCR-184, respectively, which agrees with the certified values.

The precision of the continuous analytical method obtained for real samples was checked using a sample containing $163.6 \pm 0.9 \mu\text{g g}^{-1}$ Zn (rabbit liver) and the result expressed as relative standard deviation was 0.3% ($n=11$). The limit of detection (LOD) based on three times the standard deviation of the blank ($n=30$) was found to be $0.6 \mu\text{g g}^{-1}$ for 5 mg of sample. The sample throughput, taking into account the flow injection process, was ca. 80 samples per hour.

3.3. Analysis of real samples

The method was applied to the determination of zinc in several meat samples. In order to compare the results ob-

Table 2
Determination of zinc in meat samples and Paired *t*-test

Samples	Zn ($\mu\text{g g}^{-1}$ dry mass)		Difference	EF (%) ^a
	Off-line acid digestion and FAAS determination ^b	Present method ^b		
Lamb kidney	102.8 $\pm$ 0.9	103.0 $\pm$ 0.6	−0.2	100.3
Rabbit liver	163.6 $\pm$ 0.9	164.2 $\pm$ 0.6	−0.6	100.4
Chicken muscle	58.4 $\pm$ 1.79	58.8 $\pm$ 0.9	−0.4	100.5
Veal muscle	156.6 $\pm$ 0.9	156.5 $\pm$ 0.6	−0.1	99.9
Pig muscle	94.4 $\pm$ 1.3	94.1 $\pm$ 0.9	0.3	99.7
Lamb muscle	195.7 $\pm$ 0.9	195.7 $\pm$ 0.6	0	100.0
Turkey muscle	76.4 $\pm$ 1.3	76.9 $\pm$ 0.9	−0.5	100.7

X (mean difference): −0.2; S.D.: 0.3; *n* = 7; experimental value of *t* = 1.47; critical value of *t* (*P* = 0.05) = 2.45.

^a Extraction efficiency (%) = $[(\text{[Zn]continuous acid leaching})/(\text{[Zn] off-line acid digestion})] \times 100$.

^b Mean $\pm$ standard deviation (S.D.) (*n* = 3).

tained by the proposed method, these samples were also pre-treated by using a conventional off-line acid digestion, and their zinc concentrations were measured by FAAS. The results expressed as $\mu\text{g g}^{-1}$ Zn and their standard deviation (*n* = 3) obtained by these two methodologies are shown in the Table 2. To compare the results obtained by both methods, the Paired *t*-test (*P* = 0.05) [26] was applied and it concluded that both methods do not give significantly different values for the zinc concentration and thus, the agreement between the two methods is satisfactory.

Acknowledgements

The authors are grateful to the financial support provided by the Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Ministerio de Ciencia y Tecnología (Project no. CAL01-043). A.M.C.B. acknowledges a grant from the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, AP 2001-0367.

References

- [1] E. Merian, *Metals and their Compounds in the Environment*, VCH, Weinheim, 1991.
- [2] M.A.Z. Arruda, M. Gallego, M. Valcárcel, *Quim. Anal.* 14 (1995) 17.
- [3] E.A. Hernández Caraballo, J.R. Dominguez, J. Alvarado, *Atom. Spectrosc.* 21 (2000) 132.
- [4] X. Jin, H. Zhu, *J. Anal. Atom. Spectrom.* 15 (2000) 747.
- [5] U. Tinggi, W. Maher, *Microchem. J.* 33 (1986) 304.
- [6] K. Ndung'u, S. Hibdon, A.R. Flegal, *Talanta* 64 (2004) 258.
- [7] M.C. Yebra, M.F. Enriquez, *Analysis* 26 (1998) 261.
- [8] J.A. Nobrega, L.C. Trevizan, G.C.L. Araujo, A.R.A. Nogueira, *Spectrochim. Acta* 57B (2002) 1855.
- [9] H. El Azouzi, M.L. Cervera, M. de la Guardia, *J. Anal. Atom. Spectrom.* 13 (1998) 533.
- [10] K. Ashley, R.N. Andrews, L. Cavazos, M. Demange, *J. Anal. Atom. Spectrom.* 16 (2001) 1147.
- [11] A.V. Flores, C.A. Perez, M.A.Z. Arruda, *Talanta* 62 (2004) 619.
- [12] F. Laborda, M.P. Gorriz, J.M. Castillo, *Talanta* 64 (2004) 631.
- [13] D. Baralkiewicz, H. Gramowska, *Anal. Chim. Acta* 510 (2004) 249.
- [14] Z. Zhi, A. Ríos, M. Valcárcel, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 26 (1996) 239.
- [15] M. de la Guardia, V. Carbonell, A. Morales-Rubio, A. Salvador, *Talanta* 40 (1993) 1609.
- [16] M.A.Z. Arruda, M. Gallego, M. Valcarcel, *J. Anal. Atom. Spectrom.* 10 (1995) 501.
- [17] J.L. Burguera, M. Burguera, *Anal. Chim. Acta* 366 (1998) 63.
- [18] E.R. Pereira, J.J.R. Rohwedder, M.A.Z. Arruda, *Analyst* 123 (1998) 1023.
- [19] E.C. Lima, F. Barbosa, F.J. Krug, M. Silva, M.R.G. Val, *J. Anal. Atom. Spectrom.* 15 (2000) 995.
- [20] M.C.B. Quaresma, R.J. Cassella, M. de la Guardia, R.E. Santelli, *Talanta* 62 (2004) 807.
- [21] A. Moreno-Cid, M.C. Yebra, *Spectrochim. Acta* 57B (2002) 967.
- [22] M.C. Yebra, A. Moreno-Cid, *J. Anal. Atom. Spectrom.* 17 (2002) 1425.
- [23] M.C. Yebra, A. Moreno-Cid, *Anal. Chim. Acta* 477 (2003) 149.
- [24] M.C. Yebra, A. Moreno-Cid, R.M. Cespón, S. Cancela, *Atom. Spectrosc.* 24 (2003) 31.
- [25] STATGRAPHICS V.4.1 Statistical Package, Manugistic Inc., Rockville, MD, USA, 1997.
- [26] J.C. Miller, J.N. Miller, *Statistics for Analytical Chemistry*, Ellis Horwood, Chichester, 1984.

