

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 299 313**

21 Número de solicitud: 200502459

51 Int. Cl.:

**G01N 27/30** (2006.01)

**C25B 11/04** (2006.01)

**C01B 25/00** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **05.10.2005**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **16.05.2008**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**16.05.2008**

71 Solicitante/s: **Universitat Autònoma de Barcelona**  
**Area I+D - Edifici A**  
**Campus Universitari, s/n**  
**08193 Bellaterra, Barcelona, ES**  
**BRAZILIAN AGRICULTURAL RESEARCH**  
**CORPORATION**

72 Inventor/es: **Parra Godayol, Aleix;**  
**Ramón González, Meritxell;**  
**Alonso Chamarro, Julián;**  
**Lemos, Sherlan G.;**  
**Vieira, Edivan C. y**  
**Nogueira, Ana R. A.**

74 Agente: **No consta**

54 Título: **Procedimiento para la determinación simultánea de fósforo orgánico e inorgánico, dispositivo para su realización y aplicaciones.**

57 Resumen:

Procedimiento para la determinación simultánea de fósforo orgánico e inorgánico, dispositivo para su realización y aplicaciones.

Procedimiento para la determinación directa de fósforo orgánico en una muestra que comprende i) la extracción del fósforo contenido en la muestra; ii) la mezcla de una alícuota del extracto procedente de i) con una solución tampón, a un pH que varía entre 4 y 10; iii) la detección del fósforo orgánico de la solución obtenida en ii); y iv) el análisis de los resultados obtenidos en iii) mediante un sistema de análisis en flujo continuo con detección potenciométrica, donde la detección del fósforo se lleva a cabo mediante un electrodo metálico de cobalto. Asimismo, se contempla un procedimiento para la detección simultánea de fósforo orgánico e inorgánico basado en el empleo del electrodo de cobalto, y sus aplicaciones en medicina y agroalimentación.

ES 2 299 313 A1

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la determinación simultánea de fósforo orgánico e inorgánico, dispositivo para su realización y aplicaciones.

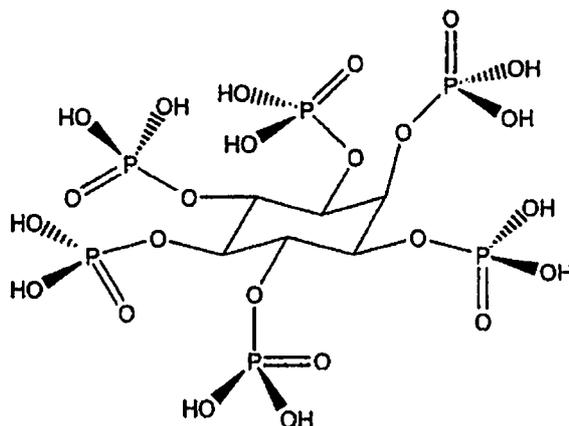
5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere, en sentido amplio, a un procedimiento para la detección de fósforo. Más concretamente, esta invención se refiere a un nuevo procedimiento directo para la determinación sencilla, rápida y exacta de inositol fosfatos, especialmente fitatos, en muestras médicas y agroalimentarias, basado en un sistema de análisis en flujo continuo con detección potenciométrica, que emplea un electrodo metálico de cobalto como detector de fitatos y fosfatos, lo que permite evaluar simultáneamente el contenido de fósforo orgánico ( $P_{org}$ ) e inorgánico ( $P_i$ ).

15 **Antecedentes de la invención**

El fósforo, elemento vital e insustituible en los organismos vivos, está ampliamente repartido y, normalmente, en baja concentración. Su deficiencia causa, en el caso de los vegetales, una reducción drástica del crecimiento y un retraso considerable en el proceso de maduración. Una reducción de la fertilidad, raquitismo y malformación de huesos y dientes, son algunas de las consecuencias observadas en animales. Por lo tanto, es importante aportar las cantidades necesarias de este elemento en los distintos ciclos biológicos.

El hexakisfosfato de mioinositol ( $Ins P_6$ ) (fósforo orgánico) es un éster fosfato de un alcohol cíclico derivado de glucosa (I). Mejor conocido como ácido fítico, se identificó por primera vez en 1855 y se caracteriza por incluir 12 protones reemplazables en su estructura. Por lo tanto, puede encontrarse en muchas formas diferentes que se denominan fitatos.



45 (I) Estructura del ácido fítico o 1,2,3,4,5,6 hexakis (dihidrogenfosfato) mioinositol

Los fitatos constituyen el 85% del fósforo total presente en cereales y legumbres. Estos compuestos tienen una influencia significativa sobre las propiedades funcionales y nutricionales del alimento y representan el almacenamiento primario del fósforo. Desempeñan un papel esencial en el proceso de germinación al contribuir a la viabilidad y vigor de las semillas (1-4).

Aunque el fitato representa la principal fuente de energía y fósforo, éste último no es asimilable por el estómago de la mayoría de los animales. Por tanto, se añade fósforo inorgánico, un mineral no renovable y caro, como suplemento en dietas para cerdos, aves de corral y peces para complementar sus requisitos nutricionales. Mientras tanto, el fitato fosfórico inutilizado, contenido en los excrementos animales, se está convirtiendo en un contaminante ambiental importante en zonas de ganadería intensiva. El excesivo contenido de fósforo en el suelo lixivia a lagos y al mar, conduciendo a la eutrofización y estimulando el crecimiento de organismos acuáticos capaces de producir neurotoxinas perjudiciales para los seres humanos (5).

Sin embargo, la manipulación de semillas y cosechas de grano para producir menores niveles de fitato podría tener efectos inaceptables sobre la producción agrícola, y especialmente en zonas geográficas en las que los suelos tienen una baja concentración de fósforo y/o escasa riqueza de micronutrientes (3). Además, el fitato es conocido como compuesto antinutriente debido a su capacidad quelante hacia varios cationes metálicos tales como  $Ca^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  y particularmente  $Zn^{2+}$ , modificando la biodisponibilidad nutricional de estos iones metálicos dietéticos (2).

El fitato se utiliza también en otros ámbitos como, por ejemplo, el industrial y el médico. Así, por ejemplo, se ha empleado en sistemas anticorrosión (24), sustituyendo a la cianina o al fosfato amónico. Debido a su mencionado

poder quelante, también se ha utilizado en procesos de prevención dental (26). Pero, cabe destacar el importantísimo papel del fitato en la prevención de cálculos renales, ya que actúa como inhibidor en los procesos de calcificación (11).

5 Se han descrito diferentes metodologías que detectan el contenido de fósforo inorgánico en una muestra. A este respecto, el documento de Xiao *et al.* (17) sugiere el empleo de la superficie oxidada de una matriz de cobalto como sensor potenciométrico para la detección selectiva de iones fosfato. Así, plantea un mecanismo selectivo basado en interacciones receptor-sustrato (“*Host-Guest*”) para explicar el mecanismo de respuesta del electrodo.

10 Posteriormente, en el documento de Ravi K. Meruva *et al.* (18) se encontró que el potencial de dicho electrodo dependía de parámetros tales como el pH, fuerza iónica ó tampones empleados.

Finalmente, el documento de Sten O. Engblom (27) emplea dicho electrodo para determinar el contenido de  $P_i$  en una muestra de suelo, observando una reducción de la respuesta debido a los restos de sustancias orgánicas presentes en la muestra.

15 Sin embargo, el análisis de fósforo orgánico, y en especial de fitatos, podría considerarse en cierto modo una tarea difícil debido a sus malas características espectrales y a la falta de reactivos específicos. Para resolver este problema, se han propuesto tanto procedimientos directos como indirectos basados en técnicas analíticas complejas. Los cedimientos directos incluyen CE-MS (6), cromatografía líquida de alta resolución (7, 8), espectroscopía de infrarrojo medio (9), espectroscopia de resonancia magnética nuclear de  $^{31}P$  (10) o espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP OES) (11).

20 El método de ICP-OES mide el fósforo total de las muestras, es decir, mayoritariamente la suma entre los fosfatos de inositol, esencialmente el fitato, y el fósforo inorgánico. Así, se crea, a partir de un estándar de fósforo y las correspondientes diluciones, una recta de calibrado donde se interpolan las muestras a analizar. El contenido de fósforo total se determina mediante un plasma con detección óptica.

30 Los procedimientos indirectos están basados principalmente en la hidrólisis enzimática de fitatos a mioinositol y fosfato, con la posterior determinación de estos iones mediante cromatografía de gases (12) y espectrometría UV-visible (13), respectivamente. En este último, se realiza la lectura de fósforo inorgánico presente en una alícuota de una muestra. Secuencialmente, se determina la concentración del  $P_i$  presente en otra alícuota, que se ha hidrolizado previamente a su paso por el reactor enzimático. Mediante la diferencia de intensidades entre señales se determina indirectamente la concentración de fitato.

35 Sin embargo, siguen siendo necesarios procedimientos sencillos, fiables, de bajo coste y que consuman menos tiempo para la determinación rutinaria de fitato en un amplio intervalo de aplicaciones.

40 Los presentes inventores, han descubierto que el electrodo de cobalto, además de ser sensible y selectivo al fósforo inorgánico, permite detectar, en condiciones específicas, especies de fósforo orgánico, especialmente fitatos.

45 A este respecto, y para ofrecer soluciones a los problemas planteados en el estado de la técnica, la presente invención proporciona un nuevo procedimiento directo para la determinación sencilla, rápida y exacta de fosfatos de inositol, especialmente fitato, en muestras tanto clínicas como agroalimentarias. Esta metodología está basada en un sistema de análisis en flujo continuo con detección potenciométrica que utiliza un electrodo de cobalto como sensor sensible al fosfato y fitato, que permite evaluar el contenido nutricional de fósforo, pudiendo determinar simultáneamente el fósforo orgánico (Porg) y el inorgánico ( $P_i$ ), en semillas y extractos acuosos de granos. Por otro lado, la detección exclusiva del fósforo orgánico permite la detección de especies fosforiladas, lo que supone un avance significativo en la monitorización médico-clínica.

50 La versatilidad del electrodo de cobalto permite el desarrollo de dispositivos más económicos que permiten llevar a cabo una determinación del fósforo más rápida gracias a la detección simultánea de los dos analitos.

### Breve descripción de las figuras

55 Figura 1. Construcción de un electrodo metálico de cobalto con configuración tubular.

Figura 2. Sistema de inyección en flujo con detección potenciométrica para la determinación de fósforo orgánico. T (tampón); L1 (bucle de muestra para la determinación de Porg); D (desecho); P (potenciómetro); R (registrador); BP (bomba peristáltica); ET (toma de tierra); EC (electrodo de cobalto); Ref (electrodo de referencia).

60 Figura 3. Sistema de inyección en flujo con detección potenciométrica para la determinación simultánea de fósforo orgánico e inorgánico. TA (hidrogenoftalato potásico); TB (Tris HCl); L1 (bucle de muestra para la determinación de  $P_i$ ); L2 (bucle de muestra para la determinación de Porg); D (desecho); P (potenciómetro); R (registrador); BP (bomba peristáltica); ET (toma de tierra); EC (electrodo de cobalto); Ref (electrodo de referencia).

65 Figura 4. Optimización del sistema de inyección en flujo para la determinación de  $P_i$  (a) Influencia del volumen de la muestra sobre la altura de pico e (b) influencia del caudal global sobre la altura de pico.

Figura 5. Optimización del sistema de inyección en flujo para la determinación de  $P_{org}$ . Efecto del pH del tampón sobre la altura de pico.

Figura 6. (a) Regresión lineal de  $P_i$  obtenida mediante la correlación de la altura de pico,  $\Delta E$ , frente al  $\log [H_2PO_4^-]$  y (b) diagrama obtenido con los patrones de 10 a 5000 ppm de  $H_2PO_4^-$ .

Figura 7. (a) Regresión lineal de  $P_{org}$  obtenida mediante la correlación de la altura de pico,  $\Delta E$ , frente al  $\log$  [fitato] y (b) diagrama obtenido con los patrones de 50 a 1000 ppm de fitato.

## Objeto de la invención

En primer lugar, la presente invención se refiere a un procedimiento para la determinación directa de fósforo orgánico en una muestra mediante detección potenciométrica utilizando como electrodo indicador un electrodo metálico de cobalto.

Asimismo, otro objeto de la invención se refiere al dispositivo para llevar a cabo dicho procedimiento.

Además, la presente invención tiene como objeto el uso de un electrodo metálico de cobalto para la determinación directa de fósforo orgánico según el mencionado procedimiento.

Otro objeto de la invención se refiere a un método para evaluar fitatos en fluidos biológicos a través de dicho procedimiento.

Por otra parte, es también objeto de esta invención proporcionar un procedimiento para la determinación directa y simultánea de fósforo orgánico e inorgánico en una muestra mediante detección potenciométrica empleando dos electrodos metálicos de cobalto sensibles a fósforo orgánico e inorgánico respectivamente.

Otro objeto de la invención se refiere a un dispositivo automático para llevar a cabo este procedimiento.

Finalmente, es objeto de la presente invención proporcionar un método de evaluación nutricional del fósforo, orgánico e inorgánico, en muestras agroalimentarias basado en dicho procedimiento.

## Descripción de la invención

La presente invención se basa en la versatilidad de la placa de cobalto metálico como detector de especies fosforiladas, lo que permite el desarrollo de un nuevo procedimiento para la determinación directa de fósforo orgánico, entendiéndose por fósforo orgánico tanto el fósforo constituyente de un compuesto orgánico como cualquier compuesto orgánico de fósforo tal como el AMP, ADP, etc.

Así, uno de los aspectos principales de la presente invención se refiere a un procedimiento para la determinación directa de fósforo orgánico en una muestra que comprende (i) extraer el fósforo contenido en la muestra; (ii) mezclar una alícuota del extracto obtenido en (i) con una solución tampón, a un pH que varía entre 4 y 10; (iii) llevar a cabo la detección del fósforo orgánico de la solución obtenida y, finalmente, (iv) analizar los resultados obtenidos en (iii), donde la detección del fósforo orgánico se lleva a cabo potencioméricamente utilizando como electrodo indicador un electrodo metálico de cobalto.

El electrodo metálico de cobalto empleado puede presentar diferentes configuraciones, pero en una realización preferida de la invención, el electrodo es tubular.

En aquellos casos en los que el nivel de concentración del fósforo orgánico de la muestra es inferior a la concentración mínima detectable por el electrodo de cobalto, se contempla la preconcentración del fósforo orgánico presente en la muestra. Esta situación se da básicamente en muestras procedentes de fluidos biológicos, como pueda ser la orina.

Así, opcionalmente, previamente a la etapa ii) se lleva a cabo la preconcentración del fósforo orgánico extraído en i). Esta preconcentración se realiza preferentemente mediante el uso de cartuchos de extracción en fase sólida de intercambio iónico.

En realizaciones preferidas de la invención, el fósforo orgánico detectado en iii) es un inositol fosfato, preferiblemente un fitato.

La molécula de fitato consta de un núcleo de inositol que contiene seis grupos fosfato que presentan doce protones capaces de ser liberados. Seis de estos protones tienen valores de pKa muy débiles (1,1 a 2,1) y están completamente disociadas en solución; dos protones muestran un valor de pKa relativamente ácido, con valores de pKa de 5,7 y 6,9; en cambio, los otros cuatro son difícilmente disociables (7,6 a 12,0).

En realizaciones preferidas de la invención, el tampón empleado en ii) es un compuesto que presenta pKas con valores que varían entre 4 y 10.

Por otra parte, los autores de la presente invención han observado que es posible llevar a cabo el procedimiento para la determinación del fósforo orgánico descrito a diferentes valores de pH. Sin embargo, la señal óptima (mayor valor de sensibilidad y mejor reproducibilidad) se obtiene a pH 8. A pH inferiores, la sensibilidad mostrada es menor, mientras que a pH superiores no se observa una mejora sustancial de la misma, sí en cambio una disminución de la reproducibilidad. Así, dado que a pH 8 la relación sensibilidad/reproducibilidad es óptima y que la influencia del hidrogenofosfato es despreciable, en realizaciones preferidas de la invención el pH final de la mezcla obtenida en la etapa ii) se realiza a pH 8.

Por otra parte, y dado el carácter quelante de los fosfatos de inositol, es determinante el tampón empleado en este procedimiento ya que la composición química de los mismos afecta a la respuesta del electrodo.

Así, en realizaciones preferidas de la invención, el tampón empleado es un compuesto que incluye grupos amina, pudiendo tratarse de una amina primaria, secundaria o terciaria, ya que la formación del complejo fitato-amina reduce la carga neta del fitato y aumenta la sensibilidad del electrodo.

Concretamente, en una realización particular de la invención el tampón empleado es Tris-HCl con una concentración que puede variar entre  $1$  y  $10^{-5}$  mol/l, preferiblemente  $10^{-2}$  mol/l.

En una realización preferida de la invención, el análisis (iv) de los resultados obtenidos por el electrodo se lleva a cabo mediante un sistema de análisis en flujo continuo con detección potenciométrica.

Otro aspecto de la invención se refiere al dispositivo para llevar a cabo el procedimiento descrito.

En concreto, en una realización preferida de la invención, el dispositivo se basa en un sistema de inyección en flujo con detección potenciométrica (figura 2). Este sistema puede comprender una bomba peristáltica (BP) para la propulsión (o aspiración) de las soluciones de agua, tampón y muestra. Las dos primeras son impulsadas a través de dos canales diferentes hasta un punto de confluencia donde ambos se unen produciéndose una mezcla homogénea de las disoluciones que posteriormente son dirigidas por un canal único hacia el sistema de detección. Antes del punto de confluencia y en el canal de agua se insiere una válvula con un bucle de inyección (L2) que permite insertar periódicamente volúmenes prefijados de muestra y dirigir ésta hacia el detector para determinar el fósforo orgánico. El sistema de detección consta de un potenciómetro (P); un electrodo basado en una placa metálica de cobalto (EC); un electrodo de referencia (Ref) y un registrador (R). Opcionalmente, se puede acoplar una toma de tierra (ET) antes del detector para minimizar la posible corriente no faradaica procedente del suministro eléctrico y los efectos estáticos generados por la fricción entre los tubos de propulsión y los trocoides de la bomba peristáltica. Este sistema permite, dependiendo de las variables de trabajo, obtener intervalos y características que se ajustan a las necesidades experimentales.

En realizaciones particulares de la invención, el volumen de la alícuota de muestra empleada puede variar entre  $10$ - $12.000$   $\mu$ l y los caudales de las corrientes de agua y tampón bombeados pueden estar comprendidos entre  $0,2$ - $10$  ml/min. De esta manera, el procedimiento descrito presenta una sensibilidad que puede variar entre  $40$ - $200$  mV/década. En estas condiciones, el intervalo de trabajo puede estar comprendido entre  $0,01$ - $10.000$  mg/l de fósforo orgánico.

Otro aspecto de la invención se refiere al empleo del electrodo metálico de cobalto para la determinación directa de fósforo orgánico, especialmente de fitatos.

Dicho electrodo permite la detección de especies orgánicas fosforiladas como el fitato, AMP, ATP, etc., en fluidos biológicos, por lo que otro aspecto de la invención se refiere a un método de evaluación de especies fosforiladas, en fluidos biológicos, principalmente orina, basado en el procedimiento descrito.

Otro aspecto principal de la invención proporciona un procedimiento para la determinación directa y simultánea de fósforo orgánico e inorgánico en una muestra que comprende (a) la extracción del fósforo contenido en la muestra; (b) la separación del extracto obtenido en (a) en dos alícuotas; (c) la mezcla simultánea e independiente de la primera alícuota obtenida en (b) con una solución tampón A, a un pH que varía entre  $2$  y  $7$ , y de la segunda alícuota obtenida en (b) con una solución tampón B, a un pH que varía entre  $5$  y  $10$ ; (d) la detección simultánea e independiente del fósforo inorgánico y orgánico de la primera y segunda alícuota obtenidas en (c) respectivamente y (e) el análisis simultáneo de los resultados obtenidos en la etapa d), donde la etapa d) se lleva a cabo potenciométricamente utilizando dos electrodos metálicos de cobalto, preferiblemente de configuración tubular, sensibles a fósforo orgánico e inorgánico respectivamente.

Del mismo modo que en el procedimiento descrito para la detección exclusiva de fósforo orgánico, y en las condiciones descritas, también se contempla la realización de una etapa de preconcentración del fósforo extraído en a).

Algunos ácidos débiles, el hidrogenofalato y el agua caliente permiten una extracción casi cuantitativa de fósforo presente en las muestras agroalimentarias, por lo que en realizaciones preferidas de la invención se emplearán ácidos débiles, hidrogenofalato y agua caliente en la etapa de extracción (a).

En otra realización preferida de la invención el fósforo orgánico detectado es un inositol fosfato, preferiblemente un fitato.

## ES 2 299 313 A1

En realizaciones particulares de la invención el tampón A es hidrogenoftalato de potasio, y el tampón B es Tris-HCl, y preferiblemente, la cantidad de tampón A y B empleada varía entre  $1$  y  $10^{-5}$  mol/l, siendo preferibles concentraciones de  $10^{-2}$  mol/l.

5 En realizaciones preferidas de la invención, el pH final de la mezcla obtenida en c) a partir del tampón A y la primera alícuota es 4 y el pH final de la mezcla obtenida a partir del tampón B y la segunda alícuota es 8.

10 En una realización preferida de la invención, el análisis de los resultados obtenidos por los electrodos en el procedimiento para la detección simultánea de fósforo orgánico e inorgánico se lleva a cabo en un sistema de análisis en flujo continuo con detección potenciométrica.

Otro aspecto de la invención, se refiere al dispositivo automático para llevar a cabo el procedimiento para la detección simultánea de fósforo orgánico e inorgánico.

15 Así, en una realización particular de la invención, el dispositivo está basado en un sistema de análisis por inyección en flujo con detección potenciométrica (figura 3). Este sistema comprende una bomba peristáltica (BP) para la propulsión (o aspiración) de las soluciones de agua, tampón A, tampón B y la solución obtenida en a); una válvula con dos bucles de inyección (L1 y L2), para determinar el fósforo inorgánico, Pi y el fitato, Porg, respectivamente; un potenciómetro (P); dos electrodos basados en una placa metálica de cobalto (EC); dos electrodos de referencia (Ref);  
20 un registrador (R). El sistema así diseñado, permite una determinación del fósforo inorgánico en el primer detector y una detección de fosfatos de inositol en el segundo detector. Ambos detectores se basan en una placa metálica de cobalto de gran pureza pero, como se ha definido previamente en el procedimiento, con distintos tampones, lo que permite la determinación simultánea de estos dos analitos.

25 Para la determinación potenciométrica se inyectan las muestras en dos canales paralelos a través de los que circula agua y después cada uno de esos canales se mezcla a través de un punto de confluencia con su respectiva solución tampón. Las soluciones resultantes, que generan la señal de línea base en ausencia de muestra, se registran simultáneamente.

30 En realizaciones particulares de la invención, el volumen de la primera y segunda alícuota puede variar entre 50-70.000 y 10-12.000  $\mu$ l respectivamente y el caudal de las corrientes de agua y tampón puede estar comprendido entre 0,2-10 ml/min. De esta manera, el procedimiento descrito presenta una sensibilidad que puede variar entre 20-80 y 40-200 mV/década de concentración respectivamente. En estas condiciones, el intervalo de trabajo para fósforo orgánico e inorgánico puede estar comprendido entre 0,01-10.000 mg/l.

35 Otro aspecto de la invención es un método de evaluación nutricional del fósforo en muestras agroalimentarias. Así, por ejemplo, este procedimiento puede aplicarse para seguir el efecto de la fertilización con fósforo inorgánico sobre el fósforo nutricional de la cosecha de maíz.

40 Además, la detección exclusiva de fitato es importante ya que en las muestras agroalimentarias el fósforo orgánico está mayoritariamente en forma de fitato, por eso en una realización preferida de la invención, se llevará a cabo la evaluación nutricional de fitatos en muestras agroalimentarias, seleccionadas entre semillas, granos, forraje de cría animal, harinas de soja y maíz.

45 El ejemplo que sigue a continuación ilustra la presente invención, pero no debe ser considerado como limitación a los aspectos esenciales del objeto de la misma, tal como han sido expuestos en los apartados anteriores de esta descripción.

### Ejemplo

50 *Reactivos.* Se emplearon reactivos de pureza analítica y agua Milli-Q (Millipore, Bedford, EE.UU.). Se prepararon soluciones patrón de  $P_i$  a partir de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  y  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . Se prepararon soluciones patrón de  $P_{\text{org}}$  utilizando la sal monocalcica del ácido inositolhexafosfórico,  $\text{C}_6\text{H}_{16}\text{O}_{24}\text{P}_6\text{Ca}$  (90% de pureza). Se prepararon soluciones patrón tamponadas de  $P_i$  en una solución de hidrogenoftalato de potasio  $1 \times 10^{-2}$  mol·l<sup>-1</sup> a pH 4. Se obtuvieron soluciones de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y ácido fítico utilizando tampones Tris-HCl  $1 \times 10^{-2}$  mol·l<sup>-1</sup>, HEPPS-KOH (ácido 4-(2-hidroxietil) piperazin-1-propanosulfónico) y  $\text{H}_3\text{BO}_3$ -KCl a pH 8. Se ajustaron al valor de pH deseado mediante la adición de soluciones concentradas de ácido clorhídrico, hidróxido de potasio y cloruro de potasio. Todos los productos químicos se adquirieron en Sigma-Aldrich, Europa.

60 *Construcción y acondicionamiento del electrodo de cobalto.* Se llevó a cabo la construcción de un electrodo de cobalto tubular utilizando una metodología bien establecida (14, 15) y que se ilustra en la Figura 1. Así, se construyó un tubo cilíndrico de metacrilato (8 mm de longitud y 5 mm de diámetro interno) de modo que se insertó perfectamente un disco de cobalto metálico (99,99% de pureza) en la zona de apertura (Figura 1A). Después de esto, se introdujo un conector en forma de lengüeta en el tubo (Figura 1B) y se unió al disco de cobalto con una resina de plata-epoxi para garantizar la conexión eléctrica (Figura 1C). Después, se aislaron del medio externo ambas caras del electrodo con una resina epoxi (Figura 1D), que se curó a 40°C durante 24 h. Finalmente, se perforó longitudinalmente el centro del dispositivo con un taladro de 1 mm de diámetro (Figura 1E).

## ES 2 299 313 A1

Se acondicionaron los sensores en soluciones de fosfato antes del análisis. Para la determinación del  $P_{org}$ , se acondicionó el electrodo de cobalto en una solución de ácido fítico  $1 \times 10^{-1} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  durante 24 h, mientras que para la determinación de  $P_i$  se empleó una solución de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$   $1 \times 10^{-1} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ .

5 *Instrumentación del sistema de análisis por inyección en flujo con detección potenciométrica (FIP).* Se midió la respuesta potenciométrica de los electrodos de cobalto (EC) en el sistema de análisis de flujo descrito en la Figura 3. Este sistema comprende una bomba peristáltica (BP) (Ismatec, 78001-12, Suiza), un potenciómetro (P) (Mettler-Toledo, 355 Ion Analyzer, Inglaterra), un registro potenciométrico (R) (Kipp & Zonen, modelo BD112, Holanda); un electrodo de referencia (Ref) Ag/AgCl con doble conexión (Orion, 90-02-00, EE.UU.) y un tubo de acero conectado a tierra (ET).

*Pretratamiento de muestra y procedimientos experimentales.* La metodología de evaluación del fósforo implica una preparación previa de muestra seguida de un procedimiento de extracción. Para la validación del sistema FIA propuesto, se utilizaron muestras de maíz (*Zea mays.*, L), pienso de cría animal y harina de soja (*Glycine max.*, L). 15 En primer lugar, se utilizó un molino de corte (MR 340 Microtec, Brasil) equipado con un tamiz de malla 20 en el fondo de la cámara de corte para moler las muestras. Se secaron anteriormente a  $60^\circ\text{C}$  durante 48 h en una estufa de ventilación forzada. Para la etapa de extracción de muestra, se pesó una porción de 1,0 g de cada muestra y se transfirió a un recipiente de vidrio. Se añadieron 25 ml de agua Milli-Q caliente (entre  $40\text{-}90^\circ\text{C}$ ) a cada recipiente. Se mezclaron las suspensiones resultantes en un vórtex durante 30 minutos y se centrifugaron a 2.000 rpm durante 10 20 minutos. Después, se realizó la determinación de fósforo.

Para la determinación potenciométrica de  $P_i$  se utilizó como solución tampón una solución de hidrogenofalato de potasio  $1 \times 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a pH 4, mientras que para la determinación de  $P_{org}$  el tampón elegido fue una solución de Tris-HCl  $1 \times 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a pH 8. Para obtener las curvas de calibración, se utilizó dihidrogenofosfato de sodio como 25 solución patrón de fósforo inorgánico, y se empleó ácido fítico como patrón para describir el contenido de fósforo orgánico. Se prepararon patrones de ambas soluciones desde 10 hasta  $1.000 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de P.

Para optimizar el sistema de inyección en flujo, se evaluaron las alturas de pico de dos soluciones patrón. Se llevó a cabo un análisis por triplicado utilizando soluciones a 50 y  $500 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  respectivamente, correspondientes a la 30 concentración de muestra menor y media del intervalo de trabajo lineal. El criterio de evaluación para seleccionar las condiciones experimentales se basó en la mejor relación entre la mayor altura de pico con el mejor rendimiento de muestra.

Con fines de comparación, se han empleado dos metodologías. Por una parte se comparó con un sistema de flujo 35 con detección espectrofotométrica (método estándar que emplea el azul de molibdeno) basado en una hidrólisis enzimática. Para ello se hidrolizó el fitato mediante la enzima fitasa en un reactor enzimático, y se determinó el  $P_i$  resultante mediante espectrofotometría a 650 nm (13).

Por otra parte se comparó con un sistema basado en espectrometría de emisión atómica con detección óptica, 40 empleando un plasma acoplado inductivamente como fuente de ionización, ICP-OES (Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry). Para ello, se utilizó una solución patrón de fósforo  $1.500 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  analítico plasmático (Spex, CertiPrep, Metuchen, NJ) como solución de referencia en la determinación del fósforo total mediante ICP OES.

### 45 *Resultados*

*Determinación de  $P_i$ .* Para establecer las variables químicas e hidrodinámicas del sistema de flujo continuo y optimizar la respuesta para determinar el fósforo inorgánico, se ensayaron algunos parámetros tales como la composición y el pH de la solución utilizada como solución tampón, el caudal y el volumen de muestra. Según los trabajos descritos anteriormente relacionados con la determinación de fosfato utilizando un electrodo de cobalto en un sistema de flujo (16-21), se estableció un tampón de ftalato de potasio  $10^{-2} \text{ mol/l}$  ajustado a pH 4. Por tanto, la optimización del sistema de flujo se enfocó en primer lugar en la evaluación de la influencia del caudal y del volumen de muestra sobre la respuesta del sistema. Todas las señales analíticas presentadas en este ejemplo son valores de potencial relativo obtenidos a partir de la diferencia entre el potencial medido a la altura de pico máxima y el potencial de la señal de 55 línea base.

Las Figuras 4a y 4b muestran respectivamente la influencia del volumen de muestra y del caudal sobre la altura de pico. Así, en a) se emplearon soluciones patrón de 50 y  $500 \text{ mg/l}$ ,  $1 \times 10^{-2} \text{ mol/l}$  de tampón ftalato de potasio a pH 4 y un caudal global de 2,1 ml/min; en b) se emplearon soluciones patrón a 50 y  $500 \text{ mg/l}$ ,  $1 \times 10^{-2} \text{ mol/l}$  de tampón hidrogenofalato de potasio a pH 4 y un volumen de muestra igual a  $500 \mu\text{l}$ . Se eligió un volumen de muestra de  $500 \mu\text{l}$  y un caudal global de  $2,8 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  por ser los valores óptimos como compromiso entre la altura de pico y el rendimiento de muestra.

Para determinar los rasgos analíticos obtenidos en estas condiciones experimentales, se realizó una curva de calibración (figura 6). En a) se presenta la regresión lineal obtenida mediante distintos patrones de Pi (10, 50, 100, 500, 1000 y 5000 ppm) mostrándose una correlación lineal adecuada entre  $\Delta E$  frente al  $\log [\text{H}_2\text{PO}_4]$  (a escala molar, M) con una sensibilidad de  $47 \text{ mV/década}$  en un intervalo de trabajo de 10 a  $1.000 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de dihidrogenofosfato. Estos parámetros de calibración están en buena consonancia con los descritos en la bibliografía y, además, el intervalo lineal

obtenido utilizando el sensor de cobalto cobre convenientemente los niveles de concentración observados corrientemente de las muestras evaluadas.

5 *Determinación de  $P_{org}$ .* Inicialmente, la respuesta potenciométrica ante el ácido fítico se ensayó en las mismas condiciones que se establecieron para la determinación del fósforo inorgánico (tampón hidrogenofalato de potasio a pH 4). En esas condiciones, la respuesta del electrodo no estaba afectada por la concentración de ácido fítico y, por lo tanto, aseguraba un análisis exacto del fósforo inorgánico. Como resultado, pudimos concluir que, en estas condiciones, el electrodo de cobalto no era capaz de detectar la especie de fitato (-6) que es predominante a este pH. Se evaluó después la respuesta del electrodo en la región de pH entre los valores 7 y 9. Así, la Figura 5 muestra  
10 los resultados obtenidos utilizando una solución tampón de Tris-HCl  $1 \times 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , unas soluciones patrón a 50 y 500 mg/l, 75  $\mu\text{l}$  de muestra y un caudal global de 1,4 ml/min. Como puede observarse, la respuesta del electrodo de cobalto aumenta continuamente después de la aparición de la especie de fitato (-9) frente al pH. La señal máxima se obtuvo a pH 8, cuando esta especie es predominante. Un aumento adicional del valor de pH de la solución no mostró ninguna variación de señal, mientras que empeoró la reproducibilidad. Este hecho se refirió a la posible modificación  
15 de la superficie del electrodo de cobalto que puede ocurrir a mayores valores de pH (21, 22). Por lo tanto, se eligió una solución tampón a pH 8 para conseguir la mejor relación entre la altura de pico y la precisión de la medida. Adicionalmente, se evaluó la influencia del anión monohidrogenofosfato sobre la respuesta del electrodo. Su respuesta fue insignificante a este valor de pH.

20 Debido a la capacidad quelante del fitato, debe evaluarse también la influencia de la composición química de la solución tampón sobre la respuesta del electrodo. Se ensayaron tres soluciones tampón de concentración  $1 \times 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  diferentes (Tris-HCl, HEPPS-KOH y  $\text{H}_3\text{BO}_3\text{-KOH}$ ) a pH 8. Como se muestra en la Tabla 1, la sensibilidad del electrodo, medida como la pendiente de la curva de calibración, varía dramáticamente según el tampón utilizado. Estos resultados parecen estar relacionados con la carga neta eficaz de la especie de fitato, que está modulada por su  
25 interacción con las sustancias tampón. Según los resultados descritos anteriormente (23), la mayor pendiente observada utilizando la solución tampón de Tris-HCl podía explicarse mediante la formación de fuertes complejos fitato-amina que reducen la carga neta del ión fitato. Las soluciones tampón HEPPS-KOH y  $\text{H}_3\text{BO}_3\text{-KCl}$ , que no son capaces de formar este tipo de complejos, proporcionan sensibilidades analíticas menores y un intervalo de trabajo estrecho. Sin embargo, los iones fitato pueden formar también complejos con el ión potasio (24), que está presente a diferentes  
30 niveles de concentración en las últimas soluciones tampón mencionadas. Este hecho puede explicar las diferencias observadas entre ellas respecto a la sensibilidad del electrodo.

Después de esta etapa, se examinó la influencia del volumen de muestra y del caudal en la respuesta del electrodo. Utilizando los mismos criterios descritos anteriormente, se eligieron un volumen de muestra de 75  $\mu\text{l}$  y un caudal  
35 global de  $1,4 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . Para optimizar la respuesta del electrodo de cobalto a la concentración de fitato, se realizó un experimento de calibración en las condiciones establecidas anteriormente (Figura 7). El electrodo muestra una sensibilidad media de 127 mV/década. Según la ley de Nernst, el fitato parece tener menos de la mitad de la carga eficaz, debido probablemente a la interacción mantenida con la solución tampón. Se obtuvo un intervalo de trabajo lineal de  $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $1.000 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de fitato en estas condiciones experimentales. Se consiguió una velocidad de muestreo global  
40 de 25 muestras por hora, que incluía análisis de  $P_1$  y  $P_{org}$ .

*Determinación del fósforo en semillas y granos.* Se aplicó el sistema de inyección en flujo desarrollado para la evaluación de las propiedades nutricionales de semillas y granos (basándose en el contenido de fósforo), que se utilizan habitualmente en pienso animal. Se compararon los resultados obtenidos con los proporcionados mediante metodolo-  
45 gías de comparación (Tabla 2). No se observaron diferencias significativas entre ellas utilizando el ensayo de t apareada a un nivel de confianza del 95% (Tabla 4).

La Tabla 3 demuestra también la aplicabilidad del sistema propuesto a otro tipo de muestras, como forraje de cría animal, harinas de soja y maíz. Como puede observarse, el contenido de fitato encontrado en el primer tipo de muestras estaba de acuerdo con el estudio bibliográfico realizado (aproximadamente 80%), y estaba en buena consonancia con los resultados proporcionados por ICP OES, no mostrando diferencias significativas mediante una prueba de t  
50 apareada a un nivel de confianza del 95%. El sistema propuesto puede aplicarse también para seguir el efecto de la fertilización con fósforo inorgánico en la cosecha de maíz. Como puede observarse en las dos últimas muestras, el proceso de fertilización produce un aumento en la proporción de fósforo inorgánico, que está rápidamente disponible  
55 para animales sin reducir el suministro de fitato del grano.

60

65

# ES 2 299 313 A1

TABLA 1

*Optimización del sistema de inyección en flujo de fitato. Efecto de la composición del tampón sobre las características analíticas del sistema FIA. Condiciones: pH 8,0, caudal global de 1,4 ml·min<sup>-1</sup> y volumen de muestra de 75 µl*

Tampón	Límite de detección* (mg·l <sup>-1</sup> )	Intervalo de trabajo (mg·l <sup>-1</sup> )	Sensibilidad (mV·dec <sup>-1</sup> )
Tris-HCl	10±(4) <sup>b</sup>	50-1.000	126,8±(2,5) <sup>c</sup>
EPPS-KOH	230±(24)	250-1.000	101,1±(7,7) <sup>c</sup>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> -KCl	80±(9)	100-1.000	43,6±(0,4) <sup>c</sup>
Límite de detección obtenido utilizando las recomendaciones de la IUPAC. <sup>b</sup> y <sup>c</sup> errores obtenidos en la regresión lineal con un nivel de confianza del 95% para <sup>b</sup> punto de intersección y <sup>c</sup> S <sub>a</sub>			

TABLA 2

*Determinación del contenido de fósforo de diferentes muestras de pienso animal*

Muestra	P <sub>i</sub> (mg·l <sup>-1</sup> )		P <sub>org</sub> (mg·l <sup>-1</sup> )		P <sub>total</sub>
	Espectro.	Pot.	Espectro.	Pot.	ICP OES
1	51±1	56±2	258±15	278±20	321±12
2	70±2	79±4	402±18	391±23	479±19
3	125±3	130±5	785±24	732±29	877±21
4	148±4	146±6	957±28	930±37	1061±25
5	165±8	170±10	964±29	1001±41	1154±31
Errores obtenidos a partir de triplicados para cada muestra a un nivel de confianza del 95% para error de interpolación (S <sub>x0</sub> )					

TABLA 3

*Evaluación nutricional de muestras de grano y semilla utilizando el sistema de inyección en flujo propuesto*

Muestra	P <sub>org</sub>	P <sub>i</sub>	P <sub>total</sub> Pot.	P <sub>total</sub> ICP OES
Forraje animal	276±19	78±4	354±23	361±14
Harina de soja	471±23	69±3	540±25	551±21
Maíz sin fertilización	166±11	25±1	191±14	201±7
Maíz con fertilización	166±10	51±2	217±17	221±7
Errores obtenidos a partir de triplicados para cada muestra a un nivel de confianza del 95% para error de interpolación (S <sub>x0</sub> )				

# ES 2 299 313 A1

TABLA 4

Comparación entre las metodologías empleadas utilizando la prueba de t apareada a un nivel de confianza del 95%

Procedimiento estadístico	Valores de nivel de confianza del 95%	Diferencias significativas
Prueba de t apareada de la comparación espectr.-pot. de $P_i$ (n= 5)	$r= 0,9977$ $T_{cal}= [2,475], t_{tab}= 2,776$	NO
Prueba de t apareada de la comparación espectr.-pot. de $P_{org}$ (n= 5)	$r= 0,9938$ $T_{cal}= 0,421, t_{tab}= 2,776$	NO
Prueba de t apareada de la comparación ICP OES-pot. de $P_{total}$ (n= 9)	$r= 0,9995$ $T_{cal}= [0,292], t_{tab}= 2,306$	NO

## Bibliografía citada

- 1) De **Stefano C.**; **Milea, D.**; **Sammartano, S.** Speciation of phytate ion in aqueous solution. Protonation constants in tetraethylammonium iodide and sodium chloride. *J. Chem. Eng. Data.* 2003, *48*, 114-119.
- 2) **Crea, F.**; **Crea, P.**; De **Robertis, A.**; **Sammartano, S.** Speciation of phytate ion in aqueous solution. Characterization of Ca-phytate sparingly soluble species. *Chem. Speciation and Bioavailability.* 2004, *16*, 53-59.
- 3) **Raboy, V.** Myo-Inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate. *Phytochemistry.* 2003, *64*, 1033-1043.
- 4) **Harland, B. F.**; **Narula, G.** Food phytate and its hydrolysis products. *Nutr. Res.* 1999, *19* (6), 947-961.
- 5) **Lei, X. G.**; **Porres, J. M.** Phytase enzymology, applications and biotechnology. *Biotechnol. Lett.* 2003, *25*, 1787-1794.
- 6) **Buscher, B. A. P.**; Van der **Hoeven, R. A. M.**; **Tjaden, U. R.**; **Andersson, E.**; Van der **Greef, J.** Analysis of inositol phosphates and derivatives using capillary zone electrophoresis-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 1995, *712*, 235-243.
- 7) **Burbano, C.**; **Muzquiz, M.**; **Osagie, A.**; **Ayet, G.**; **Cuadrado, C.** Determination of phytate and lower inositol phosphates in Spanish legumes by HPLC methodology. *Food Chem.* 1995, *52*, 321-325.
- 8) **Sekiguchi, Y.**; **Matsunaga, A.**; **Yamamoto, A.**; **Inoue, Y.** Analysis of condensed phosphates in food products by ion chromatography with an on-line hydroxide eluent generator. *J. Chromatogr. A.* 2000, *881*, 639-644.
- 9) **Ishiguro, T.**; **Ono, T.**; **Nakasato, K.**; **Tsukamoto, C.**; **Shimada, S.** Rapid measurement of phytate in raw soymilk by mid-infrared spectrometry. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2003, *67*, 752-757.
- 10) **Turner, B. L.**; **Mahieu, N.**; **Condron, L. M.** Quantification of myo-inositol hexakisphosphate in alkaline soil extracts by solution  $^{31}P$  NMR spectrometry and spectral deconvolution. *Soil Sci.* 2003, *168*, 469-478
- 11) **Muñoz, J. A.**; **Valiente, M.** Determination of phytic acid in urine by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal. Chem.* 2003, *75*, 6374-6378.
- 12) **Dekoning A. J.** Determination of myo-inositol and phytic acid by gas chromatography using scyllitol as internal standard. *Analyst.* 1994, *119*, 1319-1323.
- 13) **Vieira, E. C.**; **Nogueira, A. R. A.** Orthophosphate, phytate, and total phosphorus determination in cereals by flow injection analysis. *J. Agric. Food Chem.* 2004, *52*, 1800-1803.
- 14) **Alegret, S.**; **Alonso, J.**; **Bartrolí, J.**; **Paulís, J.M.**; **Lima, J.L.F.C.**; **Machado, A.A.S.C.** Flow-through tubular PVC matrix membrane electrode without inner reference solution for FIA. *Anal. Chim. Acta.* 1984, *164*, 147-152
- 15) **Ramon, M.**; *PhD Thesis*, 2004. ISBN: 84-688-5691-6.
- 16) **Chen, Z.**; De **Marco, R.**; **Alexander, P.W.** Flow-injection potentiometric detection of phosphate using a metallic cobalt wire ion-selective electrode. *Anal. Comm.* 1997, *34*, 93-95.

17) **Xiao, D.; Yuan, H.; Li, J.; Yu, R.** Surface-modified cobalt-based sensor as a phosphate-sensitive electrode. *Anal. Chem.* 1995, *67*, 288-291.

5 18) **Meruva, R.K.; Meyerhoff, M.E.** Mixed potential response mechanism of cobalt electrodes towards inorganic phosphate. *Anal. Chem.* 1996, *66*, 2022-2026.

19) **Meruva, R.K.; Meyerhoff, M.E.** Potentiometric oxygen sensor based on mixed-potential of cobalt-wire electrode. *Anal. Chim. Acta.* 1997, *341*, 187-193.

10 20) De **Marco, R., Phan, C.** Determination of phosphate in hydroponic nutrient solutions using flow injection potentiometry and a cobalt-wire phosphate ion-selective electrode. *Talanta.* 2003, *60*, 1215-1221.

15 21) **Turner B.L.; Papházy M.J; Haygarth P.M; Mckelvie I.D.** Inositol phosphates in the environment. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 2002, *357*, 449-469.

22) **Badawy, W. A.; Al-Kharafi, F. M.; Al-Ajmi, J. R.** Electrochemical behaviour of cobalt in aqueous at different pH. *J. Appl. Electrochem.* 2000, *30*, 693-704.

20 23) **Simard, S.; Gallant, D.** A study of electrochemical behaviour of cobalt in aqueous  $\text{H}_2\text{CO}_3/\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$  - solution at pH 7-9. *Can. J. Chem.* 2004, *82*, 583-594.

25 24) De **Stefano, C.; Giuffrè, O.; Milea, D.; Rigano, C.; Sammartano, S.** Speciation of phytate ion in aqueous solution. Noncovalent interactions with biogenic polyamines. *Chem. Speciation and Bioavailability.* 2003, *15* (2), 29-36.

25 25) De **Stefano, C.; Milea, D.; Pettignano, A.; Sammartano, S.** Speciation of phytate ion in aqueous solution. Alkali metal complex formation in different ionic media. *Anal. and Bioanal. Chem.* 2003, *376* (7), 1030-1040.

30 26) H. **Kaufman, I.** Kleinberg. *Archives of Oral Biology*, *15* (10) (1970): 917.

30 27) **Sten O. Engblom** "Determination of inorganic phosphate in a soil extract using a cobalt electrode"

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Procedimiento para la determinación directa de fósforo orgánico en una muestra que comprende las siguientes etapas:

i) extracción del fósforo contenido en la muestra;

10 ii) mezcla de una alícuota del extracto procedente de i) con una solución tampón, a un pH que varía entre 4 y 10;

iii) detección del fósforo orgánico de la solución obtenida en ii); y

15 iv) análisis de los resultados obtenidos en iii);

**caracterizado** porque la etapa iii) se lleva a cabo potenciométricamente utilizando como electrodo indicador un electrodo metálico de cobalto.

20 2. Procedimiento según la reivindicación 1 **caracterizado** porque el electrodo metálico de cobalto tiene configuración tubular.

3. Procedimiento según la reivindicación 1 **caracterizado** porque previamente a la etapa ii) se lleva a cabo la preconcentración del fósforo orgánico extraído en i).

25 4. Procedimiento según la reivindicación 1 **caracterizado** porque el fósforo orgánico detectado en iii) es un inositol fosfato.

5. Procedimiento según la reivindicación 4 **caracterizado** porque el fósforo orgánico detectado en iii) es un fitato.

30 6. Procedimiento según la reivindicación 5 **caracterizado** porque el tampón empleado en ii) es un compuesto que presenta pKas con valores que varían entre 4 y 10.

7. Procedimiento según la reivindicación 6 **caracterizado** porque el pH final de la mezcla obtenida en ii) es de 8.

35 8. Procedimiento según la reivindicación 7 **caracterizado** porque el tampón empleado en ii) es un compuesto que incluye grupos amina.

9. Procedimiento según la reivindicación 8 **caracterizado** porque el tampón empleado en ii) es una amina primaria, secundaria o terciaria.

40 10. Procedimiento según la reivindicación 9 **caracterizado** porque el tampón empleado en ii) es Tris-HCl.

11. Procedimiento según la reivindicación 10 **caracterizado** porque la concentración de tampón empleado varía entre 1 y  $10^{-5}$  mol/l.

45 12. Procedimiento según la reivindicación 11 **caracterizado** porque la concentración de tampón empleado es de  $10^{-2}$  mol/l.

50 13. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores **caracterizado** porque el análisis de la etapa iv) se lleva a cabo mediante un sistema de análisis en flujo continuo con detección potenciométrica.

14. Dispositivo automático para llevar a cabo el procedimiento de las reivindicaciones 1-13.

55 15. Uso de un electrodo de cobalto para la determinación directa de fósforo orgánico según el procedimiento de las reivindicaciones 1-13.

16. Método de evaluación de especies orgánicas fosforiladas en fluidos biológicos que comprende el procedimiento de las reivindicaciones 1-13.

60 17. Método según la reivindicación 16 **caracterizado** porque el fluido biológico es orina.

18. Procedimiento para la determinación directa y simultánea de fósforo orgánico e inorgánico en una muestra que comprende las siguientes etapas:

65 a) extracción del fósforo contenido en la muestra;

b) separación del extracto obtenido en a) en dos alícuotas;

## ES 2 299 313 A1

- c) mezcla simultánea e independiente de la primera alícuota obtenida en b) con una solución tampón A, a un pH que varía entre 2 y 7, y de la segunda alícuota obtenida en b) con una solución tampón B, a un pH que varía entre 5 y 10.
- 5 d) detección simultánea e independiente del fósforo inorgánico y orgánico en la primera y segunda alícuota obtenidas en c) respectivamente;
- e) análisis simultáneo de los resultados obtenidos en la etapa d);
- 10 **caracterizado** porque la etapa d) se lleva a cabo potenciométricamente utilizando dos electrodos metálicos de cobalto sensibles a fósforo orgánico e inorgánico respectivamente.
19. Procedimiento según la reivindicación 18 **caracterizado** porque los electrodos metálicos de cobalto tienen configuración tubular.
- 15 20. Procedimiento según la reivindicación 18 **caracterizado** porque previamente a la etapa b) se lleva a cabo la preconcentración del fósforo extraído en a).
21. Procedimiento según la reivindicación 18 **caracterizado** porque la extracción de la etapa a) se lleva a cabo con ácidos débiles, agua caliente e hidrogenoflato.
- 20 22. Procedimiento según la reivindicación 18 **caracterizado** porque el fósforo orgánico detectado es un inositol fosfato.
23. Procedimiento según la reivindicación 22 **caracterizado** porque el fósforo orgánico detectado es un fitato.
- 25 24. Procedimiento según la reivindicación 23 **caracterizado** porque en la etapa c) el tampón A es hidrogenoftalato de potasio y el tampón B es Tris-HCl.
- 30 25. Procedimiento según la reivindicación 24 **caracterizado** porque el pH final de la mezcla obtenida en c) a partir de la primera alícuota con el tampón A es 4 y el de la mezcla obtenida a partir de la segunda alícuota con el tampón B es 8.
- 35 26. Procedimiento según la reivindicación 25 **caracterizado** porque la concentración de tampón A y B empleado varía entre 1 y  $10^{-5}$  mol/l.
27. Procedimiento según la reivindicación 26 **caracterizado** porque la concentración de tampón A y B empleado es de  $10^{-2}$  mol/l.
- 40 28. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 18-27 **caracterizado** porque la etapa e) se lleva a cabo mediante un sistema de análisis en flujo continuo con detección potenciométrica.
29. Dispositivo automático para llevar a cabo el procedimiento de las reivindicaciones 18-28.
- 45 30. Método de evaluación nutricional del fósforo en muestras agroalimentarias que comprende el procedimiento de las reivindicaciones 18-28.
31. Método según la reivindicación 30 para la evaluación nutricional de fitatos en muestras agroalimentarias.
- 50 32. Método según la reivindicación 31 **caracterizado** porque las muestras son seleccionadas de entre semillas, granos, forraje de cría animal, harinas de soja y maíz.

55

60

65

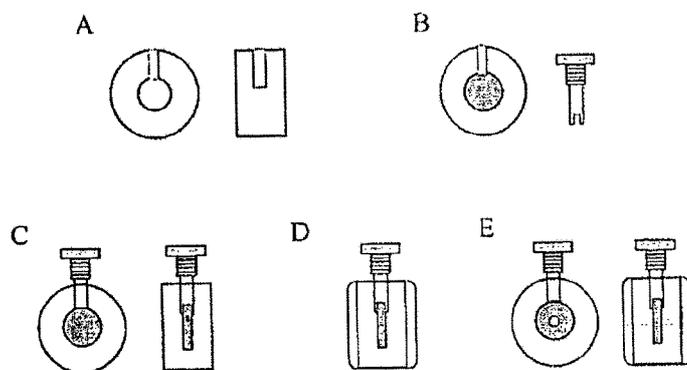


Figura 1

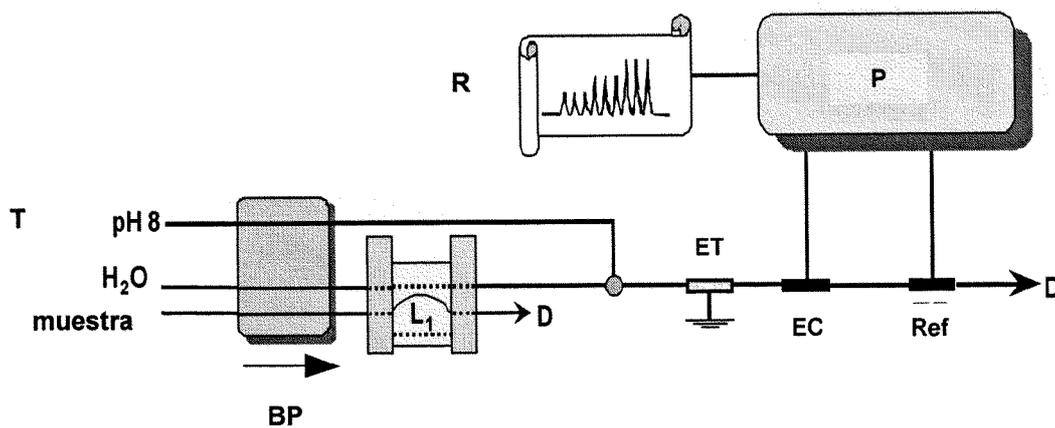


Figura 2

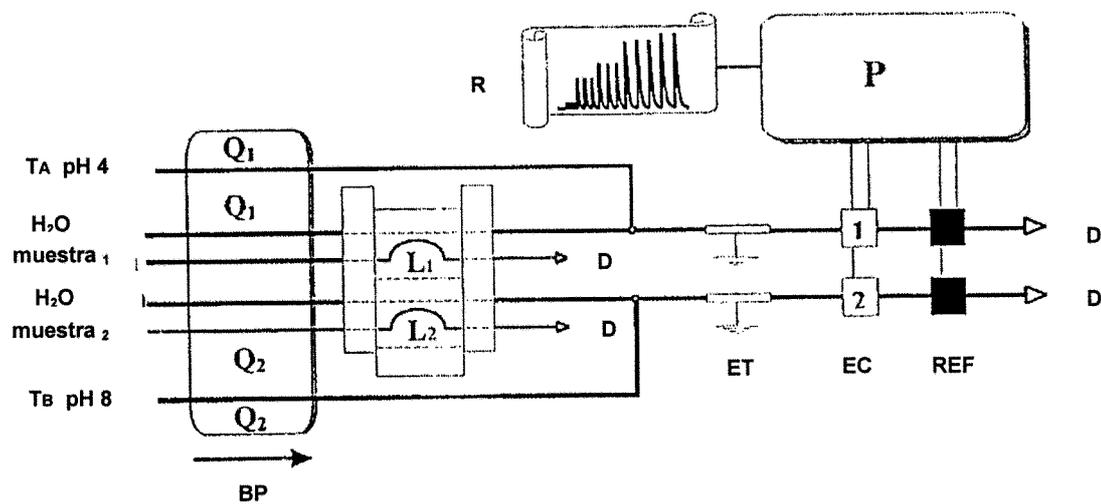


Figura 3

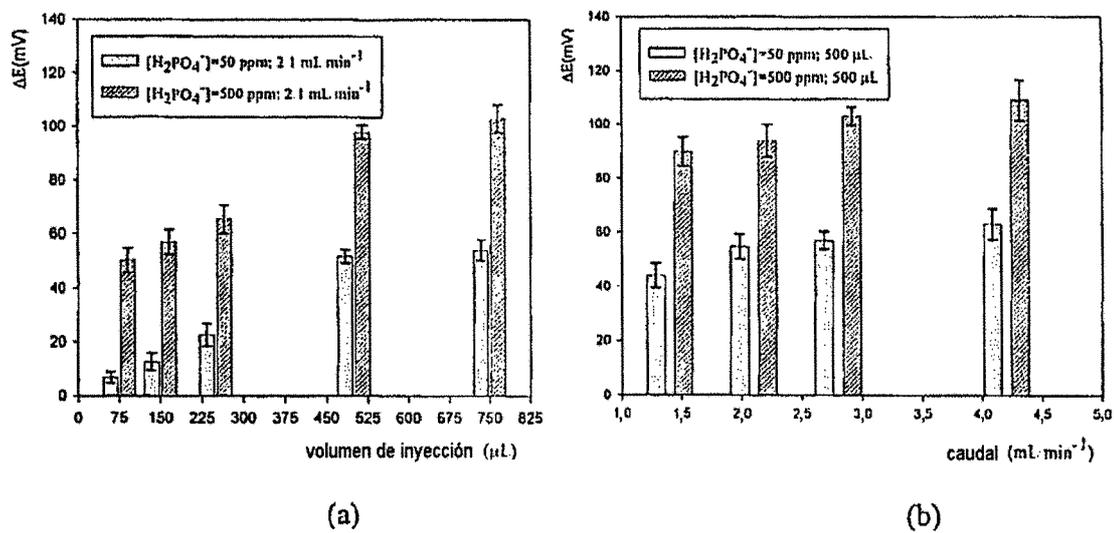


Figura 4

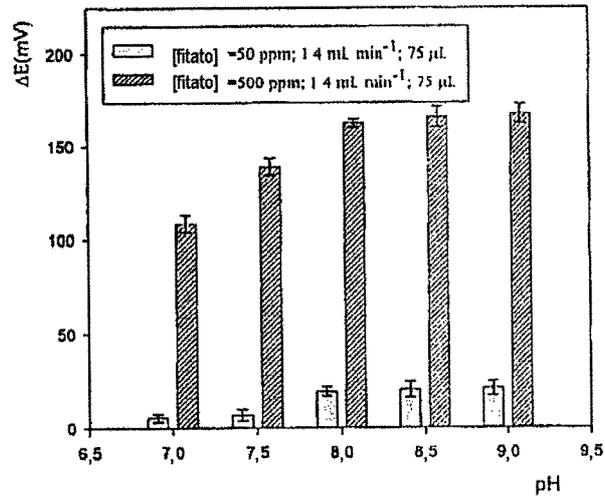


Figura 5

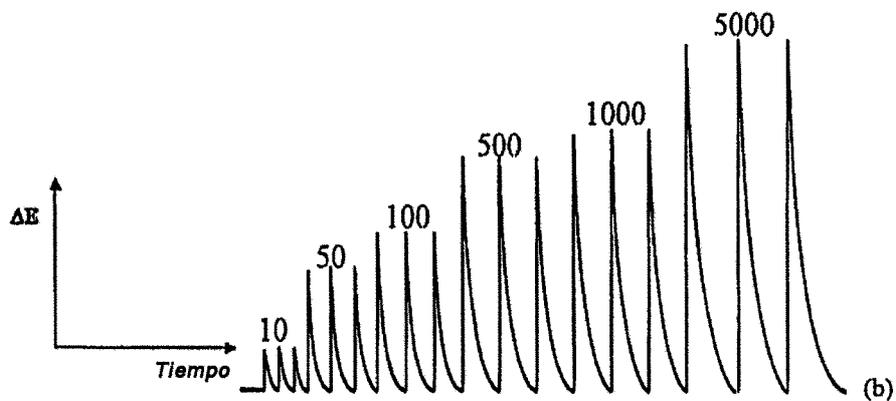
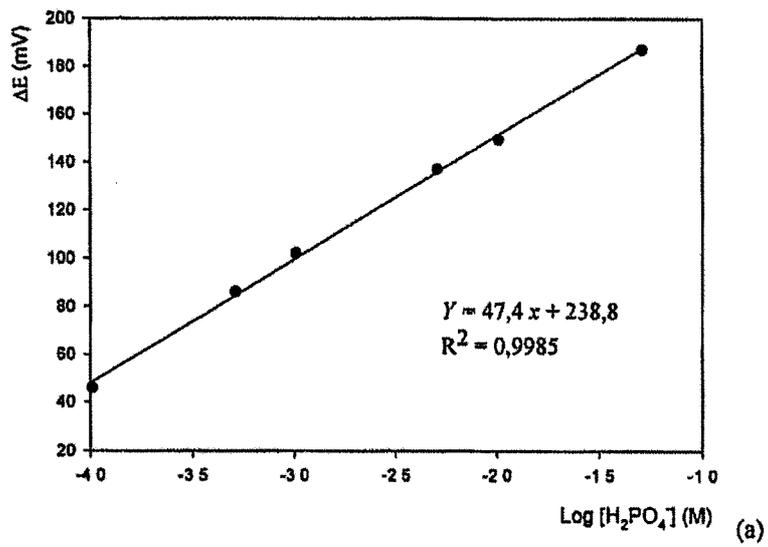


FIGURA 6

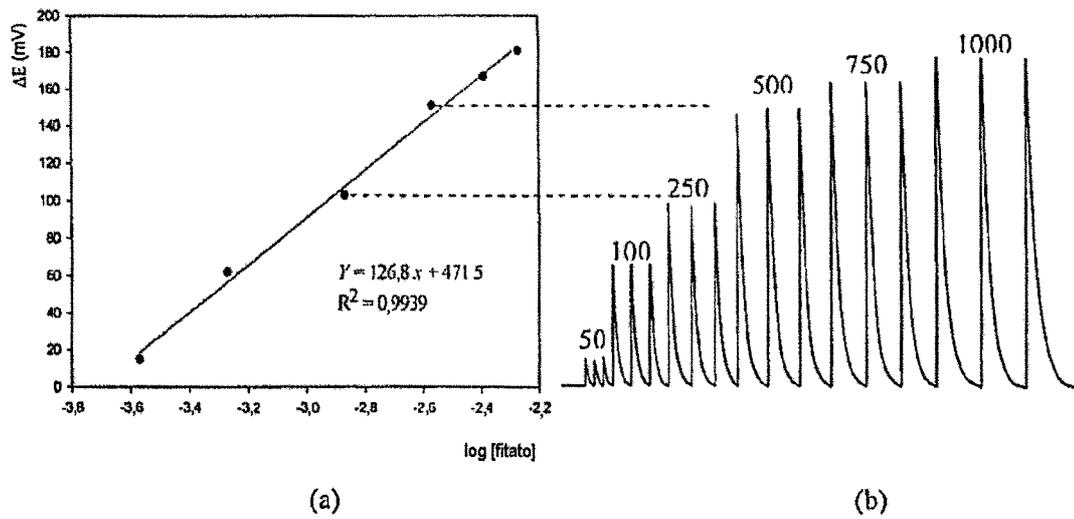


Figura 7



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 299 313

② Nº de solicitud: 200502459

③ Fecha de presentación de la solicitud: 05.10.2005

④ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	ZULIANG CHEN et al. Flow-injection potentiometric detection of phosphates using a metallic cobalt wire ion-selective electrode. Analytical Communications, marzo 1997, vol. 34, páginas 93-95.	1-32
A	ROLAND DE MARCO et al. Determination of phosphate in hydroponic nutrient solutions using flow injection potentiometry and a cobalt-wire phosphate ion-selective electrode. Talanta 2003, vol. 60, páginas 1215-1221.	1-32
A	STEN O. ENGBLOM. Determination of inorganic phosphate in a soil extract using a cobalt electrode. Plant and Soil 1999, vol. 206, páginas 173-179.	1-32
A	XIAO, DAN et al. A new phosphate ion sensitive electrode. Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao 1994 15(2), 193-4 CODEN: KTHPDM. (resumen) (en línea) recuperado el 23.04.2008 en HCAPLUS en STN. Chemical Abstracts Service (Columbus, Ohio, EEUU) nº de acceso 1994:547806.	1-32

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe 28.04.2008	Examinador S. González Peñalba	Página 1/2
------------------------------------------------	-----------------------------------	---------------

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

**G01N 27/30** (2006.01)

**C25B 11/04** (2006.01)

**C01B 25/00** (2006.01)