
DESARROLLO Y VALIDACION DE UNA NUEVA METODOLOGIA PARA LA DETERMINACION DE CALCIO EN ALIMENTOS BALANCEADOS.

Rubén Pérez-Franco,* Javier Lara Arellano.

Nutek, S.A. de C.V.
7 Norte 416. Tehuacán, Pue., 75700 México.
Email: gpoidisa@acnet.net
Fax: (238) 3 35 02

Palabras clave: Calcio, Alimentos, Validación, Electrodo, Análisis.

INTRODUCCION.

La importancia del calcio en los procesos metabólicos de las aves es bien conocida en la actualidad;¹ debido a esto, su contenido en los alimentos balanceados es cuantificado de ordinario en las explotaciones avícolas. El crecimiento de la industria pecuaria y el aumento en el consumo de alimentos que trae consigo, requiere de procesos de producción y control de calidad más dinámicos y eficientes. Los métodos de análisis no escapan a esta tendencia de búsqueda de mejoras y de alternativas para la determinación de los analitos y nutrientes que son de su competencia. Para la determinación de calcio, los métodos que se emplean normalmente son los emitidos por el AOAC International;⁵ sin embargo, estos métodos presentan ciertos inconvenientes: el método 935.13 (volumétrico) es lento e incómodo y sólo permite un número limitado de análisis por día, y el método 968.08 (absorción atómica) requiere de un equipo costoso al que muy pocos laboratorios tienen acceso. Se desarrolló y validó un método alternativo para la determinación de calcio en alimentos balanceados; este método utiliza un electrodo selectivo de calcio e involucra un procedimiento sencillo, de fácil implementación, económico y no presenta los inconvenientes inherentes a los métodos oficiales del AOAC International.

PARTE EXPERIMENTAL.

I. METODO.

A. Aparatos.

- A. Electrodo. Electrodo selectivo de calcio (modelo 93-20, Orion Research Inc.) y electrodo de referencia de unión simple (modelo 90-01, Orion Research Inc.).
- B. Agitador magnético. Con barras magnéticas de 4 cm (1 1/2") recubiertas de teflón. Utilizar un material aislante para proteger a la muestra del calor del motor.
- C. Potenciómetro. Analizador de iones Orion EA940 (Orion Research Inc. 529 Main street, Boston, MA 02129 USA). Equipado con ajustador de temperatura automático.

A. Reactivos.

- A. Agua desionizada.
- B. Carbonato de calcio. 99.995 % (20,293-2, Aldrich Chemical Inc.).
- C. Solución estándar de calcio, SEC. 4000 ppm Ca.
- D. Ajustador de fuerza iónica, ISA. Solución de KCl 4M.
- E. Solución de azul de bromofenol al 0.5 % en agua.
- F. Hidróxido de amonio al 5 %.

B. Procedimiento.

- ♦ *Preparación de la muestra.* Calcine 3 g de muestra en un crisol de porcelana durante 3 horas a 600 °C. Deje enfriar. Adicione 10 mL de solución de HCl 1+3 y una gota de HNO₃ concentrado, y coloque sobre una parrilla de calentamiento. Permita la evaporación hasta cerca de la sequedad. Transfiera cuantitativamente a un matríz volumétrico de 250 mL. Adicione una gota de solución de azul de bromofenol y adicione volúmenes suficientes de hidróxido de amonio y ácido clorhídrico diluido (1+50) para lograr un cambio en la coloración de amarillo a azul-gris. Complete el volumen con agua.
- ♦ *Pendiente experimental del electrodo.* Siga el procedimiento sugerido por el fabricante del electrodo.⁴
- ♦ *Medición de la concentración de calcio. Procedimiento analítico de adición conocida.*⁶
 1. A un vaso de precipitado de 150 mL equipado con barra magnética, adicione 10 mL de la muestra, 2 mL de ISA y 100 mL de agua. Agite vigorosamente.
 2. Prepare el potenciómetro en el modo de adición conocida.
 3. Sumerja los electrodos en la solución, cuando la lectura mostrada sea estable, introduzca el valor experimental de la pendiente.
 4. Adicione 10 mL de SEC. Agite vigorosamente.
 5. Cuando la lectura mostrada sea estable, registre la concentración de calcio (ppm).

C. Cálculos.

$$\% \text{ Ca} = (0.28) (\text{Sc}) / \text{W}$$

donde: Sc - concentración experimental de Ca, ppm.
W - peso de la muestra en gramos.

II. VALIDACION.

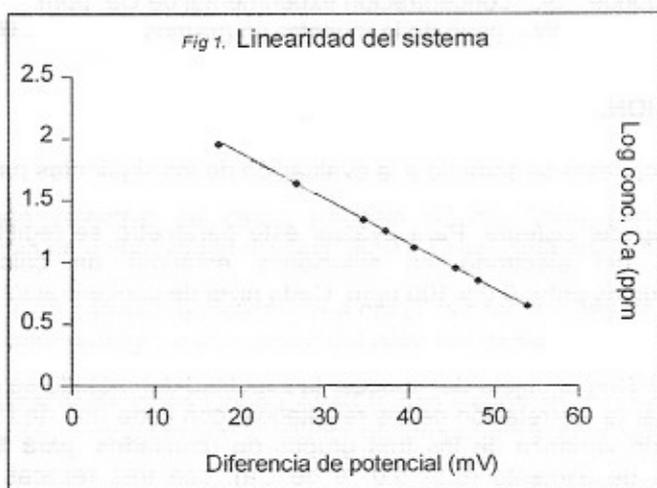
El método propuesto se sometió a la evaluación de los siguientes parámetros de validación:²

1. *Linealidad del sistema.* Para evaluar éste parámetro se registraron las diferencias de potencial del electrodo en soluciones estándar de calcio de concentraciones comprendidas entre 0.0 y 100 ppm. Cada nivel de concentración de calcio se analizó por triplicado.
2. *Exactitud.* Con el objeto de conocer la exactitud del método se eligieron las opciones de a) estudiar la correlación de los resultados con cada uno de los métodos oficiales y un análisis de varianza de los tres grupos de resultados, para lo cual se analizaron 27 muestras de alimento (0.5- 5.0 % de Ca), con tres réplicas cada una, por los tres diferentes métodos estudiados:
 - ♦ Método oficial AOAC 935.13 (volumétrico).
 - ♦ Método oficial AOAC 968.08 (absorción atómica).
 - ♦ Método por electrodo selectivo de calcio.y b) ensayos de recuperación en muestras de alimentos fortificadas con adiciones conocidas de Ca.

3. *Precisión.* El grado de concordancia entre una serie de mediciones repetidas de una muestra homogénea se estudio de la manera siguiente:
 - ◆ Método. A 10 niveles comprendidos entre 5-125 % de los valores de calcio normalmente encontrados en alimentos para aves.
 - ◆ Sistema. Soluciones estándar de calcio a 5 niveles (50- 150%) con 5 réplicas cada uno.
4. *Especificidad.* Se realizaron ensayos de cuantificación del calcio adicionado a soluciones placebo, estas soluciones contenían los principales iones (P, Na, K, Mn, Mg, Fe, Cu, Zn) que se encuentran normalmente en alimentos para aves, a concentraciones de 50, 100 y 150 % del valor medio teórico.
5. *Rango.* Para establecer el rango de concentraciones de calcio en el cual el método es lineal, exacto y preciso, se evaluó la linealidad de la metodología utilizando muestras de alimento (0.5-5.0 % de Ca).

RESULTADOS Y DISCUSION.

En la figura 1 se puede apreciar el grado de correlación que guardan la diferencia del potencial del electrodo y el \log_{10} de la concentración de Ca (ppm) en solución. Los valores para el coeficiente de correlación y su cuadrado son 0.9999 y 0.9998 respectivamente; lo cual refleja que la diferencia de potencial de la solución medida por el electrodo antes y después de la adición del estándar de concentración conocida es función perfectamente lineal del logaritmo de base 10 de la concentración de calcio en solución. Esto brinda un alto grado de confianza al sistema utilizado en la metodología propuesta.



En las figuras 2 y 3 se aprecia que relacionando y graficando los resultados obtenidos por el método Ca-ES como función de los resultados obtenidos por cada uno de los métodos oficiales AOAC International, para cada muestra, el grado de correlación es muy alto. Dicha correlación indica la gran exactitud de la metodología desarrollada, y en la tabla 1 se muestran algunos parámetros estadísticos que así lo corroboran.

Fig. 2. CORRELACION ENTRE LOS METODOS Ca-ES Y AOAC 935.13 (VOLUMETRICO)

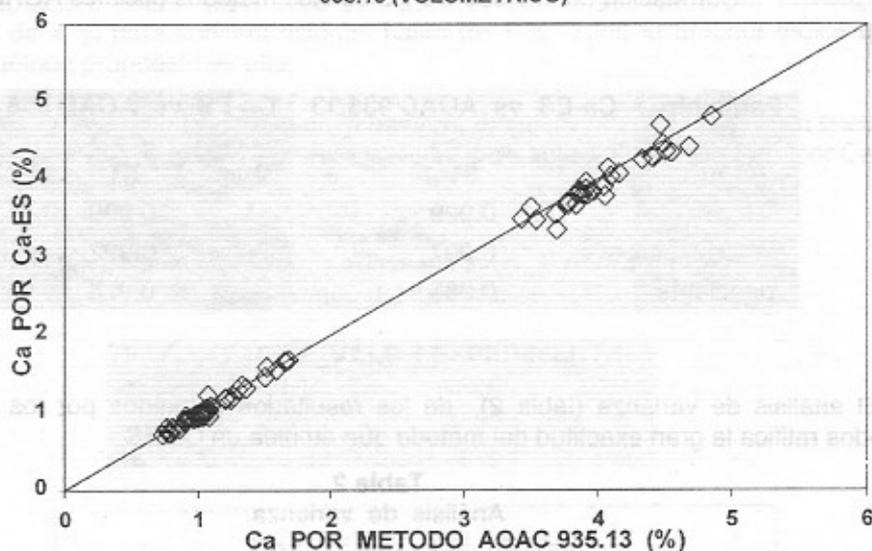


Fig. 3. CORRELACION ENTRE LOS METODOS Ca-ES Y AOAC 968.08 (ABSORCION ATOMICA)

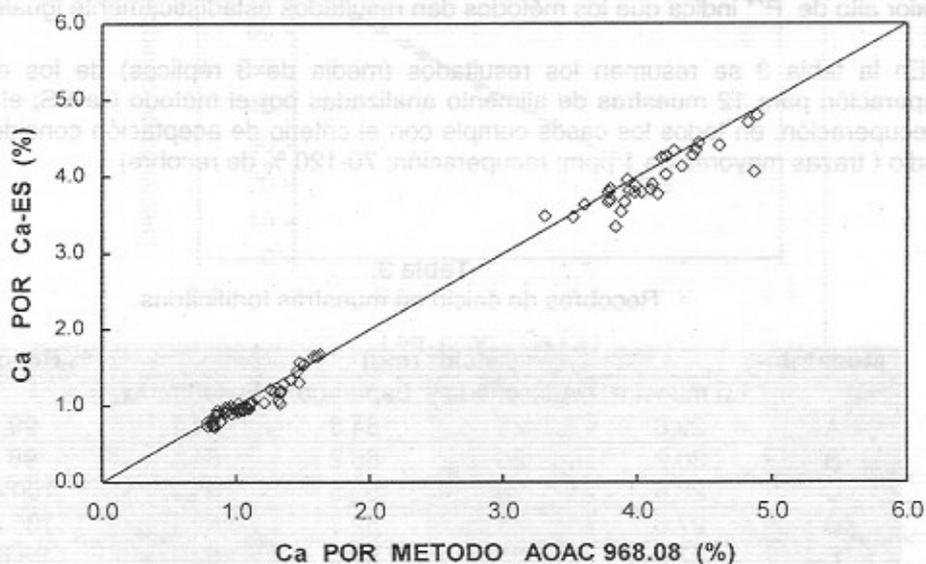


Tabla 1.

Correlación del método Ca-ES con los métodos oficiales AOAC International.

Parámetro	Ca-ES vs AOAC 935.13	Ca-ES vs AOAC 968.08
n	81	81
r	0.999	0.996
r ²	0.997	0.992
pendiente	0.985	0.978

El análisis de varianza (tabla 2) de los resultados obtenidos por los tres diferentes métodos ratifica la gran exactitud del método que emplea un Ca-ES.

Tabla 2.
Análisis de varianza.

Fuente de error	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F	P**
MET	0.230	2	0.115	0.53	0.948
ERROR	518.362	240	2.160		

El valor alto de P** indica que los métodos dan resultados estadísticamente iguales.

En la tabla 3 se resumen los resultados (media de 3 réplicas) de los ensayos de recuperación para 12 muestras de alimento analizadas por el método Ca-ES; el porcentaje de recuperación, en todos los casos cumple con el criterio de aceptación considerado en el estudio (trazas mayores de 1 ppm; recuperación: 70-120 % de recobre).

Tabla 3.
Recobres de calcio en muestras fortificadas.

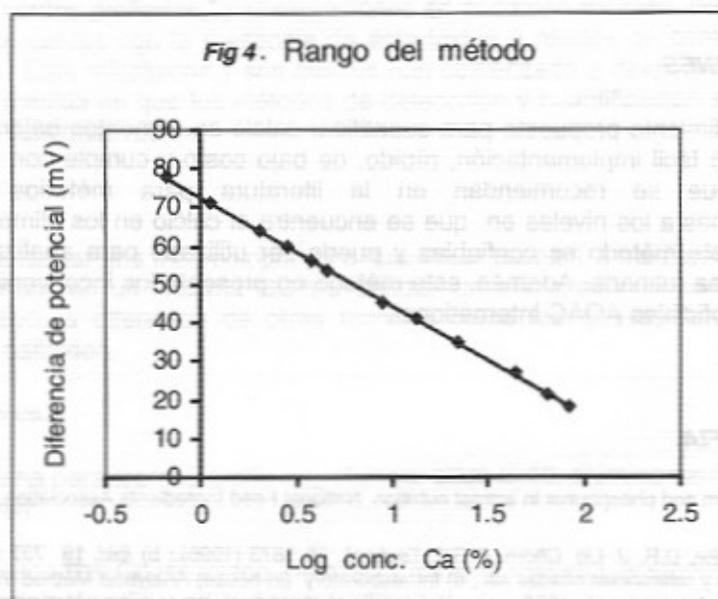
Muestra	Calcio (mg)				% Recobre
	En muestra	Adicionado	Esperado	Encontrado	
A	29.6	25	54.6	54.1	99
B	30.2	25	55.2	54.1	98
C	28.5	25	53.5	53.7	100.4
D	27.3	25	52.3	52.1	100.2
E	27.6	25	52.6	52.1	99.0
F	25.8	25	50.8	52.4	103.0
G	29.6	50	79.6	78.0	98.0
H	30.2	50	80.2	78.5	97.9
I	28.5	50	78.5	78.6	100.1
J	27.3	50	77.3	77.5	100.3
K	27.6	50	77.6	77.6	100.0
L	25.8	50	75.8	75.8	100.0

El análisis estadístico de los ensayos para conocer la precisión del método y del sistema muestra que el coeficiente de variación para ambos casos es menor que 2 %, que es un criterio de aceptación; estos resultados son acordes con lo publicado por Horwitz³ que acepta un CV de 4 % para concentraciones hasta de 1 %. Todo lo anterior indica que la precisión del método propuesto es alta.

En la tabla 4 y figura 4 se resumen y muestran, respectivamente, la perfecta linealidad que se obtuvo en los ensayos para determinar el rango de aplicación del método por Ca-ES.

Tabla 4.
Resumen de los resultados de los ensayos de para determinar el rango del método.

PARAMETRO	VALOR EXPERIMENTAL
n	25
r	0.999
r ²	0.999



Los resultados de los ensayos para verificar la especificidad fueron acordes con lo esperado, y además coinciden con lo descrito por el fabricante, esto brinda un alto grado de confianza a la especificidad del electrodo, y por consiguiente, al método; también los ensayos de recuperación descritos en el apartado que trata de la exactitud, corroboran la gran especificidad de la metodología que emplea un Ca-ES.

La tabla 5 muestra la excelente respuesta del método Ca-ES en muestras "ciegas" de *check sample*. Las concentraciones de calcio que se encontraron con la metodología propuesta están acordes con los encontrados por las otras metodologías oficiales en laboratorios de todo el mundo que participan en los programas de las organizaciones mencionadas.

Tabla 5. Ca (%) encontrado por el método Ca-ES en muestras de dos programas Check sample (AAFCO y AACC).

Check sample No.	Método Ca-ES	AAFCO (AA)	AAFCO (Volumétrico)	AACC
9730 alfalfa meal	1.26	1.24	1.28	
9824 cattle feed	4.10	4.03	4.13	
9822 dog food	1.00	0.98	1.02	
9825 rabbit feed	0.92	0.88	0.93	
D-3 1998	0.57			0.60
D-6 1997	0.19			0.22
D-5 1997	0.56			0.63
D-4 1997	0.90			0.93
D-3 1997	0.99			1.04
D-2 1997	1.10			1.06

CONCLUSIONES

El procedimiento propuesto para cuantificar calcio en alimentos balanceados para aves resulta ser de fácil implementación, rápido, de bajo costo y cumple con los parámetros de validación que se recomiendan en la literatura para métodos que determinan concentraciones a los niveles en que se encuentra el calcio en los alimentos balanceados, por lo que éste método es confiable y puede ser utilizado para analizar el contenido de calcio en forma rutinaria. Además, este método no presenta los inconvenientes inherentes a los métodos oficiales AOAC International.

BIBLIOGRAFIA.

1. Calcium and phosphorus in animal nutrition. National Feed Ingredients Association. USA, 1985.
2. a) Jenke, D.R. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, **19** 1873 (1996); b) *ibid*, **19** 737 (1996); c) *ibid*, **19** 719 (1996) y referencias citadas allí.; d) Intralaboratory (in-house) Analytical Method Validation. Short Course. AOAC International, 1998.; e) Validation of Analytical Procedures: Methodology. ICH Harmonised Tripartite Guideline, 1996.; f) Text on validation of Analytical Procedures. Guideline for industry. ICH-Q2A, 1995.
3. a) Horwitz, W., L.R. Kamps y K.W. Boyer. 1980. Quality Assurance in the Analysis of Foods for trace constituents. *J. AOAC*, **63** (1344); b) Horwitz, W. 1982. Evaluación of Analytical Methods Used for Regulation of Foods and Drugs. *Analytical Chemistry*, **54** (67-A).
4. Manual de operación: electrodo selectivo de calcio. Orion Research Inc. USA.
5. Official methods of analysis of AOAC international, 16th edition.
6. Vogel's textbook of quantitative inorganic analysis. 4th edition. England, 1978.