

Utilización del complejo formado con metalfaleína para la determinación espectrofotométrica de calcio en jugos y cremogenados de naranjas.*

Robles Juan C.; De Zan María M.; Mantovani Víctor E.; Sanchis Juan C.; Satuf Lucila; Ferraro Julieta B.

Cátedra de Química Analítica General, Departamento de Química, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, C.C. 530 (3000) Santa Fe, Argentina.

RESUMEN: El método fue desarrollado para su aplicación a la determinación de calcio dentro del conjunto de parámetros fisicoquímicos que se evalúan en muestras de jugos y cremogenados de naranjas del país, para actualizar la base de datos de sus composiciones y el estudio de sus tipificaciones, como asimismo deducir modelos estadísticos que permitan juzgar la autenticidad de los mismos y la posibilidad de la detección de adulteraciones (8,9).

Se desarrolló una técnica espectrofotométrica, en la cual el calcio forma con la metalfaleína un complejo coloreado en presencia de 8-hidroxiquinoleína, que evita la interferencia del magnesio en las condiciones del ensayo. Se estudió el comportamiento del método evaluándose: características espectrales, estabilidad del color, linealidad, reproducibilidad, exactitud, interferencia del magnesio, ensayo de recuperación de calcio, y se realizó un estudio comparativo con la técnica de absorción atómica. El método propuesto presenta las siguientes características: es rápido, requiere poco volumen de muestra, es preciso, exacto, económico, utiliza reactivos de fácil preparación y elevada estabilidad a temperatura ambiente, lo que permite reemplazar las técnicas de absorción atómica y volumetrías complejométricas para conseguir resultados precisos en un laboratorio de mediana complejidad.

SUMMARY: Calcium is one of the parameters studied for the characterization of fruit juices and puree as well as for detecting adulterations. A spectrophotometric method was developed for its determination, in which a Metalfaleine colored complex is formed with calcium, when 8-hydroxiquinoleine was present to avoid the interference of magnesium in the conditions of the test. The behavior of the method was studied evaluating: spectral characteristics, color stability, reproducibility, accuracy, interference of the magnesium and recovery of calcium. This method had the following characteristics: quickness, small sample volume, accuracy, high precision, low cost, easy reagents preparation and high stability at room temperature. For these reasons it may be applied in a laboratory of medium complexity as an alternative of the atomic absorption and complexometric volumetric methods.

Introducción

Para el análisis de calcio en jugos y cremogenados de naranjas, los métodos más citados por la bibliografía son: la volumetría complejométrica, utilizando ácido etilendiaminotetracético como titulante (1), la espectroscopía de emisión y de absorción atómica (1-3) y la espectroscopía de emisión en plasma acoplado inductivamente (3). El primero presenta como dificultad la utilización de volúmenes elevados de muestra y una escasa reproducibilidad, y los otros, debido al costo del equipamiento, no siempre son accesibles a laboratorios de mediana complejidad.

En el método que se propone, basado en trabajos precedentes (4,5), la determinación de calcio se hace espectrofotométricamente a través de la formación de un complejo con la Metalfaleína, conteniendo además el reactivo una concentración suficiente de 8-hidroxiquinoleína que evita la interferencia del magnesio en las condiciones de trabajo (6, 7).

Materiales y Métodos

Aparatos y reactivos

- Espectrofotómetro UV-Visible: GBC Scientific Equipment Pty Ltd. Australia, modelo 911.
- Peachimetro: Orion mod. 420 A.
- Espectrómetro de absorción atómica: Perkin Elmer 3110 con lámpara de cátodo hueco.
- Mufla: Dalvo modelo HM1.
- Micropipetas de 50 y 100 ul con constricción.
- Reactivos (todas las drogas utilizadas son de grado analítico):

* Trabajo desarrollado en el marco del programa CAI+D de la Universidad Nacional del Litoral, Resolución CS N° 156/94.

f₁) *Solución patrón stock de calcio de 1.000 mg/l*: preparada a partir de "Titrisol" MERCK, de 1.000 g +/- 0.002, llevado a 1000.00 ml con agua destilada.

f₂) *Soluciones derivadas de calcio de 20, 40, 60, 80 y 100 mg/l*: se prepararon tomando 1.00 - 2.00 - 3.00 - 4.00 y 5.00 ml respectivamente de la solución stock con microbureta de 5.000 ml, llevando en cada caso a 50.00 ml.

f₃) *Reactivo complejante*: se preparó mezclando 0.10 mmol de metalftaleína (Cfx), (o-cre-solphthalein-3',3''-bis-methyleneiminodiacetic acid o phthalein purple) SIGMA; 3.44 mmol de 8 - hidroxiquinoleína ERBA RPE - ACS; 11.61 mmol de acetato de sodio trihidrato MERCK.; disolviendo la mezcla con 15 ml de ácido clorhídrico 2 mol/l preparado a partir de ácido clorhídrico concentrado MERCK; llevando finalmente a 25 ml con agua destilada.

f₄) *Solución reguladora*: se preparó mezclando 5 ml de 2-Amino-2 metilpropan-1-ol BDH, previamente fundido con 250 ml de metanol al 35 % (v/v) MERCK., adicionando luego 0.30 ml de hidróxido de potasio 5 mol / l MERCK, ajustando finalmente el pH entre 10.9-11.1.

Preparación de las muestras

Jugos: Se trabajó con jugo obtenido por exprimido manual, filtrado por un lecho de algodón y posteriormente centrifugado durante 15 minutos a 2500 rpm. Se pesaron aproximadamente 25 g en un crisol de cuarzo, determinándose cenizas calcinando en mufla a 500°C - 525°C. El residuo se trató con 15 ml de ácido clorhídrico 1.2 mol / l, calentando en baño maría por espacio de 15 min., enfriando luego y llevando a 50.00 ml con agua destilada en matraz aforado.

Cremogenados: El procedimiento es similar al indicado para jugos, pero en este caso se utilizaron alrededor de 15 g de muestra, llevándose también a un volumen final de 50.00ml.

Sobre las soluciones obtenidas a partir de las cenizas de jugos y cremogenados, se determinó el contenido de calcio (en la misma solución se pudieron cuantificar también los iones magnesio, hierro y fosfato). Los resultados que se expresan en este trabajo se refieren a esta solución clorhídrica de las cenizas. A partir de estos datos y las masas de jugos y cremogenados utilizadas en los análisis se calculan los valores de calcio en las muestras, expresándolos en mg/kg (ppm).

Valoración espectrofotométrica

La determinación se realizó directamente en la cubeta de lectura de 10 mm.

Reactivo	Patrón	Muestra
Reguladora	3.00 ml	3.00 ml
Complejante	100 ul	100 ul

Se agitó con varilla plástica y se realizó la lectura a 576 nm. Los valores obtenidos, que corresponden a los blancos internos del patrón y de la muestra, se identifican como Bp y Bm. Sin retirar la cubeta de lectura del espectrofotómetro, se agregaron 50 ul de la muestra patrón y de la muestra incógnita respectivamente con micropipeta de construcción, mezclando con la varilla plástica y se realizaron nuevas lecturas, identificadas como Ap y Am respectivamente. Se obtuvieron luego las absorbancias corregidas $A_{pc} = (A_p - B_p)$ y $A_{mc} = (A_m - B_m)$.

Resultados y Discusión

a) Características espectrales

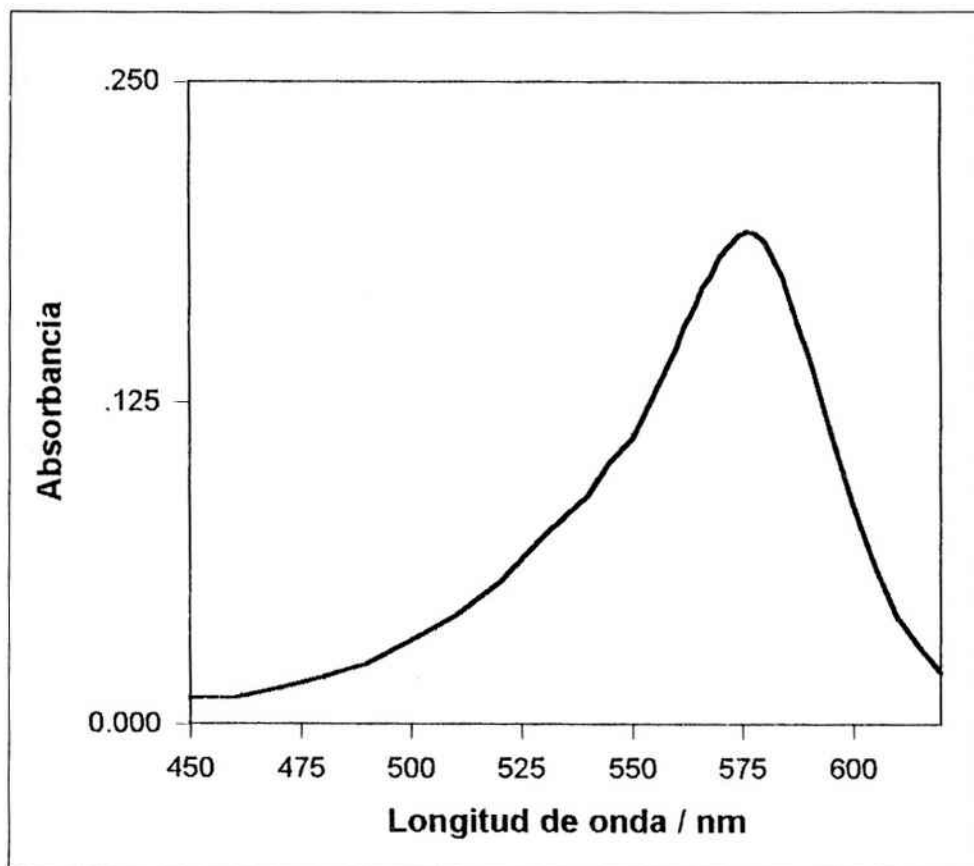
Se realizó un barrido en el rango de luz visible con las soluciones de reactivos (blanco) y del complejo CaCfx (muestra), como se indica en la Figura 1, adoptándose 576 nm como longitud de onda de lectura, dado que se encontró la mayor diferencia de absorbancia entre las mismas.

b) Estabilidad del color

La estabilidad del complejo formado se consiguió luego de 30 segundos, al completarse la reacción, permaneciendo estable durante el tiempo ensayado de 3 horas.

c) Linealidad

Se ensayaron soluciones con concentraciones entre 0 y 140 mg/l. Se obtuvieron respuestas lineales hasta una concentración de 120 mg/l. Este rango

Figura 1: Espectro de absorción del complejo CaCfx contra blanco de reactivo.

puede ampliarse utilizando programas de ajuste para la confección de la curva de calibrado.

d) Interferencia del magnesio

Considerando que las muestras analizadas en las condiciones del ensayo, tanto para jugos como para cremogenados, pueden tener una concentración de magnesio de 30 a 80 mg / l, se estudió la interferencia que podía tener este catión sobre la determinación de calcio. Para ello se prepararon muestras de 50.0 mg / l de calcio, con concentraciones crecientes de magnesio, para lo cual se utilizó una solución patrón de magnesio de 1.000 mg / l, preparada a partir de un "Titrisol" MERCK, de 1.000 g +/- 0.002, llevado a 1000.00 ml con agua destilada. Se partió de un reactivo complejante con

0.69 mmol de 8-hidroxiquinoleína (5) y se observó que el magnesio empezaba a interferir a partir de los 60 mg / l. Se duplicó entonces la cantidad de 8-hidroxiquinoleína (1.38 mmol), y la interferencia se produjo a concentraciones superiores a 100 mg / l de magnesio. Se cuadruplicó la cantidad inicial (2.76 mmol), y la interferencia se produjo a concentraciones de magnesio por encima de los 140 mg/l. Finalmente y con el propósito de darle mayor versatilidad a la técnica, por ejemplo: trabajar con soluciones más concentradas de cenizas clorhídricas en caso que sea necesario, se llegó a la cantidad de 8-hidroxiquinoleína indicada en la preparación de reactivos. Con este reactivo no se observó interferencia del magnesio hasta una concentración de 240 mg/l, como se aprecia en los valores indicados en la Tabla 1.

Tabla 1: Concentración de calcio obtenida con distintas cantidades de magnesio agregado.

Mg (mg/l)	0	40	80	120	160	200	240
Ca (mg/l)	50.0	50.8	50.2	50.3	49.5	50.0	50.0

e) Reproducibilidad

Se hicieron diez (10) determinaciones sobre una muestra, obteniéndose los siguientes valores estadísticos: valor medio: 59.2 mg /l; desviación standard (s)=: 1.1 mg /l; coeficiente de variación /cv: 1.86 %

f) Ensayo de recuperación de calcio

Sobre una muestra de 22.8 mg/l, se agregaron incrementos de calcio obteniéndose un rango de recuperación entre 99.4 y 101.3 % para los datos indicados en la Tabla 2.

Tabla 2: Datos del ensayo de recuperación de calcio (mg/l).

Conc. esperada	I) 34.4	II) 45.7	III) 56.8
Conc. medida	I) 34.6	II) 45.1	III) 56.8

g) Comparación con el método de Absorción Atómica

g₁) Se analizaron tres (3) muestras de jugos y tres (3) de cremogenados por el método propuesto (triplicados de cada muestra) y por absorción atómica.

Condiciones de trabajo en el método de absorción atómica:

Longitud de onda: 422.7 nm

Ancho de banda: 0.7 nm

Rango lineal: hasta 5 mg / l

Gases utilizados: aire - acetileno

Se realizaron las diluciones apropiadas de las muestras y se agregó lantano en una concentración de 0.1 % p/v .

Se obtuvieron los resultados indicados en la Tabla 3.

Tabla 3: Datos de comparación entre el método espectrofotométrico y el de absorción atómica.

Muestra	Mét. espectrofotométrico (mg / l)	Absorción atómica (mg / l)
Jugos	54.0	51.8
	30.4	31.6
	45.4	46.5
Cremogenados	122.5	116.1
	116.4	109.3
	95.4	101.8

Las desviaciones porcentuales con respecto al método de absorción atómica fueron de: -2.4 a + 4.2 % para jugos y de -6.3 a + 6.5 % para cremogenados.

g₂) Se hicieron diez (10) determinaciones de

calcio sobre una misma muestra utilizando absorción atómica y el método espectrofotométrico propuesto, obteniéndose los datos estadísticos informados en la Tabla 4.

Tabla 4: Comparación de métodos para la determinación de calcio.

Variable	Absorción atómica	Mét. espectrofotométrico
media (x)	31.4 mg/l	31.8 mg/l
desviación standard (s)	0.25 mg/l	0.46 mg/l
coef. de variación (c.v.)	0.80 %	1.45 %

Para evaluar precisión y exactitud entre ambos métodos se realizaron pruebas de hipótesis: de comparación de variancias o prueba F (de Fisher) y de comparación de promedios o prueba t (utilizando la t de Student), aceptándose las mismas con $p = 0.042$ y $p = 0.013$, respectivamente.

Conclusiones

El método espectrofotométrico propuesto presenta las siguientes características: es preciso y exacto de acuerdo a los resultados satisfactorios obtenidos en las pruebas de hipótesis F y t. Además es rápido, económico, utiliza poco volumen de muestra, y los reactivos son fáciles de preparar y estables en el tiempo, requiriendo de un equipamiento accesible a un laboratorio de mediana y aún baja complejidad.

Agradecimientos

Se agradece al Lic. en Química Darío U. Campagnoli del Laboratorio Central de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional del Litoral, por la realización de los análisis de calcio por el método de absorción atómica que se mencionan en el trabajo.

Bibliografía

- 1- International Federation of Fruit Juice Producers I.F.F.J.P. Analysis. 1985. Métodos N° 33 y N° 34.
- 2- Association of the German Fruit Juice Industry -Bonn. "RSK-Values The Complete Manual". 1987. Druckerei Hachenburg (Hachenburg, W Germany), 80-82.
- 3- Horwitz W., Albert R., Deutch M. y Neville Thompson J. 1992 Precision Parameters of Methods of Analysis Required for Nutrition Labeling. Part II. Macro Elements-Calcium, Magnesium, Phosphorus, Potassium, Sodium, and Sulfur. J. AOAC International **74**, 1:227-236.
- 4- Rojkin M.L. y Mariani M.C.O. 1973. Determinación de calcio sérico y urinario utilizando cresolftaleincomplexona. Bioquímica Clínica **VII**, 4: 405-413.
- 5- Robles, J.C. 1989. Patente con la Sociedad de Bioquímicos de Santa Fe, para la producción de equipos diagnósticos para la determinación de calcio sérico y urinario.
- 6- Ringbom A. 1979. "Formación de complejos en Química Analítica". Editorial Alhambra. Madrid. pág 427.
- 7- Hulanicki A., Glab S. y Ackermann, IUPAC-International Union of Pure and Applied Chemistry. 1983. Complexometric Indicators: Characteristics and Applications. Pure & Appl. Chem., **55**, 7, 1:1137-1230.
- 8- Bernardi C. M., Ferraro M. R., Baigorria C., Zannier M., Minetti M., Rozycki V. y Drescher R.W. 1991. Características químicas de cremogenados de naranjas argentinas. Su utilidad en la detección de adulteraciones. Rev. Agroquim. Tecnol. Aliment. **31**, 4: 566-572.
- 9- Goicoechea H., Mantovani V., Robles J.C., Sanchis J.C., Vaira S. y otros. 1997. Introducción a la detección de adulteraciones en jugo de naranja aplicando regresión lineal múltiple. Revista Latinoamericana de la Alimentación. Enviada a publicación.