

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA



DETERMINACIÓN DE CALCIO EN LECHE DE VACA FORTIFICADA POR
EL MÉTODO DE VALORACIÓN REDOX
TRABAJO DE GRADO EN MODALIDAD DIPLOMADO DE ESPECIALIZACIÓN

TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR:

ANA MERCEDES REINA OLIVA

WILFREDO ANTONIO REYES VILLALTA

PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIADO(A) EN QUÍMICA Y FARMACIA

OCTUBRE 2024

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

MAESTRO JUAN ROSA QUINTANILLA

SECRETARIO GENERAL

LICENCIADO PEDRO ROSALÍO ESCOBAR CASTANEDA

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA

DECANA

MAESTRA NANCY ZULEYMA GONZÁLEZ SOSA

SECRETARIA

LICENCIADA EUGENIA SORTO LEMUS

DIRECCIÓN GENERAL DE PROCESOS DE GRADO

DIRECTORA GENERAL (AD-HONOREM)

MAESTRA KATIA LISSETTE MARTÍNEZ DE PALACIOS

TRIBUNAL EVALUADOR

ASESORES

LICENCIADO WALTER EDWIN RECINOS RIVERA

MAESTRO OSCAR RAÚL AVILÉS FLORES

TUTORA

LICENCIADA MARLENE EMPERATRIZ ACOSTA MARTÍNEZ

AGRADECIMIENTOS

El acto de agradecer está estrechamente relacionado con darnos cuenta de lo maravilloso que es la vida al concretizar un sueño, meta, anhelo u objetivo sea este tangible o no.

Agradecer es reconocer que existe una fuerza superior a nosotros que nos ayudó a lo largo de nuestro camino, reconocer es saber que sin esa fuerza superior nuestro anhelo hubiera tardado un poco más de tiempo en materializarse; pero como hemos escuchado en algunos momentos o a nuestros amigos la frase siguiente: “Los tiempos de Dios son perfectos”.

El tiempo, sí bien es cierto que es una variable de medición, a lo largo de la vida corremos por hacer las cosas “con tiempo”; pero, como dijo el gran Albert Einstein, “«Cuando cortejas a alguien una hora parece un segundo, pero cuando te sientas sobre carbón al rojo vivo un segundo parecerá una hora. Eso es la relatividad».

Era en mi actual tiempo que tenía finalizar esta meta que inicié en mis tiempos de adolescente, así estaba en mi libro de la vida o en el destino como dicen otros. Pero de lo que estoy segura es que la vida me puso a las personas y situaciones precisas para llevar a feliz término esta Carrera Universitaria. ¡Gracias Mamá! ¡Gracias Papá! Gracias al ser superior que pone orden en el Universo, y me doy Gracias a mí, porque creí en mí y en mi potencial.

Ana Mercedes Reina Oliva

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, a Dios todo poderoso por ser mi apoyo y consuelo en los momentos difíciles de la carrera y darme esa energía y voluntad para seguir adelante en los momentos de flaqueza y así poder culminar la carrera.

A mi madre Blanca Adela Villalta, porque siempre me inculco que la preparación académica es importante en la vida de las personas, tuvo fe en mí, y ha sido y es mi mayor motivación en la obtención de mi meta.

A mis hermanos por apoyarme en momentos de flaqueza, motivarme a llegar a la meta y ayudarme cada vez que lo necesite a lo largo de la carrera, sin la ayuda de ellos no hubiese podido culminar mi meta.

A mi hermano José Eduardo Lovos Villalta, por apoyarme y asesorarme, en la elaboración de documentos, en el transcurso de la carrera.

Finalmente, agradecer a las personas en general que directa o indirectamente fueron parte importante en la culminación de mi meta, tanto a profesores, compañeros de estudio, y personal de laboratorio de la Facultad y biblioteca, que siempre estuvieron en disposición de ayudarme.

Wilfredo Antonio Reyes Villalta

ÍNDICE GENERAL

Pág N°

RESUMEN

CAPÍTULO I

1.0 INTRODUCCIÓN	12
-------------------------	-----------

CAPITULO II

2.0 OBJETIVOS	15
----------------------	-----------

2.1 OBJETIVO GENERAL	15
----------------------	----

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
---------------------------	----

CAPÍTULO III

3.0 MARCO TEÓRICO	17
--------------------------	-----------

3.1 Leche	17
-----------	----

3.1.1 Tipos de leche	17
----------------------	----

3.1.2 Animales productores de leche	19
-------------------------------------	----

3.1.3 Variedades de leche	19
---------------------------	----

3.1.4 Propiedades de la leche	21
-------------------------------	----

3.1.5 Propiedades Físicas	21
---------------------------	----

3.1.6 Propiedades Químicas.	21
-----------------------------	----

3.1.7 Propiedades Nutricionales	22
---------------------------------	----

3.2 Calcio	22
------------	----

3.2.1 Definición	22
------------------	----

3.2.2 Requerimientos de calcio en el organismo a lo largo de la vida	24
--	----

3.2.3 Necesidades de ingesta de calcio en hombres y mujeres	24
---	----

3.2.4 Fuentes naturales de calcio	26
-----------------------------------	----

3.2.5 Toxicidad	26
-----------------	----

3.3 Normas Nacionales e Internacionales	27
---	----

3.4 Análisis Volumétrico	27
--------------------------	----

3.4.1 Tipos de reacciones en volumetría	28
---	----

3.4.2 Valoraciones Oxido-Reducción	28
------------------------------------	----

3.4.3 Indicadores REDOX	29
-------------------------	----

3.4.4 Clasificación de las valoraciones oxido-reducción	30
---	----

CAPITULO IV

4.0 PRODUCTO FINAL

DETERMINACIÓN DE CALCIO EN LECHE DE VACA FORTIFICADA 33

4.1 Introducción 33

4.2 Objetivos. 34

4.3 Método de análisis y fundamento 34

4.4 Información general de la muestra 35

4.4.1 Tipo de matriz: 35

4.4.2 Información del muestreo: 35

4.4.3 Almacenamiento de la muestra: 35

4.5 Reactivos y disoluciones 35

4.6 Materiales y Equipos. 36

4.7 Procedimiento 37

4.7.1 Preparación de la muestra: 37

4.7.2 Toma de muestra del ensayo: 37

4.7.3 Precipitación de sustancias proteicas: 37

4.7.4 Precipitación del calcio como oxalato y separación del oxalato: 37

4.7.5 Valoración: 38

4.7.6 Ensayo en blanco: 38

4.8 Cálculos. 38

4.8.1 Calcular el contenido de calcio Ca expresado en porcentaje: 38

4.8.2 Cálculo para preparar 500 ml de KMnO_4 0.0200N. 39

4.8.3 Cálculo de porcentaje diario de calcio en un alimento. 40

4.9 Normas nacionales e internacionales que referencian el calcio en la leche. 40

4.9.1 Normas nacionales 40

4.9.2 Normas internacionales. 40

CAPITULO V

5.0 CONCLUSIONES 44

CAPITULO VI

6.0 RECOMENDACIONES 46

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANEXOS

INDICE DE TABLAS

Tabla N°		Pág. N°
1	Colores de indicadores redox	29
2	Factor de corrección, f , en función del contenido de grasa de la muestra	38
3	Cantidad de calcio en leche contenida en 100 gramos de alimento	39

INDICE DE ANEXOS

Anexo N°

- 1 Marcha analítica para la determinación de calcio en leche.
- 2 Ejemplo de cálculos para determinar la cantidad de calcio en etiquetas de productos de leche.
- 3 Procedimiento para la determinación de calcio en leche establecido por la federación internacional de lechería (FIL).
- 4 Ingesta diaria de calcio en diferentes regiones del mundo, 1987 – 1989.

RESUMEN

El calcio es el mineral más abundante y de mayor importancia del cuerpo humano, este no se produce de manera natural en el organismo, sino que se obtiene de alimentos que contienen el mencionado mineral.

Uno de los alimentos con mayor concentración de calcio es la leche de vaca. Este producto se encuentra de formas variadas en el mercado y existen diferentes marcas que lo comercializan. Por tal motivo realizar un análisis alimentario para cuantificar y determinar la cantidad de calcio a uno de estos productos, ayudará a determinar si la cantidad de calcio establecido por el fabricante cumple con lo etiquetado.

En el presente trabajo se ha elaborado una guía de laboratorio, para determinar el porcentaje de calcio en productos lácteos que se encuentran en el mercado actualmente, específicamente “*la leche*”, el método es aplicable a todas las leches normales, fortificadas, diluidas, concentradas y en polvo.

Además, se han establecido las fórmulas matemáticas necesarias para calcular el porcentaje de leche y se han determinado los parámetros de comparación establecidos por instituciones internacionales oficiales como el Instituto De Nutrición De Centroamérica y Panamá (INCAP), para referenciar los valores que se lleguen a obtener, por parte de las personas que lleven a la práctica la guía de laboratorio.

Finalmente hay que mencionar que el método de análisis para cuantificar la cantidad de calcio en la leche es el método de valoración Oxido-Reducción (Redox) el cual es un método normalizado por la Organización Internacional Normalizadora (ISO por sus siglas en inglés) y aceptado por la Federación Internacional de Lechería (FIL). Con este procedimiento se puede determinar si lo etiquetado en el producto cumple o no con lo etiquetado y con los parámetros que establecen las instituciones internacionales como la INCAP.

CAPÍTULO I

1.0 INTRODUCCIÓN

En primer lugar, por sus características nutricionales. La leche es un alimento nutricionalmente muy completo, compuesta en promedio de un 87% de agua, 4 a 5% de lactosa, 3% de proteínas, 3 a 4% de grasa, 0,8% de minerales y 0,1% de vitaminas, si bien su composición puede variar en función de factores tales como la genética de los animales, las condiciones ambientales, la etapa de lactancia y el estado nutricional del animal. Sus proteínas son de excelente calidad, con un perfil de aminoácidos balanceado y elevada digestibilidad y biodisponibilidad. Contiene tanto vitaminas liposolubles (A, D y E) como hidrosolubles (complejo B y vitamina C), si bien el contenido de vitaminas liposolubles disminuye drásticamente luego del descremado. En cuanto a su composición mineral, la leche tiene un contenido promedio de calcio de aproximadamente 1.200 mg/L, lo que implica que el consumo de una porción de 250 ml de leche aporta alrededor de 1/4 del requerimiento de calcio diario de un individuo adulto. La leche enriquecida o fortificada es aquella cuyo contenido en calcio ha sido incrementado. En el mercado se pueden encontrar leches con una cantidad de 160 mg de calcio por cada 100 ml, por lo que un vaso de leche aporta el 40 % de la cantidad diaria recomendada.

En este sentido, el consumo de lácteos de 2 a 3 veces al día en el marco de una alimentación variada y equilibrada aporta gran parte de las cantidades de calcio recomendadas, pudiendo alternarse entre las distintas variedades de lácteos presentes en el mercado.

El Calcio es uno de los principales micronutrientes de la leche, la importancia de saber cuándo es el consumo adecuado diariamente es indispensable para poder tener una dieta equilibrada.

La leche y sus derivados son alimentos fundamentales durante todas las etapas de la vida dentro de una dieta occidental equilibrada. En las últimas décadas, su consumo ha disminuido notablemente y de forma paralela se ha detectado un aumento de algunas alteraciones provocadas por la carencia de micronutrientes presentes en los productos lácteos, principalmente calcio.

Partiendo desde el concepto “fortificada”, podemos resaltar que este término es usado, en el mundo alimenticio, para resaltar que un alimento fue modificado a través de ciertos procesos con el objetivo de agregar nutrientes extras que normalmente no trae consigo.

Dentro de los objetivos primordiales de este trabajo es revisar la importancia que tiene el consumo del calcio de la leche, su determinación y el procedimiento a seguir para la determinación de calcio de leche fortificada de vaca. Con la ayuda de una marcha analítica se describirá paso a paso como realizar la preparación de la muestra, el desarrollo del método de valoración a seguir para la determinación de calcio en la leche de vaca fortificada. Así también, se establecerán formulas y cálculos para la cuantificación del analito en interés.

CAPITULO II

2.0 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar calcio en leche de vaca fortificada por el método de valoración redox.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar los métodos existentes para la cuantificación de calcio en leche de vaca fortificada.
- Elaborar el procedimiento que se debe seguir, para la cuantificación de calcio en leche de vaca fortificada.
- Describir el proceso de preparación de las muestras de leche de vaca fortificada para su análisis.
- Establecer la expresión matemática para calcular el porcentaje de calcio en la leche.
- Compilar parámetros establecidos por instituciones nacionales e internacionales oficiales con respecto a los valores de calcio que debe contener la leche de vaca.

CAPÍTULO III

3.0 MARCO TEÓRICO

3.1 Leche (5)

Se puede definir la leche de forma general desde los siguientes puntos de vista:

- Biológico: es una sustancia segregada por la hembra de los mamíferos con la finalidad de nutrir a las crías.
- Legal: producto del ordeño de un mamífero sano y que no representa un peligro para el consumo humano.
- Técnico o fisicoquímico: sistema en equilibrio, constituido por tres sistemas dispersos: solución, emulsión y suspensión.

3.1.1 Tipos de leche:

Leche pasteurizada: la leche de vaca entera, semidescremada o descremada, que ha sido sometida a un proceso de calentamiento en condiciones de temperatura y tiempo que aseguren la total destrucción de la microflora patógena y casi la totalidad de la microflora no patógena. El tratamiento térmico de la leche pasteurizada es de 72 a 75 °C durante 15 a 20 segundos o su equivalente.

Leche ultra pasteurizada: la leche de vaca entera, semidescremada o descremada, que ha sido sometida a un proceso de calentamiento o en condiciones de temperatura y tiempo que aseguren la total destrucción de la microflora patógena y casi la totalidad de la microflora no patógena. El tratamiento térmico de la leche ultra pasteurizada debe ser de 135 a 140 °C por un tiempo mínimo de 2 a 4 segundos o su equivalente.

Leche homogenizada: la leche pasteurizada o ultra pasteurizada que ha sido sometida a un tratamiento fisicomecánico apropiado para romper la columna de grasa tan finamente que no pueda volver a unirse y luego separarse en forma de crema o nata.

Leche entera pasteurizada o ultra pasteurizada: la leche de vaca cuyo contenido de grasa mínimo es de 3,0 % m/m.

Leche semidescremada pasteurizada o ultra pasteurizada: la leche de vaca cuyo contenido de grasa es mayor de 0,15 % y menor 3,0 % m/m.

Leche descremada pasteurizada o ultra pasteurizada: La leche de vaca cuyo contenido de grasa es menor o igual a 0,15 % m/m.

Leche fortificada (10): La leche de vaca pasteurizada o ultra pasteurizada que ha sido adicionada con vitaminas A y D, y nutrientes para reforzar su valor nutritivo.

Pasteurización o ultra pasteurización: El proceso por el cual se somete la totalidad de la leche a una temperatura conveniente durante el tiempo especificado para destruir la totalidad de los microorganismos patógenos y la mayor parte de la microflora no patógena, seguido de un enfriamiento rápido, sin que sus componentes sufran alteraciones sensibles en su valor nutritivo, ni en sus propiedades organolépticas y fisicoquímica.

Homogenización: El proceso mediante el cual se fracciona los glóbulos de grasa de la leche para una distribución más uniforme, evitando una separación de grasa en el producto final. Leche pasteurizada con sabor: es el producto elaborado con no menos del 90 % de leche fluida o leche reconstituida (entera, descremada o semidescremada), apta para consumo humano que responda a las exigencias de la presente norma, adicionada de sustancias saborizantes, naturales o sintéticas de uso permitido (con excepción de sabor artificial de leche y/o crema), y sometida a tratamiento térmico adecuado.

La capacidad de producir leche es una de las características que definen a los mamíferos. La principal función de la leche es la de nutrir a los hijos hasta que son capaces de digerir otros alimentos. Además, cumple las funciones de proteger el tracto gastrointestinal de las crías contra patógenos, toxinas e inflamación y contribuye a la salud metabólica regulando los procesos de obtención de energía, en especial el metabolismo de la glucosa y la insulina. Es el único fluido que ingieren las crías de los mamíferos. La leche de la vaca forma parte de la alimentación humana corriente en la inmensa mayoría de las civilizaciones: de vaca, principalmente, pero también de oveja, cabra, yegua, camella, etc. El líquido es producido por las células secretoras de las glándulas mamarias o mamas. La secreción láctea de una hembra, días antes y después del parto se llama calostro.

Es muy frecuente el empleo de los derivados de la leche en las industrias agroalimentarias, químicas y farmacéuticas en productos como la leche condensada, leche en polvo, caseína o lactosa. La leche de vaca se utiliza también en la alimentación animal. Está compuesta

principalmente por agua, iones (sal, minerales y calcio), hidratos de carbono (lactosa), materia grasa y proteínas.

3.1.2 Animales productores de leche (5).

Actualmente, la leche que más se utiliza en la producción de derivados lácteos es la de vaca (debido a sus propiedades, productividad, agradable sabor, fácil digestión, así como la gran cantidad de derivados obtenidos). La leche proveniente de la vaca (*Bos taurus*) es la más importante para la dieta humana y la que tiene más aplicaciones industriales. La leche de vaca de la raza Holstein es la que se emplea con mayor frecuencia en las granjas lecheras.

3.1.3 Variedades de leche.

La leche pasteurizada es la que ha sido esterilizada mediante un calentamiento, seguido de un enfriamiento rápido. - Leche fluida (entera): Se entiende con este nombre a la leche a granel higienizada, enfriada y mantenida a 5°C, sometida opcionalmente a terminación, pasteurización y/o estandarización de materia grasa, transportada en volúmenes de una industria láctea a otra para ser procesada, envasada y almacenada bajo normas estrictas de higiene. La leche fluida entera puede ser sometida a procedimientos de higienización por calor. Procesos de ultra alta temperatura (UAT o UHT), que consisten en llevar la leche homogenizada a temperaturas de 130° a 150°C durante 2 a 4 segundos, permiten higienizarla de forma apropiada y de manera que estas puedan llegar en forma segura e inocua al consumidor. Las leches pueden ser modificadas en su contenido graso.

Componentes de la leche: (15)

La lactosa es el hidrato de carbono mayoritariamente (98%) que contiene la leche y por causa de la acción de algunas bacterias acidificantes se transforma en ácido láctico, obteniendo como producto final leches fermentadas y yogur. Para poder ser digerido necesita la lactasa, una enzima que se secreta en el intestino delgado. Si hay déficit o disminución de la producción de esta enzima, no se absorberá ni se digerirá correctamente la lactosa, hasta el punto en el que pueden aparecer diarreas características, que son la manifestación primordial de la intolerancia a la lactosa. La leche contiene proteínas de alto valor biológico como la caseína (78% del total de proteínas) de donde se obtiene el cuajo, y seroproteínas (17% del

total de proteínas) como lactoglobulina, lactoalbúmina o inmunoglobulinas de donde se obtienen la cuajada o el queso fresco.

También contiene enzimas, como la lipasa (responsable del sabor y olor a rancio), proteasas (responsables de la formación de la cuajada) y fosfatasa alcalinas (indicador de una correcta pasteurización). Contiene vitaminas A, D, E y las vitaminas del grupo B sobre todo la B2 y B12, (pero es pobre en vitamina C) y un alto contenido de Calcio, (para conseguir una correcta absorción del Calcio es necesaria la vitamina D3).

Beneficios de la leche en el organismo humano. (15) La leche es el alimento más completo debido a que aporta muchos nutrientes necesarios en la dieta del ser humano, pero es deficiente en hierro, fibra y en algunas vitaminas como la vitamina C. La leche es nutritivamente lo contrario a un alimento que aporta “calorías vacías”. Es un alimento muy apropiado, por su alto contenido en nutrientes, para situaciones en que se estén formando nuevos tejidos en el organismo, como: crecimiento en los niños y adolescentes, embarazo y periodo de lactancia, intervenciones quirúrgicas no digestivas, heridas graves y traumas o fracturas óseas.

Leche de vaca (15)

Es el producto íntegro, no alterado ni adulterado, de la secreción de las glándulas mamarias de las hembras del ganado bovino obtenida por el ordeño higiénico, regular, completo e ininterrumpido de vacas sanas y libre de calostro; que no ha sido sometida a ningún tratamiento a excepción del filtrado y/o enfriamiento, y está exento de color, olor, sabor y consistencia anormales. Se clasifica entre los alimentos animales y se distingue de estos porque sólo ella contiene una cantidad relativamente grande de un hidrato de carbono, la lactosa. Forma parte de los alimentos más fácilmente tolerables y digeribles, y atendiendo a su valor nutritivo y poder calorífico corresponde a los alimentos más económicos; no precisa para su consumo ninguna preparación anterior, si no que sale de las ubres, disponible para ser consumida. Es alimento y bebida al mismo tiempo y contiene todas las sustancias nutritivas indispensables en relación siempre a la edad de los jóvenes mamíferos, para los niños de pecho, la leche de vaca es el más importante y más empleado sustituto de la leche materna.

Propiedades de la leche de vaca (15).

La leche obtenida en las circunstancias usuales es de color blanco intenso, completamente opaca, transparente en capas muy delgadas y presenta una fluidez uniforme, siendo menos movible que el agua. Posee un olor débil, sabor suave, pastoso y débilmente azucarado.

3.1.4 Propiedades de la leche (5)

3.1.5 Propiedades Físicas

La leche de vaca tiene una densidad media de 1,032 g/ml. Es una mezcla compleja y heterogénea compuesta por un sistema coloidal de tres fases:

- Solución: los minerales y los hidratos de carbono se encuentran disueltos en el agua.
- Suspensión: las sustancias proteicas se encuentran con el agua en suspensión.
- Emulsión: la grasa en agua se presenta como emulsión. Contiene una proporción importante de agua (cerca del 87%).

El resto constituye el extracto seco que representa 130 gramos (g) por litro y en el que hay de 35 a 45 g de materia grasa. Otros componentes principales son los glúcidos como la lactosa, las proteínas y los lípidos. Los componentes orgánicos (glúcidos, lípidos, proteínas, vitaminas), y los componentes minerales (Ca, Na, K, Mg, Cl). La leche contiene diferentes grupos de nutrientes. Las sustancias orgánicas (glúcidos, lípidos, proteínas) están presentes en cantidades más o menos iguales y constituyen la principal fuente de energía. Estos nutrientes se reparten en elementos constructores, las proteínas, y en compuestos energéticos, los glúcidos y los lípidos.

3.1.6 Propiedades Químicas.

El pH de la leche es ligeramente ácido (pH comprendido entre 6,6 y 6,8). Otra propiedad química importante es la acidez, o cantidad de ácido láctico, que suele ser de 0,15-0,16% de la leche. Las sustancias proteicas de la leche son las más importantes en el aspecto químico. Se clasifican en dos grupos: proteínas (la caseína se presenta en 80% del total proteínica, mientras que las proteínas del suero lo hacen en un 20%), y las enzimas. La actividad

enzimática depende de dos factores: la temperatura y el pH; y está presente en todo el sistema de diversas formas. La leche se sintetiza fundamentalmente en la glándula mamaria, pero una gran parte de sus constituyentes provienen del suero de la sangre. Su composición química es muy compleja y completa, lo que refleja su gran importancia en la alimentación de las crías. La composición de la leche depende de las necesidades de la especie durante el periodo de crianza. La memoria de las enfermedades que la madre ha sufrido suele ser muy abundantes en el calostro (hasta 100g/L).

3.1.7 Propiedades Nutricionales (15).

Su diversificada composición, en la que entran grasas (donde los triglicéridos son la fracción mayoritaria con el 98% del total lipídico y cuyos ácidos grasos que los forman son mayormente saturados), proteínas, (caseína, albúmina y proteínas del suero) y glúcidos (lactosa, azúcar específica de la leche), la convierten en un alimento completo. Además, la leche entera de vaca es una importante fuente de vitaminas (vitaminas A, B, D3, E). La vitamina D es la que fija el fosfato de calcio a dientes y huesos, por lo que es especialmente recomendable para niños. El calostro es un líquido de color amarillento, rico en proteínas y anticuerpos, indispensables para la inmunización del recién nacido.

3.2 Calcio. (5, 16, 17)

3.2.1 Definición

El calcio es un elemento químico, de símbolo Ca y de número atómico 20. Se encuentra en el medio interno de los organismos como ion calcio (Ca^{2+}) o formando parte de otras moléculas; en algunos seres vivos se haya precipitado en forma de esqueleto interno o externo. Los iones de calcio actúan de cofactor en muchas reacciones enzimáticas, intervienen en el metabolismo del glucógeno, y junto al potasio y el sodio regula la contracción muscular. El porcentaje de calcio en los organismos es variable y depende de las especies, pero por término medio representa el 2,45% en el conjunto de los seres vivos. El calcio actúa como mediador intracelular cumpliendo una función de segundo mensajero; por ejemplo, el ion Ca^{2+} interviene en la contracción de los músculos y es imprescindible para la coagulación de la sangre. También está implicado en la regulación de algunas enzimas quinasas que realizan funciones de fosforilación, por ejemplo, la proteína quinasa C (PKC),

y realiza unas funciones enzimáticas similares a las del magnesio en procesos de transferencia de fosfato (por ejemplo, la enzima fosfolipasa A2). El calcio se presenta en los huesos bajo la forma de hidroxiapatita, una estructura cristalina que consiste en fosfato de calcio que se arregla alrededor de una matriz orgánica de proteína colagenasa para proporcionar fuerza y rigidez. Los iones minerales se difunden dentro del líquido extracelular, bañando los cristales y permitiendo el depósito de nuevos minerales. Los mismos tipos de cristales se presentan en el esmalte y la dentina de los dientes, allí hay poco intercambio de minerales y el calcio no está disponible con facilidad para los periodos de deficiencia. El calcio se absorbe principalmente en el duodeno y también a lo largo del tracto gastrointestinal. La absorción ocurre por dos métodos principales: un sistema de transporte saturable, activo, ocurre en duodeno y yeyuno proximal y controlado mediante la acción de la vitamina D3 o 1,25 (OH) 2D3 (Vitamina D activa), esta vitamina actúa como una hormona y aumenta la captación de calcio en el borde en cepillo de la célula de la mucosa intestinal al estimular la producción de una proteína que se une al calcio. Un segundo mecanismo de transporte es pasivo, no saturable e independiente de la vitamina D, ocurre a lo largo de todo el intestino. Además de su función en la construcción y mantenimiento de huesos y dientes, el calcio también tiene otras funciones metabólicas. Afecta la función de transporte de las membranas celulares, actuando como un estabilizador de membrana. También influye en la transmisión de iones a través de las membranas, y la liberación de neurotransmisores. Se requiere calcio en la transmisión nerviosa, en la regulación de los latidos cardíacos, el equilibrio adecuado de los iones mantiene el tono muscular y controla la irritabilidad de los nervios.

La falta de Calcio es una de las causas principales de la osteoporosis. La osteoporosis es una enfermedad caracterizada por una fragilidad de los huesos producida por una menor cantidad de sus componentes minerales, lo que disminuye su densidad. Dentro de los huesos se desarrolla una gran actividad biológica, continuamente los huesos se están renovando y el tejido óseo viejo se está reemplazando por tejido nuevo. Durante la niñez y la adolescencia se crea más tejido óseo del que se destruye y entre las edades comprendidas de 30 a 35 años, el proceso se invierte y se empieza a perder más tejido óseo del que se puede reemplazar, en 24 las mujeres al llegar la menopausia (cesación natural de la menstruación) se acelera este proceso porque los ovarios dejan de producir la hormona femenina conocida como estrógeno, hormona femenina encargada de preservar la masa ósea. Las personas en condiciones

normales de Calcio requerido en su organismo necesitan consumir alrededor de 1,000 miligramos (mg) diarios de Calcio para preservar la masa ósea, tanto para hombres como para mujeres que no han llegado a la menopausia, al llegar y al pasar de esta etapa se necesitan aproximadamente 1,500 mg de Calcio diarios. En una dieta de 2000 calorías, el valor porcentual diario de Calcio se basa en una necesidad de 1000 mg al día. Si un elemento de un alimento proporciona el 25 por ciento del valor diario de calcio, éste contiene 250 mg de Calcio por porción. El hueso es el lugar de almacenamiento del Calcio del organismo y cede continuamente Calcio a la sangre, que lo distribuye al corazón, al músculo y al sistema nervioso. Cuando no hay suficiente Calcio en la sangre, el organismo lo toma del hueso; el Calcio del hueso es repuesto al tomar alimentos ricos en Calcio en la dieta y así se mantiene el equilibrio entre la sangre y el hueso. (5)

3.2.2 Requerimientos de calcio en el organismo a lo largo de la vida (15)

El calcio es un elemento constitutivo esencial del esqueleto. La ingesta recomendada es de 1 gramo/día durante la fase de crecimiento. En mujeres postmenopáusicas se recomienda hasta 1,5 g/día. Muchas personas de edad no alcanzan siquiera a los 400 mg/día. Ello se debe a un rechazo de los alimentos lácteos, regímenes dietéticos inadecuados, existencia de intolerancia a la lactosa (componente de la leche) en esta edad o a otras causas. El aporte suplementario de calcio dietético es la primera medida preventiva en lo que se refiere a la dieta y debe ser elevado a 1,5 g/día en situaciones especiales como embarazo, lactancia, menopausia, inmovilización prolongada o tratamiento con fármacos que alteren la absorción intestinal de calcio. Esta es, así mismo, la cantidad recomendable para cualquier individuo en riesgo de osteoporosis.

3.2.3 Necesidades de ingesta de calcio en hombres y mujeres. (15)

Tanto las recomendaciones de Estados Unidos como de Canadá para los hombres durante la vida adulta son de 800 mg al día. Para las mujeres la RDA (recomendación diaria alimentaria) es de 800 mg y el patrón dietético canadiense (Canadian Dietary Standard) de 700 mg. Las recomendaciones del Caribbean Food and Nutrition Institute y del Reino Unido son de 500 mg para ambos sexos y las recomendaciones de la FAO/OMS (FAO/ WHO) es de 400 a 500 mg. Al mantener la ración más alta de calcio, el comité del Food and Nutrition Board de los Estados Unidos de Norteamérica afirmó que estaba basado en las pérdidas obligatorias

diarias de 320 mg de calcio al día; suponiendo una absorción del 40 por ciento del calcio en la dieta, se requirieron 800 mg para mantener el equilibrio. Al reconocer que algunos patrones recomiendan ingestas menores, el comité consideró que los estudios que demostraron que esos niveles inferiores podían mantener el equilibrio fueron practicados en países tropicales o semitropicales, con abundante sol y posiblemente con fuentes dietéticas de calcio no reconocidas, y decidieron que no era prudente recomendar dichas ingestas bajas de calcio en los Estados Unidos. El comité canadiense tomó perdidas obligatorias como de 4.3 mg/ kg y también estableció Edades Ingesta de calcio (mg)

Niños y niñas 0-9 meses 500

Niños y niñas 1-2 años 400

Niños y niñas 3-6 años 500

Niños y niñas 7-9 años 800

Hombres 10-65 años 1000

Hombres mayores 65 años 800

Mujeres 10-65 años 1000

Mujeres mayores 65 años 800

La dieta de los Estados Unidos de América tiene un contenido relativamente alto de proteínas y fósforo, lo que sugiere la necesidad de una ingesta elevada de calcio. Aunque una ingesta elevada de calcio puede no aumentar la densidad ósea una vez que se ha desarrollado la osteoporosis, existen evidencias de que cuando la ingesta de calcio es elevada, la retención mejora y se puede aliviar los síntomas. La ingesta de calcio al principio de la vida adulta puede afectar la pérdida ósea a una edad posterior. Si la absorción de calcio se vuelve menos eficiente con la edad, una ingesta más elevada puede ser más segura para el anciano. Por lo tanto, a pesar del hecho de que algunos individuos pueden permanecer en balance con ingestas por debajo de la RDA, el comité consideró prudente mantener la recomendación de 800 mg. (5) Este macromineral es el mineral con mayor presencia en el organismo y el cuarto componente del cuerpo después del agua, las proteínas y las grasas. El calcio corporal total, se aproxima a los 1200 gramos, lo que es equivalente a decir 1,5 a 2% de nuestro peso

corporal. De esto, casi un 99% se concentran en los huesos y dientes el 1% restante se distribuye en el torrente sanguíneo, los líquidos intersticiales y las células musculares. Tanto su carencia como su exceso son perjudiciales para la salud, ya que participa en la coagulación, en la correcta permeabilidad de las membranas y a su vez adquiere fundamental importancia como regulador nervioso y neuromuscular, modulando la contracción muscular (incluida la frecuencia cardíaca), la absorción y secreción intestinal y la liberación de hormonas. Los alimentos con mayor contenido de calcio son los productos lácteos, los frutos secos, las sardinas y las anchoas; ya en menor proporción en legumbres y vegetales verdes oscuros (espinaca, acelga, brócoli). El calcio está vinculado a la presencia de fósforo. La falta o exceso de cualquiera de estos dos macrominerales puede afectar la absorción del otro. A su vez, la absorción del calcio se ve dificultada ante consumos de café, alcohol, falta de Vitamina D, falta de ácido clorhídrico en el estómago, falta de ejercicio y el estrés. Un obvio indicador de carencia de calcio es la osteoporosis. Una de las grandes ventajas que presenta el calcio refiere a su invariabilidad en el tiempo desde el momento en que es envasado hasta el momento de consumo pues el contenido de calcio de los alimentos no se altera en ninguna etapa.

3.2.4 Fuentes naturales de calcio (5)

La fuente principal de calcio es la leche y sus derivados, existiendo aproximadamente 130 mg. de calcio por 100 g. de leche, unos 150 mg por 100g. de yogurt y cantidad variable entre 275 y 1200 mg en los quesos, independientemente de la existencia de grasa en los mismos. También se encuentra en los frutos secos y otros alimentos. Cuando el aporte dietético es insuficiente puede ser necesario el uso de suplementos en forma de carbonato, fosfatos, citrato, lactato y gluconato cálcico. Su administración debe hacerse con precaución en personas con antecedentes de litiasis renal o síntomas sugestivos de hipercalcemia. Por otro lado, también son fuente de calcio: los frutos secos, las legumbres, la yema de huevo, los vegetales de hoja verde, mariscos y sardinas (con sus espinas) entre otros.

3.2.5 Toxicidad. (5,18)

Ingerir cantidades mayores de 2500 mg diarios de Calcio puede neutralizar la absorción de otros minerales necesarios para el organismo como el Hierro o el Zinc; al exceder la ingesta de Calcio, este elemento se deposita en los riñones produciendo cálculos renales.

3.3 Normas Nacionales e Internacionales ^(19,20)

La Norma Salvadoreña NSO 67.01.02:06 tiene por objetivo establecer los tipos, las características y requisitos que deben de cumplir la leche.

Dentro de esta norma encontramos la leche fortificada donde la define como la leche de vaca pasteurizada o ultra pasteurizada que ha sido adicionada con vitaminas A y D, y nutrientes para reforzar su valor nutritivo.

La FAO/OMS desde hace casi 30 años publicaron las ultimas recomendaciones sobre la ingesta de calcio.

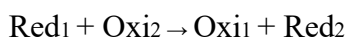
A medida que las cantidades de calcio recomendadas para los países desarrollados han ido aumentando, la brecha entre la ingesta de calcio recomendada y la real en los países en desarrollo se ha ampliado.

Las necesidades de calcio pueden variar de una cultura a otra por razones dietéticas, genéticas, de estilo de vida y geográficas.

Casi todo (99%) de calcio corporal total se encuentra en el esqueleto. El 1% restante se distribuye equitativamente entre los dientes y los tejidos blandos, con solo el 0.1% en el líquido extracelular (LEC).

3.4 Análisis Volumétrico ⁽⁶⁾

La volumetría de oxidación reducción, también conocida como volumetría redox, se basa en reacciones que llevan implícito una transferencia de electrones entre dos sustancias, una de las cuales se reduce (acepta electrones) y la otra, simultáneamente, se oxida (cede electrones). La sustancia que se reduce o acepta electrones se denomina agente oxidante y la que se oxida o cede electrones se denomina agente reductor, es decir, el agente oxidante acepta los electrones que le transfiere el agente reductor. Los métodos volumétricos basados en procesos de oxidación reducción son más numerosos y diversos que los basados en cualquier otro tipo de reacción. En su forma más sencilla, una reacción de oxidación reducción se puede escribir:



El equilibrio de una reacción de oxidación-reducción está determinado por la facultad que tienen los reaccionantes de donar o aceptar electrones; por ello, la mezcla de un oxidante (Oxi2) con alta capacidad para aceptar electrones (oxidante fuerte) con un reductor (Red1) que tenga una alta disposición para cederlos (reductor fuerte) alcanza una posición de equilibrio en que la formación de los productos de reacción (Oxi1 y Red2) está ampliamente favorecida, es decir, desplazada hacia la formación de los productos. Por supuesto, una reacción menos completa ocurrirá cuando esta capacidad para aceptar o ceder electrones en las sustancias reaccionantes sea menor o no sea tan favorable.

3.4.1 Tipos de reacciones en volumetría. (5)

Los tipos de reacciones en que se basan los métodos volumétricos son:

- Reacciones ácido-base.
- Reacciones de oxidación-reducción (REDOX).
- Reacciones de precipitación.
- Reacciones complejométricas

3.4.2 Valoraciones Oxido-Reducción. (5)

Una valoración REDOX está basada en una reacción de oxidación-reducción entre el analito y la sustancia valorante.

Las reacciones en que se transfieren electrones de un átomo, ion o molécula a otro se llaman reacciones de óxido-reducción o REDOX. La oxidación es el proceso en que un átomo, ion o molécula pierde uno o más electrones; la reducción implica ganancia de uno o más electrones por parte de un átomo, ion o molécula. Un agente reductor es una sustancia que pierde uno o más electrones y en este proceso se oxida; un agente oxidante gana uno o más electrones y por ello se reduce, en otras palabras, un reductor es un donador de electrones y un oxidante es un receptor de electrones.

La oxidación y la reducción no pueden tener lugar de forma independiente, sino simultánea por transferencia de electrones desde el donador hasta el receptor.

En el transcurso de una valoración por oxidación-reducción, las concentraciones de las sustancias o iones que participan en la reacción se modifican constantemente. Por consiguiente, también el potencial de oxidación-reducción (E) debe cambiar de la misma manera que en una valoración ácido base cambia todo el tiempo el pH o en valoración por precipitación cambia el pX^- . Así, si las magnitudes de los potenciales de oxidación-reducción (E) en diferentes momentos de una valoración se llevan a un gráfico vs el volumen añadido de la solución valorante, se obtendrán curvas de valoración análogas a las estudiadas para los métodos de neutralización y precipitación.

De la misma forma, una curva de valoración por oxidación-reducción estará caracterizada por los cuatro momentos que tipifican las curvas ácido base y de precipitación, es decir: punto inicial, puntos intermedios, punto de equivalencia y puntos posteriores al punto de equivalencia. (6)

1. Punto Inicial: Cuando aún no se ha añadido volumen alguno de solución valorante.
2. Puntos Intermedios: Cuando la cantidad de sustancia añadida del patrón no es suficiente para completar la reacción.
3. Punto de Equivalencia: Cuando la cantidad de sustancia añadida del patrón valorante se iguala a la cantidad de sustancia inicialmente valorada.
4. Puntos posteriores al Punto de Equivalencia: A partir del punto de equivalencia, cualquier adición del valorante produce una sobrevaloración y la presencia de un exceso de patrón valorante. (6)

3.4.3 Indicadores REDOX (5)

Los indicadores REDOX están dentro de los métodos visuales, para poder percibir el punto final de una valoración, los indicadores REDOX son sustancias intensamente coloreadas capaces de sufrir oxidación o reducción a potenciales característicos.

En la tabla N°1 se indican los colores y los potenciales normales de algunos indicadores REDOX. Algunas de las semirreacciones de los indicadores involucran al ion hidrogeno y los potenciales están en las semirreacciones influenciados por el pH.

Tabla N°1. Colores de indicadores redox¹⁵.

Indicador	Color		Potencial de transición V	Condiciones
	Oxidado	Reducido		
Complejo de 5-nitr-1-10-fenatrolina con hierro (II)	Azul pálido	Rojo violáceo	+1.25	1M H ₂ SO ₄
Ácido 2,3 difenilamina dicarboxílico	Azul violeta	Incoloro	+1.12	7-10M H ₂ SO ₄
Complejo de 1,10 fenatrolina con hierro (II)	Azul pálido	Rojo	+1.11	1M H ₂ SO ₄
Complejo de 5-metil-1,10 fenatrolina con hierro (II)	Azul pálido	Rojo	+1.02	1M H ₂ SO ₄
Erioglaucina A	Azul rojizo	Verde amarillento	+0.98	0.5M H ₂ SO ₄
Ácido definilaminosulfónico	Rojo violáceo	Incoloro	+0.85	Ácido diluido
Difenilamina	Violeta	Incoloro	+0.76	Ácido diluido
<i>p</i> -Etoxicrisoidina	Amarillo	Rojo	+0.76	Ácido diluido
Azul de metileno	Azul	Incoloro	+0.53	Ácido 1M
Tetrasulfonato índigo	Azul	Incoloro	+0.36	Ácido 1M
Fenosafnanina	Rojo	Incoloro	+0.28	Ácido 1M

3.4.4 Clasificación de las valoraciones oxido-reducción. (5)

Las valoraciones REDOX, se clasifican en dos grupos:

1) Oxidimetrías: Son las valoraciones, en las cuales el agente oxidante es la sustancia valorante. Así, los agentes de carácter oxidante pueden ser cualquier al que tenga iones Permanganato, Bromato, Yodato, o Dicromato.

2) Reductometrías: En este tipo de valoraciones, la sustancia que actúa como agente reductor, es el agente valorante, como, por ejemplo, los iones Yoduro, o de Hierro (III). Estas valoraciones son mucho menos utilizadas que las oxidimetrías.

Las oxidimetrías pueden ser:

- Permanganometría: reacción que tiene lugar en medio ácido, siendo una de las valoraciones más usadas. Tiene un característico color violáceo debido al ion Permanganato que pasa a ser ion Manganeso (II), hecho que hace inútil el uso de indicador de color.
- Yodimetría: Reacción donde participa el Yodo como agente oxidante, siendo útil para la valoración de sustancias del tipo de los Tiosulfatos.
- Bromatometría: En este caso, el agente oxidante es el ion Bromato y se trabaja en medio ácido.
- Dicromatometría: El agente oxidante, en este tipo de valoraciones, es el ion Dicromato, también en medio ácido.
- Iodatometría: Reacción con participación del ion Yodato. Se suele usar para estandarizar disoluciones de tiosulfato.

CAPITULO IV

4.0 PRODUCTO FINAL

DETERMINACIÓN DE CALCIO EN LECHE DE VACA FORTIFICADA ⁽³⁾

4.1 Introducción

El calcio es el mineral más abundante del cuerpo humano, se encuentra en alrededor del 2% del peso corporal (1.2 kg aproximadamente). El 99% se encuentra en el esqueleto y los dientes y el 1% está presente; en la sangre, el líquido extracelular, los músculos, en tejidos blandos y fluidos corporales (2). Además, este mineral es utilizado en muchos procesos fisiológicos del organismo, como, por ejemplo, la vasodilatación, la contracción muscular, la contracción vascular, la transmisión nerviosa y la secreción glandular.

A pesar de que el calcio es uno de los minerales de mayor importancia en la nutrición humana, este mineral no es producido por el organismo de forma natural. Por tal motivo debe de absorberse de fuentes externas como, por ejemplo, la ingesta de alimentos, o suplementos que contengan dicho mineral. Uno de los principales alimentos que contiene alto contenido de calcio es la leche de vaca.

El termino de leche se define como, secreción mamaria normal de animales lecheros, obtenida del ordeño del animal y destinada al consumo humano ya sea en forma líquida o elaboración ulterior (14). Este producto como se mencionó anteriormente es uno de los alimentos que contiene mayor cantidad de calcio en su composición y es en la nutrición humana de las principales fuentes de obtención de dicho mineral.

En la presente guía de laboratorio, se realiza el proceso que se debe seguir para cuantificar la cantidad de calcio, en porcentaje, presente en una muestra de leche de vaca fortificada, obtenida de un producto del supermercado.

El método de análisis que se utilizara en la práctica es valoración REDOX, el cual es un método. establecido por la federación internacional de lechería (FIL) y que se encuentra abalado por las normas ISO 12081. Además, al final de la práctica, se establecerán los cálculos a seguir, para obtener el respectivo porcentaje de calcio contenido en la muestra.

Finalmente se investigarán las normas nacionales e internacionales que regulen el contenido de calcio en la leche (si existiesen), para así comparar los resultados obtenidos y determinar si el producto cumple o no con lo establecido en la etiqueta.

4.2 Objetivos.

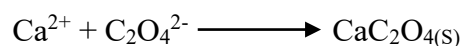
- Determinar el porcentaje de calcio, presente en una muestra de leche de vaca fortificada, obtenida de un supermercado.
- Establecer las fórmulas necesarias para la realización de los cálculos.
- Investigar las normas nacionales e internacionales que establecen los rangos necesarios de calcio en los alimentos.

4.3 Método de análisis y fundamento

El método de análisis a utilizar en la práctica es el método de análisis volumétrico, debido a que se debe realizar la medida exacta del volumen de solución valorante (Solución de Permanganato de Potasio 0.0200N) en la titulación para determinar la concentración en porcentaje de calcio contenido en la muestra. Y el tipo de volumetría involucrado en el proceso, es valoración Oxido Reducción (REDOX), debido a que se ven envueltas, transferencia de electrones entre las sustancias involucradas.

El procedimiento expuesto en este documento corresponde a la norma ISO 12081/IDF 36:2010 de la International Dairy Federation, (IDF), institución que en países de habla hispano se conoce como Federación internacional de Lechería (FIL), y define el contenido de calcio en leche como la cantidad total de calcio expresada en porcentaje en peso.

Y se fundamenta en el hecho de que, el calcio total contenido en una muestra de leche es disuelto con una solución de ácido tricloroacético y luego se filtra, El calcio contenido en la solución se precipita en forma de oxalato de calcio, y se separa por centrifugación. Finalmente, el precipitado se disuelve y se valora con permanganato de potasio (1,3,6,7). Las reacciones involucradas en el proceso son las siguientes:



Se debe mencionar además que el procedimiento planteado aplica a todas las leches líquidas normales, así como a leches reconstituidas por dilución o disolución de leches concentradas y leche en polvo.

4.4 Información general de la muestra

4.4.1 Tipo de matriz:

Leche en estado líquido, contenido en la caja de cartón de 900ml.

4.4.2 Información del muestreo:

La muestra será leche entera de vaca fortificada, de la marca Salud. La cual se adquirió en forma aleatoria en un supermercado, y especifica que contiene 3% de grasa y 45% de calcio.

4.4.3 Almacenamiento de la muestra:

El fabricante recomienda mantener la muestra en refrigeración, a una temperatura no menor de 4.4°C.

4.5 Reactivos y disoluciones

- Ácido acético glacial PA
- Ácido Sulfúrico 96% PA
- Ácido Tricloroacético PA
- Agua destilada PA
- Alcohol etílico 96% V-V PA
- Amoníaco (25% m/m y 0.91 g/ml) PA
- Oxalato de amonio monohidratado PA
- Permanganato de potasio PA
- Disolución de ácido tricloroacético 20% m/V
- Disolución de ácido tricloroacético 12% m/V
- Disolución acuosa saturada en frío de Oxalato de Amonio monohidratado PA
- Disolución de rojo de metilo (Pesar 0.05g de rojo de metilo y disolver en 100 ml de alcohol etílico al 96% V-V. PA)

- Disolución acuosa de ácido acético al 20% V-V Úsese Ácido Acético glacial PA y diluir convenientemente.
- Disolución de amonio al 50% V-V: mezclar volúmenes iguales de amoniaco al 25% PA y agua destilada PA.
- Disolución de Amonio 2%: Medir 2 ml de Amonio 25% m/m PA y llevar a 100 ml con agua destilada PA
- Disolución de Ácido Sulfúrico 20% m/V: Medir 20 ml de Ácido Sulfúrico 96% m/m PA y añadir a 80 ml de agua destilada PA
- Disolución de Permanganato de Potasio 0.0200N

4.6 Materiales y Equipos.

- 1 balanza Analítica.
- 1 matraz Volumétrico de 50 ml, clase A
- 2 pipeta de 20 ml, clase A
- papel filtro sin cenizas para filtración lenta
- 1 centrifuga que pueda desarrollar una aceleración radial de 1400 g (g = aceleración de la gravedad)
- 1 agitador de vidrio
- 2 tubos de centrifuga cilíndricos con fondos redondos de 30 ml, graduadas a 20 ml
- 2 pipetas de 2 y 5 mililitros, clase A
- 1 dispositivos de sifón por succión, provistos de un tubo capilar
- 1 trípode
- 1 malla de asbesto
- 1 mechero bunsen
- 1 bureta graduada de 25 ml, 0.02 ml por división, clase A
- 1 pinza para bureta
- 1 soporte metálico para bureta
- 1 termómetro
- 1 vaso de precipitado de 50 ml
- 1 vaso de precipitado de 250 ml

4.7 Procedimiento (1,3,6,7).

4.7.1 Preparación de la muestra:

Llevar la muestra de leche fortificada a una temperatura de $20^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y mezclarla cuidadosamente hasta formar una dispersión homogénea de la materia grasa. Si eso no ocurriese, calentar lentamente la muestra hasta los 40°C , mezclarla cuidadosamente y enfriarla nuevamente hasta los $20^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

4.7.2 Toma de muestra del ensayo:

En un matraz volumétrico de 50 ml, pesar exactamente 20 gramos de leche, utilizando la pipeta de 20 ml, Pesar la muestra con una precisión de 0.01 gramos.

4.7.3 Precipitación de sustancias proteicas:

- 1.0 A la muestra pesada, añadir poco a poco y con agitación constante, solución de ácido tricloroacético 20% m/v, hasta llegar a la marca de 50 ml. Agitar vigorosamente algunos segundos y dejar reposar por 30 minutos.
- 2.0 Después de transcurrido el tiempo, filtrar en un vaso de precipitado de 50 ml, el contenido con papel filtro sin ceniza, teniendo el cuidado que la solución obtenida sea límpida.

4.7.4 Precipitación del calcio como oxalato y separación del oxalato:

- 1.0 En un tubo de centrifuga de fondo redondo, agregar con pipetas 5 ml del filtrado límpido, 5 ml de solución de ácido tricloroacético al 12% m/v, 2 ml de disolución acuosa de oxalato de amonio monohidratado PA, 2 gotas de solución de rojo de metilo y 2 ml de ácido acético al 20% m/v.
- 2.0 Mezclar con agitación circular añadiendo poco a poco, disolución de amoníaco al 50% V-V, hasta que la coloración se torne amarillo pálido. Después agregar gota a gota ácido acético al 20% ml hasta que aparezca coloración rosa en la disolución.
- 3.0 Dejar reposar por 4 horas a temperatura ambiente.
- 4.0 Después de transcurrido el tiempo, diluir el contenido del tubo de centrifuga con agua destilada PA, hasta 20 ml y centrifugar 10 minutos a 1400 g (aceleración de la gravedad).

- 5.0 Retirar el líquido sobrenadante transparente del tubo de centrifuga con el dispositivo y succión.
- 6.0 Lavar las paredes del tubo de centrifuga con 5ml de solución amoniacal al 2% m/v, teniendo el cuidado de no perturbar el depósito de oxalato de calcio.
- 7.0 Centrifugar el tubo nuevamente a 1400 g durante 5 minutos y retirar el líquido sobrenadante del tubo de centrifuga con el dispositivo de succión.
- 8.0 Repetir la operación de lavado 3 veces más.

4.7.5 Valoración:

- 1.0 Después de haber extraído el agua del último lavado al tubo de centrifuga, agregar 2 ml de ácido sulfúrico 20% m/v y 5 ml de agua destilada PA sobre el precipitado de oxalato de calcio.
- 2.0 Llevar el tubo a baño de agua hirviendo para disolver completamente el oxalato de calcio.
- 3.0 Valorar el oxalato de calcio disuelta con disolución de Permanganato de Potasio 0.0200N, hasta que persista un color rosado. Se debe tener el cuidado que, durante la titulación, la temperatura de la solución se mantenga por encima de los 60°C.
- 4.0 Registrar el resultado de volumen gastado en ml de solución de Permanganato de Potasio 0.0200N.

4.7.6 Ensayo en blanco:

- 1.0 Realizar exactamente el mismo procedimiento descrito anteriormente, solo que en esta ocasión la muestra a tomar será 20 ml de agua destilada PA.
- 2.0 Registrar el resultado de volumen gastado en ml de solución de Permanganato de Potasio 0.0200N.

4.8 Cálculos.

4.8.1 Calcular el contenido de calcio Ca expresado en porcentaje:

$$w_{Ca} = 0.0004(V - V_0) \times \frac{1000f}{m}$$

$$w_{Ca} = 0.4(V - V_0) \times \frac{f}{m}$$

Donde:

V : Es el volumen en ml de $KMnO_4$ 0.02N gastados en la valoración de la muestra.

V_0 : Es el volumen en ml de $KMnO_4$ 0.02N gastados en la valoración del ensayo en blanco.

m : Es la masa en gramos, de la muestra.

f : Es el factor de corrección, dado en la tabla 2, para el volumen de precipitado resultante de la precipitación con ácido tricloroacético.

Tabla N°2 Factor de corrección, f , en función del contenido de grasa de la muestra¹.

Contenido de grasa de la muestra en %	Factor de corrección f
3.5 a 4.5	0.972
3	0.976
2	0.980
1	0.985
<0.1	0.989

4.8.2 Cálculo para preparar 500 ml de $KMnO_4$ 0.0200N.

$$c(KMnO_4/5) = \frac{\frac{m(KMnO_4)}{M(\frac{KMnO_4}{5})}}{V_D}$$

$$m(KMnO_4) = V_D \times M(KMnO_4/5) \times c(KMnO_4/5)$$

$$m(KMnO_4) = 0.5l \times ((158.6g/mol)/5) \times 0.02 mol/l$$

$$m(KMnO_4) = 0.32 g \text{ de Permanganato de Potasio}$$

4.8.3 Cálculo de porcentaje diario de calcio en un alimento.

$$\%VD = \frac{w_{ca}}{VD} \times 100\%$$

Donde:

w_{ca} : masa de calcio en mg

VD : Valor diario de calcio que se debe consumir, recomendado por una institución reconocida

4.9 Normas nacionales e internacionales que referencian el calcio en la leche.

4.9.1 Normas nacionales

En el salvador existen 2 documentos que normalizan y reglamentan la leche, ellas son '*La Norma Salvadoreña Obligatoria NSO 67.01.02.06*' y el '*Reglamento de la ley de fomento de producción higiénica de la leche y productos lácteos y de regulación de su expendio*'. Sin embargo y a pesar de que dichos documentos establecen parámetros fisicoquímicos y microbiológicos que deben cumplirse en la leche de vaca, ninguno de los documentos establece parámetros de cantidad de calcio que debe contener la leche.

4.9.2 Normas internacionales.

A nivel internacional se encuentran documentos reconocidos por instituciones estatales, que establecen parámetros numéricos de contenido de calcio que deben contener los alimentos y estos datos pueden ser usados de referencia, para comparar los resultados obtenidos en el laboratorio.

El documento que aplica para esta región es la "*Tabla de composición de alimentos de Centroamérica*" este documento fue elaborado por Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá (INCAP) y contiene la cantidad de calcio que deben poseer diferentes tipos de leche de vaca que existen en el mercado. A continuación, se presenta la tabla con contenido de calcio que debe tener la leche de vaca según los diferentes productos existentes en el mercado.

Tabla N°3. Cantidad de calcio en leche contenida en 100 gramos de alimento⁴.

VARIEDAD DE PRODUCTO DE LECHE DE VACA	CALCIO mg
LECHE DE VACA, INTEGRAL, FLUIDA	113
LECHE DE VACA, INTEGRAL EN POLVO	912
LECHE DE VACA, INTEGRAL EVAPORADA C/VIT. A ENLAT.	261
LECHE DE VACA, SEMIDESCREMADA, FLUIDA	117
LECHE DE VACA, SEMIDESCREMADA, FORTIFICADA, FLUIDA	143
LECHE DE VACA, DESCREMADA C/VIT A, FLUIDA	119
LECHE DE VACA, DESCREMADA S/VIT A, EN POLVO	1257
LECHE DE VACA, DESCREMADA, EN POLVO	1257
LECHE DE VACA, DESCREMADA C/VIT A, EN POLVO	1257
LECHE DE VACA, DESCREMADA C/VIT A, EN POLVO INSTANTANEA	1231
LECHE DE VACA, CHOCOLATADA, FLUIDA, BAJA EN GRASA	109
LECHE DE VACA, CON COCOA, FLUIDA	105
LECHE DE VACA, CONDENSADA C/AZÚCAR, ENLAT.	284

Otros documentos que se puede consultar es la, “*Tabla de composición de alimentos y productos alimenticios*” elaborado por el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán el cual presenta una mayor variedad de parámetros de productos lácteos. Y la “*Tabla de composición química de alimentos para Argentina*” conocida como SARA 2. Aunque este último está elaborado tomando como referencia el realizado por la INCAP. Existen otras tablas de composición de alimentos, pero la mayoría toman como referencia la base de datos las tablas de la INCAP y las tablas de nutrición de México y Estados Unidos.

Bibliografía.

1. FAO/OMS, Vitamin and mineral requirement in human nutrition, Editorial Sun Fung, Second Edition, China, 1998.
<https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/42716/9241546123.pdf?sequence=1>
2. International Dairy Federation, Milk - Determination of calcium content – Titrimetric method, Brussels, Second edition, 2010.
3. Instituto de nutrición de Centroamérica y Panamá (INCAP)/Menchú MT, Méndez H. Tabla de composición de alimentos de Centroamérica Guatemala: INCAP/OPS, 2007 2a edición.
4. Zumbado Fernández, H M., Análisis Químico De Los alimentos, Editorial Ciudad Educativa, Segunda Edición., Florida, 2022.
5. <https://www.usc.gal/caa/MetAnálisisStgo1/leche.pdf>
PANREAC QUIMICA S.A., Analíticos en alimentaria. Leche y productos
6. <https://www.fda.gov/media/137914/download>
Valor diario y porcentaje de valor diario en las etiquetas de información nutricional y complementaria.

CAPITULO V

5.0 CONCLUSIONES

1. El método de valoración elegido para la práctica de laboratorio es la valoración REDOX, debido a que este es el método de valoración establecido por la Federación Internacional de Lechería (FIL) y es certificada por la International Standard Organization (ISO) con número de registro ISO 12081.
2. En la valoración con permanganato de potasio, se debe estandarizar dicho reactivo, previamente a ser usado, con un patrón primario, ya sea ácido oxálico o con oxalato de sodio, debido a que el permanganato de potasio es una sustancia muy inestable y se debe determinar la concentración real del mismo.
3. La cuantificación de calcio en la leche se realiza de forma indirecta, debido a que es el ion oxalato producido por el mismo calcio, el que interviene en la reacción de valoración con permanganato de potasio.
4. Una de las ventajas de usar permanganato de potasio en la valoración, es que no se necesita agregar indicador a la solución muestra, debido a que este reactivo, al reducirse, cambia de color cerca del punto final y que es notablemente visible al ojo humano.
5. En la valoración REDOX con permanganato de potasio, ocurre una reducción del ion permanganato a ion manganeso $2+$, y una oxidación del ion oxalato a dióxido de carbono gaseoso, provocando una coloración violácea en la solución producida por el ion manganeso.
6. No existen ni nacional ni internacionalmente, normas o reglamentos que rijan los valores de calcio, que deban contener los diferentes productos lácteos en el mercado, solo hay tablas de composición de alimentos, que sirven como referencia, para conocer los valores de calcio que deben tener los productos lácteos derivados de la leche de vaca.
7. El contenido de calcio en los productos alimenticios no puede ser normalizada por organismos estatales, debido a que, por variados factores, cada ser humano individual, necesita diferentes porcentajes de calcio en el cuerpo. Entre estos factores que influyen esta, la etnia, la edad, el sexo y el clima. Sin embargo, existen tablas elaboradas por diferentes instituciones, que recomiendan valores promedios de calcio que deben tener los alimentos, entre algunas de estas instituciones están la INCAP, SARA de Argentina, la base de datos de la USDA de Estados Unidos y otras.

CAPITULO VI

6.0 RECOMENDACIONES

1. Ingerir las dosis recomendadas de calcio con productos lácteos como leche fortificada y otras fuentes alimenticias para mantener la buena salud.
2. Tener el conocimiento de las cantidades recomendadas de calcio que se deben de consumir en una dieta adecuada.
3. Conocer las cantidades recomendadas de calcio que se deben de consumir de acuerdo con la edad de cada persona.
4. Conocer los beneficios de la leche fortificada para su consumo, sus nutrientes, vitaminas y la importancia que tienen la ingesta de ella.
5. Utilizar el método volumétrico por oxido-reducción para la determinación de calcio contenido en la muestra.
6. Utilizar ácido sulfúrico (H_2SO_4) en la valoración con permanganato de potasio, ya que este ácido no interfiere en la valoración, es un ácido no oxidante.
7. Informarse de las diferentes normas nacionales e internaciones que establecen los parámetros numéricos del contenido de calcio que deben de contener los alimentos y que estos datos son usados como referencia para comparar los resultados obtenidos en el laboratorio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Castellanos P Zumbado, y et al., “Análisis Químico Farmacéutico. Métodos Clásicos Cuantitativos”, Editorial Universitaria, Primera Edición, La Habana, 2004.
2. FAO/OMS, Vitamin and mineral requirement in human nutrition, Editorial Sun Fung, Second Edition, China, 1998.
<https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/42716/9241546123.pdf?sequence=1>
3. International Dairy Federation, Milk - Determination of calcium content – Titrimetric method, Brussels, Second edition, 2010.
4. Instituto de nutrición de Centroamérica y Panamá (INCAP)/Menchú MT, Méndez H. Tabla de composición de alimentos de Centroamérica Guatemala: INCAP/OPS, 2007 2a edición.
5. Quevedo Navas, A. M. y et al., “Cuantificación de calcio por el método gravimétrico en leches pasteurizadas enteras, fluidas y en polvo, distribuidas en supermercados de Antiguo Cuscatlán”, trabajo de graduación, Facultad de Química y Farmacia, Universidad De El Salvador, 2012.
6. Zumbado Fernández, H M., Análisis Químico De Los alimentos, Editorial Ciudad Educativa, Segunda Edición., Florida, 2022.
7. <https://www.usc.gal/caa/MetAnálisisStgo1/leche.pdf>
8. <https://www.fda.gov/media/137914/download>
9. <https://www.incap.int/index.php/es/alimentos-fortificados4>
10. https://prezi.com/p/wer0n_nny4mp/determinacion-de-calcio-en-leches/
11. [https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112019000400030#:~:text=La%20leche%201%C3%ADquida%20contiene%20un a,mg%2F100%20g\)%2032.](https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112019000400030#:~:text=La%20leche%201%C3%ADquida%20contiene%20un a,mg%2F100%20g)%2032.)
12. https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112019000400030#B22
13. <http://infotrade.minec.gob.sv/ca/wp-content/uploads/sites/7/2019/03/ANEXO-RES-337-2014-RTCA-67046612-Leche-Pasteurizada.pdf>
14. https://www.oirsa.org/contenido/2017/El_Salvador_INOCUIDAD/27.%20RTCA%2067%2004%2065-12%20USO%20DE%20TERMINOS%20LECHEROS.pdf

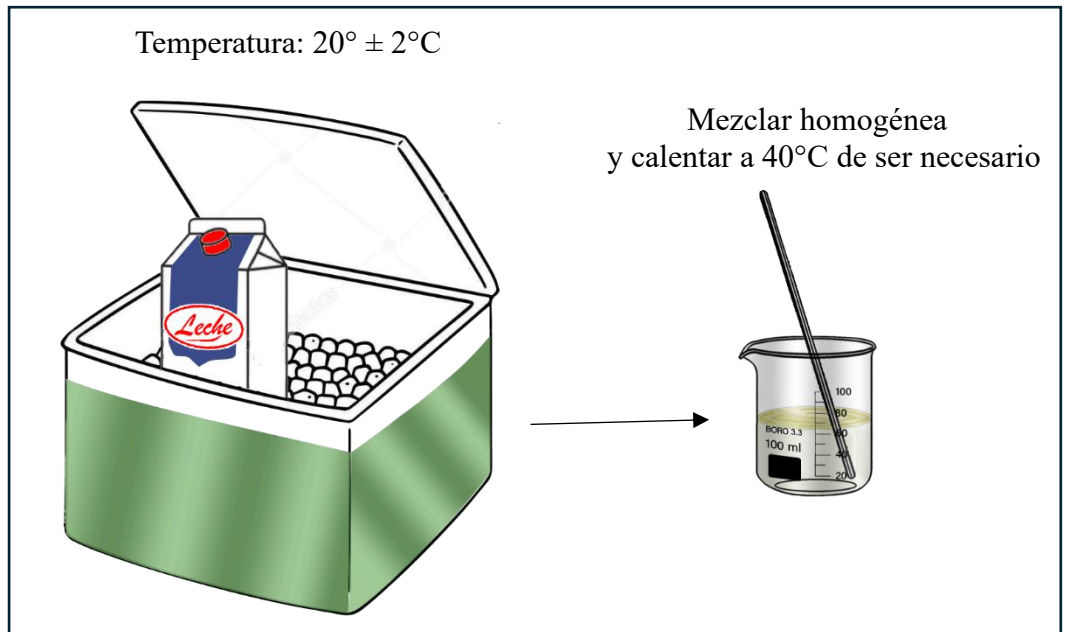
15. Duran D., Propuesta del método titrimétrico por oxidación-reducción con permanganato de potasio para determinar calcio en tabletas y en leches enteras fluidas pasteurizadas.
16. [Medlineplus.gob/spanish/encylarticle/000332.htm](https://medlineplus.gob/spanish/encylarticle/000332.htm). Fecha de consulta: 04/06/2024
17. es.wikipedia.org/wiki/calcio. Fecha de consulta: 04/06/2024
18. oocities.org/grupoindustrial/aisa/leche.html. Fecha de consulta: 05/06/2024
19. Norma Salvadoreña Obligatoria NSO 67.01.02:06. Fecha de consulta: 09/05/2024
20. ISO/2081:2010/IDF36:2010. Fecha de consulta: 09/05/2024

ANEXO N°1

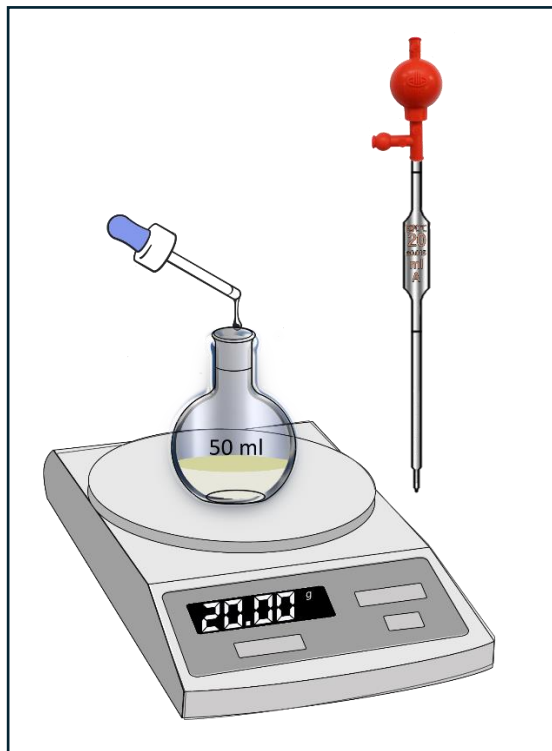
MARCHA ANALITICA PARA LA DETERMINACION DE CALCIO EN LECHE

Fuente: Elaboración Propia

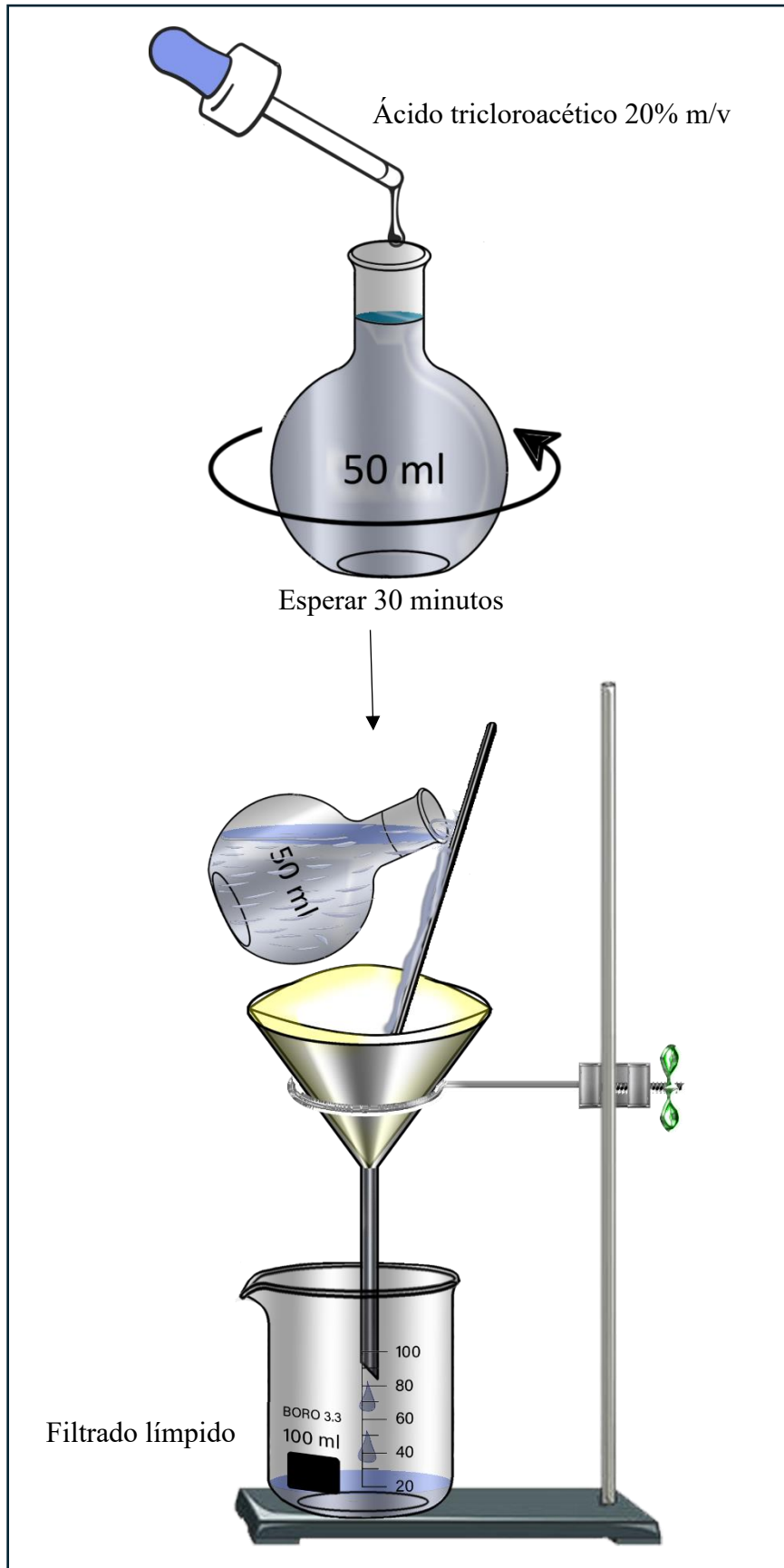
1.0 Preparación de la muestra



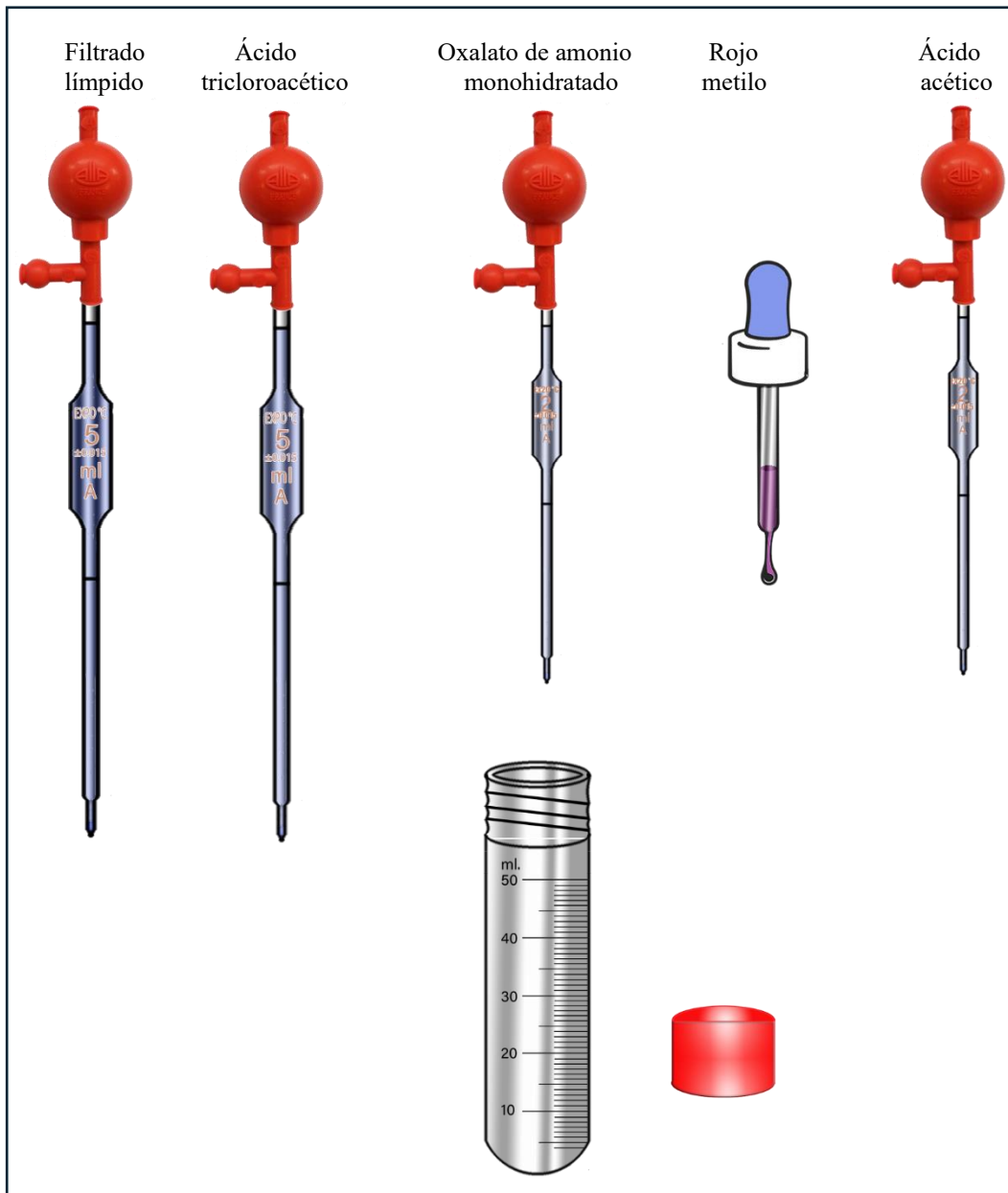
2.0 Toma de muestra

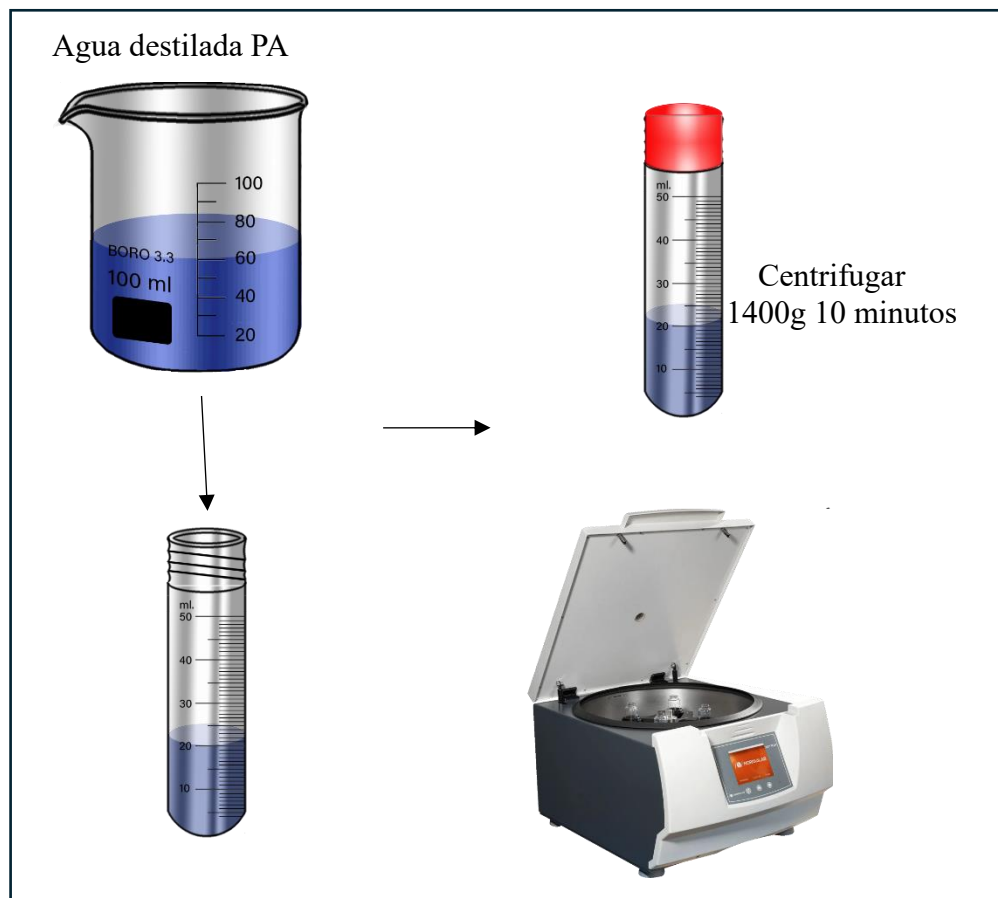
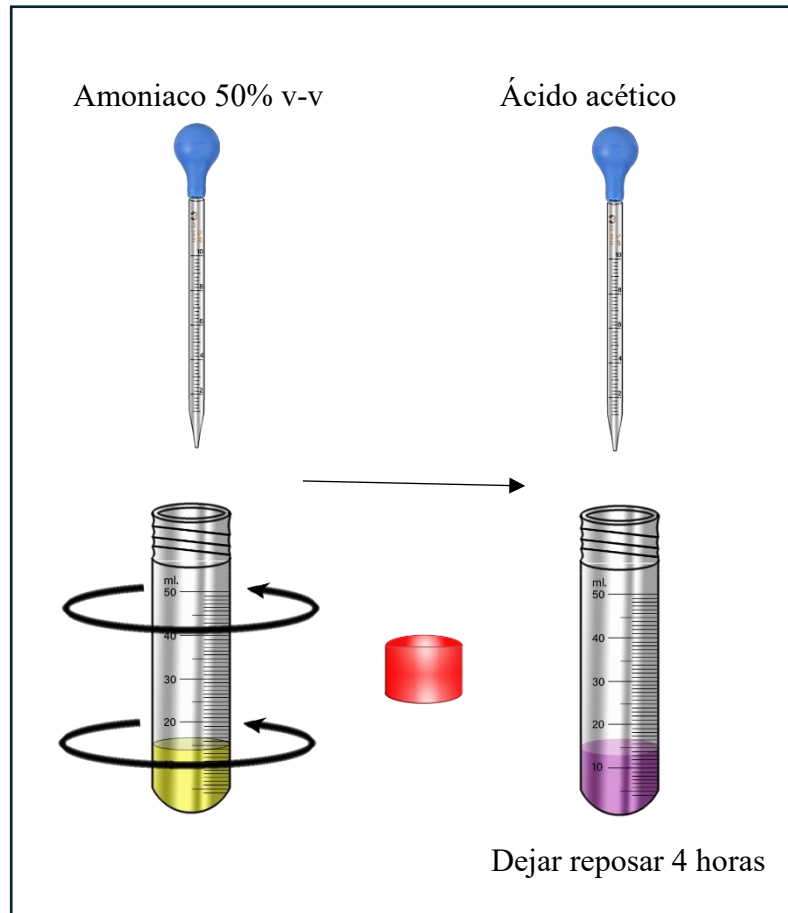


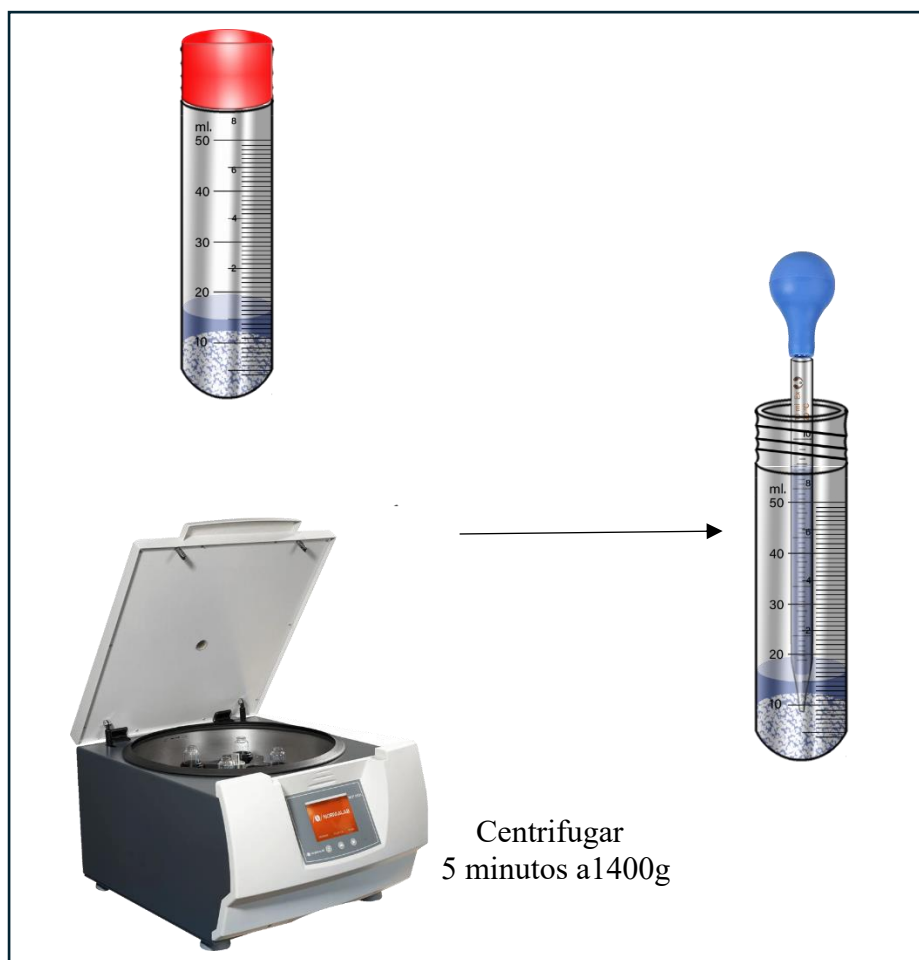
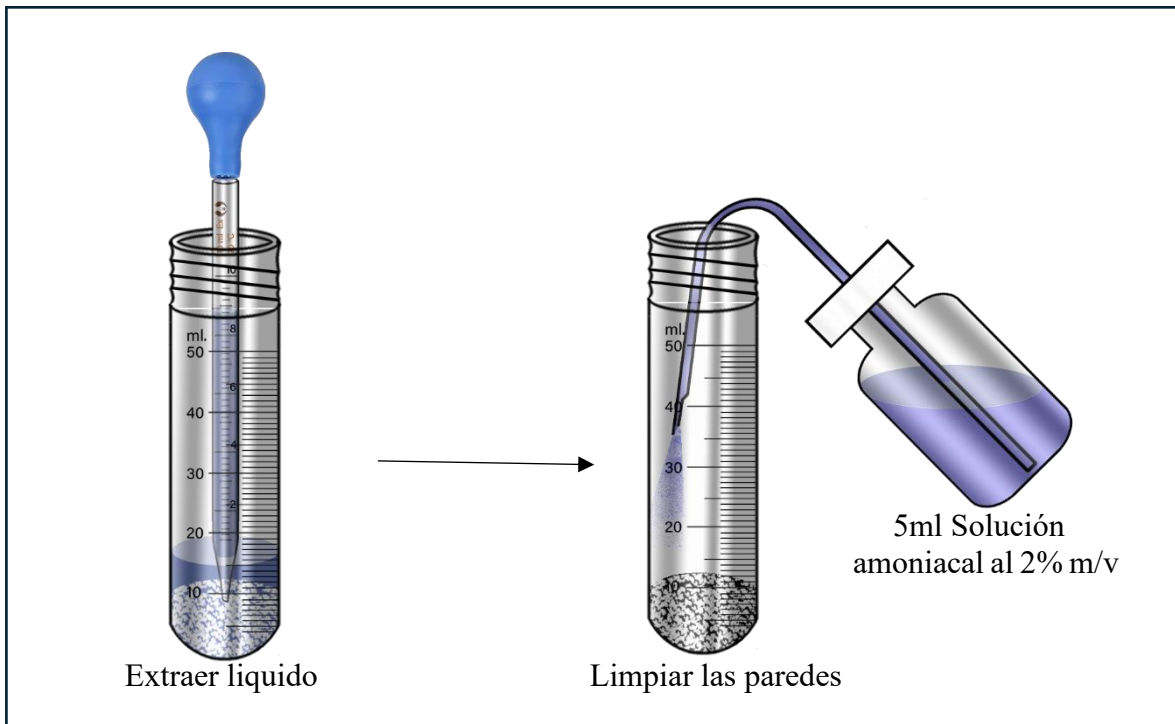
3.0 Precipitación de sustancias proteicas



4.0 Precipitación del calcio como oxalato y separación del oxalato

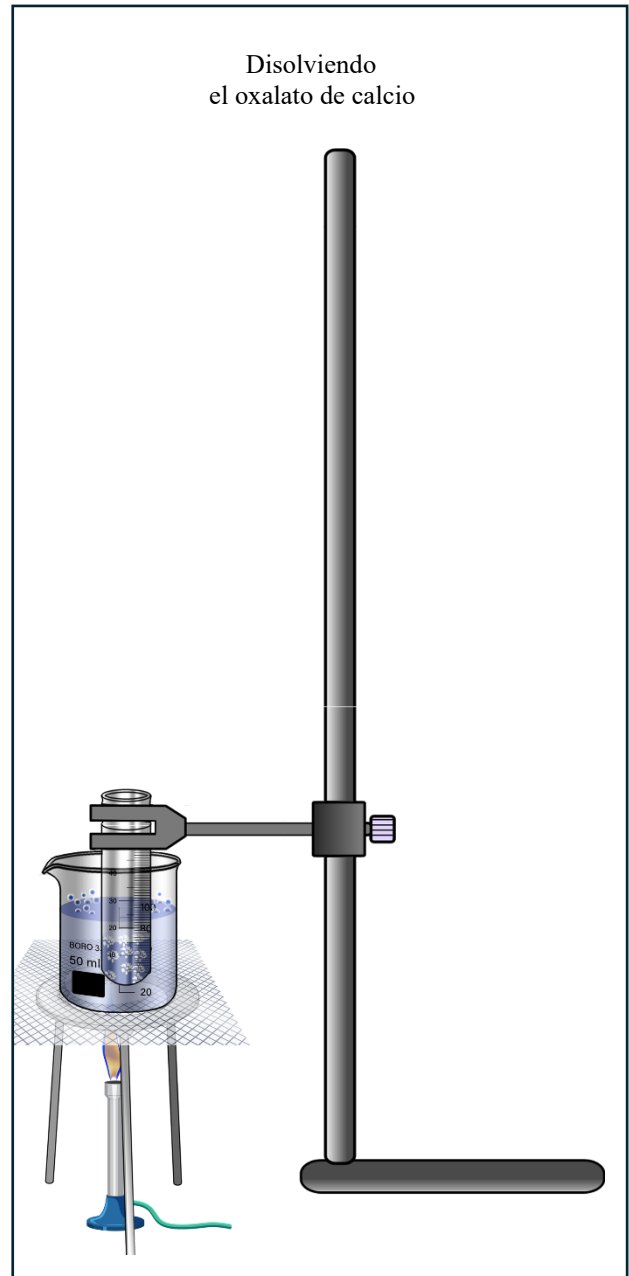
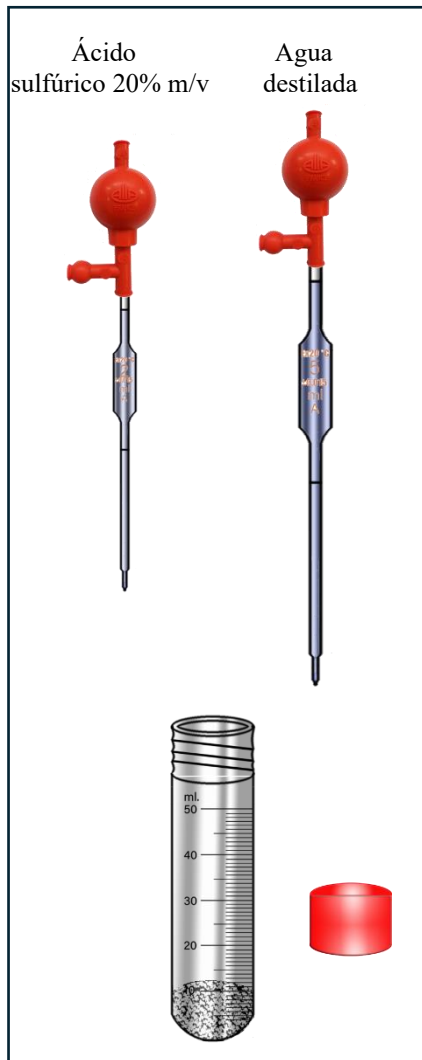




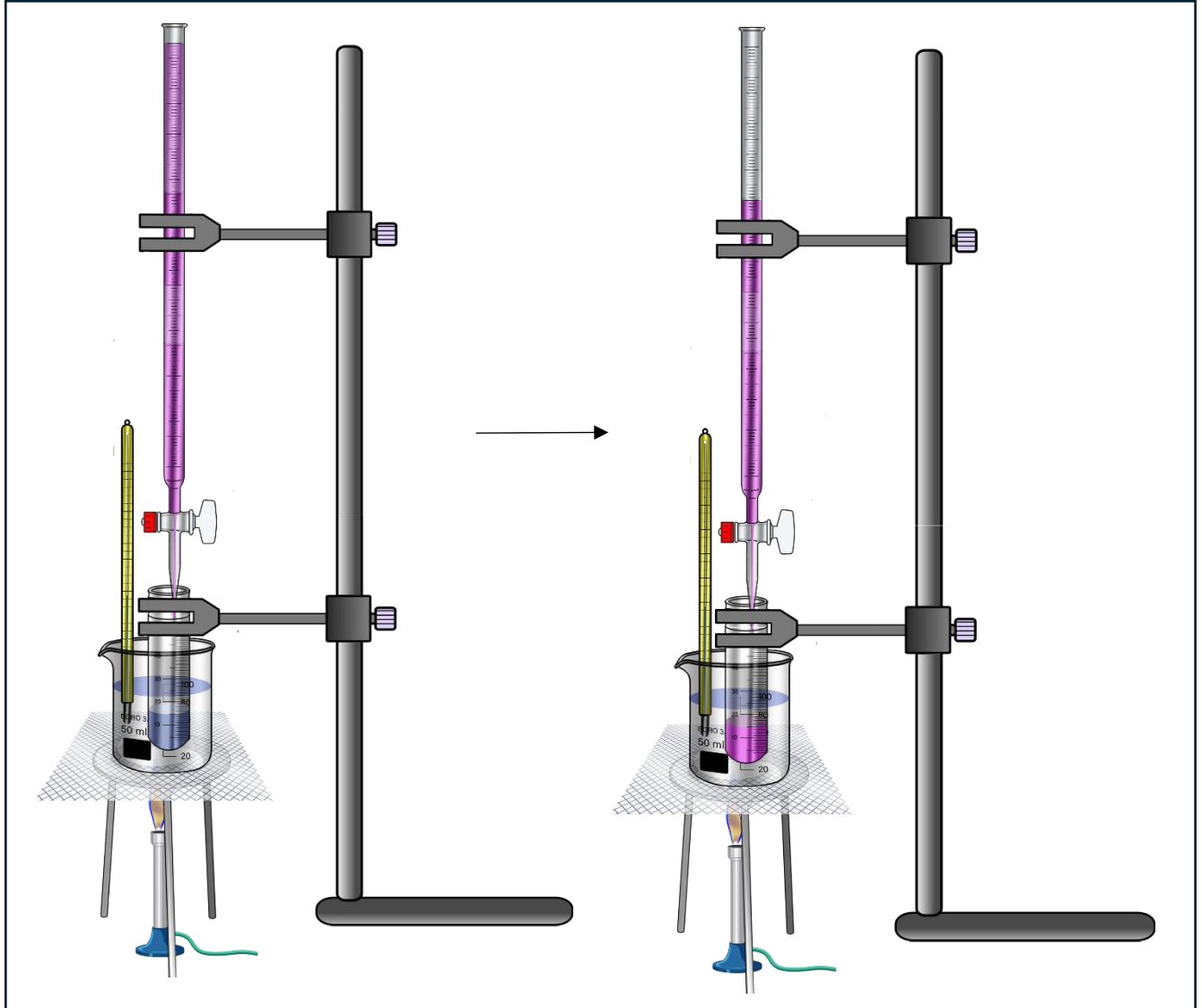


Repetir la operación de lavado 3 veces

5.0 Valoración



Titulación con KMnO_4 0.02N hasta que persista color rosado y
mantener temperatura del agua por encima de 60°C



$V_{\text{gastado}} =$ _____

6.0 Ensayo en blanco

Repetir todo el procedimiento, tomando como muestra 20 ml de agua y anotar el resultado

$V_{\text{gastado}} =$ _____

Fuente: Elaboración propia

ANEXO N°2

**EJEMPLO DE CALCULOS PARA DETERMINAR LA CANTIDAD DE CALCIO
EN ETIQUETAS DE PRODUCTOS DE LECHE.**

Determinar la cantidad de calcio establecido en la etiqueta de un producto lácteo comercial y establecer si cumple o no con lo especificado en las tablas de la INCAP.

La etiqueta muestra el contenido de calcio de 45% en una caja de leche entera que contiene 900ml de Producto, entonces.

$$\%VD = \frac{VC}{VD} \times 100\%$$

Donde:

VC: Valor de contenido de calcio

VD: Valor diario de referencia de calcio

%VD: Porcentaje de valor diario de referencia de calcio

Entonces:

$$VC = \frac{\%VD \times VD}{100\%}$$

Sustituyendo valores.

$$VC = \frac{45\% \times 800mg}{100\%}$$

VC = 360mg de calcio contenida en un vaso de 250ml

*800mg es el valor de referencia que utiliza la empresa Salud para obtener el porcentaje diario de calcio.

Ahora se debe determinar si este valor cumple de acuerdo a lo establecido en tablas alimenticias.

Datos de Nutrición	
Tamaño por porciones: 250 ml	
Porciones por envase: 3.5 aprox.	
Cantidad por porción	
Energía/600 kJ	140 Cal
% Valor Diario*	
Grasa Total 7g	11%
Grasa Saturada 5 g	25%
Sodio 140 mg	6%
Carbohidratos Totales 10 g	3%
Proteínas 8 g	16%
Vitamina A 15%	Calcio 45%
Vitamina B12 70%	Hierro 20%
Vitamina D 80%	Zinc 20%
Potasio 9%	Magnesio 10%

*Los porcentajes de los valores diarios están basados en una dieta de 2000 calorías según recomendaciones de FAO/OMS y FDA

Entonces sí:

$$360\text{mg} \longrightarrow 250\text{ml}$$

$$X \longrightarrow 20\text{ml}$$

$$X=28.8\text{mg de calcio}$$

Este dato, es el valor teórico que tendría que darse al realizar la practica para este producto.

Ahora debemos determinar si el producto cumple o no con lo establecido en las tablas de alimentos.

$$28.8\text{mg} \longrightarrow 20 \text{ g de alimento}$$

$$X \longrightarrow 100 \text{ g de alimento}$$

$$X=144 \text{ mg de calcio contenido en } 100 \text{ g de alimento}$$

Al comparar este dato con el establecido en la tabla INCAP, la cual establece el contenido de calcio de 113 mg de calcio en 100 gramos de alimento, para ese tipo específico de producto, podemos concluir que el producto si cumple lo establecido desde un punto de vista teórico

Composición de Alimentos en 100 Gramos de Porción Comestible

Código	NOMBRE	Agua %	Energía Kcal.	Proteína g	Grasa Total g	Carbo- hidratos g	Fibra Diet. total g	Cenizas g	Calcio mg	Fosforo mg	Hierro mg	Tiamina mg	Riboflavina mg	Niacina mg	Vit. C mg	Vit. A Equiv. Retinol mcg	Ac. grasos mono-insat. g	Ac. grasos poli-insat. g	Ac. Grasos saturados g	Colectrol mg	Potasio mg	Sodio mg	Zinc mg	Magnesio mg	Vit. B6 mg	Vit. B12 mcg	Ac. Fólico mcg	Folato Equiv. FD mcg	Fración Comestible %
1015	LECHE DE VACA, ÍNTEGRA, FLUIDA (3.25% GRASA)	88.32	60	3.22	3.25	4.52	0.00	0.69	113	91	0.03	0.04	0.18	0.11	0	28	0.81	0.19	1.87	10	143	40	0.40	10	0.04	0.44	0	5	1.00

Fuente: Elaboración propia

ANEXO N°3

**PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACION DE CALCIO EN LECHE
ESTABLECIDO POR LA FEDERACION INTERNACIONAL DE LECHERIA
(FIL)³.**

INTERNATIONAL
STANDARD

**ISO
12081**

**IDF
36**

Second edition
2010-06-01

**Milk — Determination of calcium
content — Titrimetric method**

Lait — Détermination de la teneur en calcium — Méthode titrimétrique



Reference numbers
ISO 12081:2010(E)
IDF 36:2010(E)

© ISO and IDF 2010

ISO 12081:2010(E)
IDF 36:2010(E)

PDF disclaimer

This PDF file may contain embedded typefaces. In accordance with Adobe's licensing policy, this file may be printed or viewed but shall not be edited unless the typefaces which are embedded are licensed to and installed on the computer performing the editing. In downloading this file, parties accept therein the responsibility of not infringing Adobe's licensing policy. Neither the ISO Central Secretariat nor the IDF accepts any liability in this area.

Adobe is a trademark of Adobe Systems Incorporated.

Details of the software products used to create this PDF file can be found in the General Info relative to the file; the PDF-creation parameters were optimized for printing. Every care has been taken to ensure that the file is suitable for use by ISO member bodies and IDF national committees. In the unlikely event that a problem relating to it is found, please inform the ISO Central Secretariat at the address given below.



COPYRIGHT PROTECTED DOCUMENT

© ISO and IDF 2010

All rights reserved. Unless otherwise specified, no part of this publication may be reproduced or utilized in any form or by any means, electronic or mechanical, including photocopying and microfilm, without permission in writing from either ISO or IDF at the respective address below.

ISO copyright office
Case postale 56 • CH-1211 Geneva 20
Tel. + 41 22 749 01 11
Fax + 41 22 749 09 47
E-mail copyright@iso.org
Web www.iso.org

Published in Switzerland

International Dairy Federation
Diamant Building • Boulevard Auguste Reyers 50 • B-1030 Brussels
Tel. + 32 2 733 95 55
Fax + 32 2 733 04 13
E-mail info@ifi-idf.org
Web www.ifi-idf.org

Foreword

ISO (the International Organization for Standardization) is a worldwide federation of national standards bodies (ISO member bodies). The work of preparing International Standards is normally carried out through ISO technical committees. Each member body interested in a subject for which a technical committee has been established has the right to be represented on that committee. International organizations, governmental and non-governmental, in liaison with ISO, also take part in the work. ISO collaborates closely with the International Electrotechnical Commission (IEC) on all matters of electrotechnical standardization.

International Standards are drafted in accordance with the rules given in the ISO/IEC Directives, Part 2.

The main task of technical committees is to prepare International Standards. Draft International Standards adopted by the technical committees are circulated to the member bodies for voting. Publication as an International Standard requires approval by at least 75 % of the member bodies casting a vote.

Attention is drawn to the possibility that some of the elements of this document may be the subject of patent rights. ISO shall not be held responsible for identifying any or all such patent rights.

ISO 12081|IDF 36 was prepared by Technical Committee ISO/TC 34, *Food products*, Subcommittee SC 5, *Milk and milk products*, and the International Dairy Federation (IDF). It is being published jointly by ISO and IDF.

This second edition of ISO 12081|IDF 36 cancels and replaces the first edition (ISO 12081:1998), of which it constitutes a minor revision.

ISO 12081:2010(E)
IDF 36:2010(E)

Foreword

IDF (the International Dairy Federation) is a non-profit organization representing the dairy sector worldwide. IDF membership comprises National Committees in every member country as well as regional dairy associations having signed a formal agreement on cooperation with IDF. All members of IDF have the right to be represented on the IDF Standing Committees carrying out the technical work. IDF collaborates with ISO in the development of standard methods of analysis and sampling for milk and milk products.

The main task of Standing Committees is to prepare International Standards. Draft International Standards adopted by the Standing Committees are circulated to the National Committees for endorsement prior to publication as an International Standard. Publication as an International Standard requires approval by at least 50% of IDF National Committees casting a vote.

Attention is drawn to the possibility that some of the elements of this document may be the subject of patent rights. IDF shall not be held responsible for identifying any or all such patent rights.

ISO 12081|IDF 36 was prepared by the International Dairy Federation (IDF) and Technical Committee ISO/TC 34, *Food products*, Subcommittee SC 5, *Milk and milk products*. It is being published jointly by IDF and ISO.

All work was carried out by the former Joint ISO-IDF Action Team on *Minor compounds*, now part of the Standing Committee on *Analytical methods for composition*.

This edition of ISO 12081|IDF 36 cancels and replaces IDF 36A:1992, of which it constitutes a minor revision.

Milk — Determination of calcium content — Titrimetric method

1 Scope

This International Standard specifies a titrimetric method for the determination of the calcium content of milk and of milk reconstituted from evaporated, condensed or dried milk.

2 Terms and definitions

For the purposes of this document, the following terms and definitions apply.

2.1

calcium content in milk

mass fraction of substances determined by the procedure specified in this International Standard

NOTE The calcium content is expressed as a percentage mass fraction.

3 Principle

The protein substances in a test portion are precipitated by trichloroacetic acid, then filtered. The calcium in the filtrate is precipitated as calcium oxalate and is separated by centrifuging. The washed and dissolved precipitate is titrated with potassium permanganate.

4 Reagents and materials

Unless otherwise specified, use only reagents of recognized analytical grade and distilled or demineralized water or water of equivalent purity.

4.1 **Trichloroacetic acid solution I** ($C_2HCl_3O_2$), 200 g/l.

4.2 **Trichloroacetic acid solution II**, 120 g/l.

4.3 **Ammonium oxalate** ($C_2H_5N_2O_4$), saturated solution, cold.

4.4 **Methyl red solution.**

Dissolve 0,05 g of methyl red ($C_{15}H_{15}N_3O_2$) in 100 ml of ethanol (96 % volume fraction).

4.5 **Acetic acid solution** ($C_2H_4O_2$), 20 % volume fraction.

4.6 **Ammonia solution I.**

Mix equal volumes of ammonia (NH_3) solution (25 % mass fraction) and water.

ISO 12081:2010(E)
IDF 36:2010(E)

4.7 Ammonia solution II.

Dilute 2 ml of ammonia solution (25 % mass fraction) with water to 100 ml.

4.8 Sulfuric acid (H₂SO₄).

Add 20 ml of sulfuric acid (98 % mass fraction) to 80 ml of water.

4.9 Potassium permanganate standard volumetric solution, $c(\text{KMnO}_4) = 0,004 \text{ mol/l} \pm 0,000 1 \text{ mol/l}$.

Check the titre by normal laboratory procedure using oxalic acid or sodium oxalate.

5 Apparatus and materials

Usual laboratory equipment and in particular the following.

5.1 Analytical balance, capable of weighing to the nearest 0,01 g, with a readability of 0,001 g.

5.2 One-mark volumetric flask, capacity 50 ml, ISO 1042^[4] class A.

5.3 Pipette, capacity 20 ml, ISO 648^[2] class A.

5.4 Centrifuge, capable of producing a radial acceleration of 1 400*g*.

5.5 Centrifuge tubes, cylindrical and round bottomed, capacity about 30 ml, graduated at 20 ml.

5.6 Pipettes, capacities 2 ml and 5 ml, ISO 648^[2] class A.

5.7 Suction device, with capillary tube.

5.8 Water bath, capable of maintaining water at boiling point.

5.9 Burette, graduated in 0,02 ml divisions, ISO 385^[1] class A.

5.10 Filter paper, ashless, for slow filtration.

6 Sampling

Sampling is not part of the method specified in this International Standard. A recommended sampling method is given in ISO 707|IDF 50^[3].

It is important that the laboratory receive a truly representative sample which has not been damaged or changed during transport or storage.

7 Preparation of test sample

Bring the test sample of milk or reconstituted milk to a temperature of 20 °C ± 2 °C and mix carefully. If a homogeneous dispersion of the fat is not obtained, heat the sample slowly to 40 °C, then mix gently by repeated inversion and cool to 20 °C ± 2 °C.

8 Procedure

8.1 Test portion

Transfer approximately 20 g of the prepared test sample (see Clause 7) to the volumetric flask (5.2), using the pipette (5.3). Weigh the sample to the nearest 0,01 g.

8.2 Determination

8.2.1 Precipitation of protein substances

Gradually add, while shaking, trichloroacetic acid solution I (4.1) to the test portion (8.1) until a volume of 50 ml is obtained. Shake vigorously for a few seconds and allow to stand for 30 min. Filter through the filter paper (5.10), taking care that the filtrate obtained is clear.

8.2.2 Precipitation of calcium as oxalate and separation of the oxalate

Pipette (5.6) 5 ml of the clear filtrate (see 8.2.1), 5 ml of trichloroacetic acid solution II (4.2), 2 ml of ammonium oxalate solution (4.3), two drops of methyl red solution (4.4) and 2 ml of acetic acid solution (4.5) into a centrifuge tube (5.5). Mix by swirling.

Add ammonia solution I (4.6) drop by drop to the mixed solutions in the tube until the colour becomes pale yellow. Then add a few drops of acetic acid solution (4.5) until a pink coloration appears. Allow to stand for 4 h at room temperature.

Dilute the contents of the centrifuge tube with water to 20 ml. Centrifuge the tube at 1 400g for 10 min. Remove the clear supernatant liquid from the centrifuge tube with the suction device (5.7).

Rinse the walls of the centrifuge tube with 5 ml of ammonia solution II (4.7), taking care not to disturb the deposit of calcium oxalate. Centrifuge the tube at 1 400g again for 5 min. Remove the supernatant liquid from the centrifuge tube with the suction device (5.7).

Repeat this washing operation twice.

8.2.3 Titration

Add 2 ml of sulfuric acid (4.8) and 5 ml of water to the calcium oxalate deposit (see 8.2.2).

Place the tube in the boiling water bath (5.8) to dissolve the calcium oxalate deposit completely. Titrate the dissolved calcium oxalate with the potassium permanganate solution (4.9) until a pink colour persists. Take care that, during the titration, the temperature of the solution stays above 60 °C.

Record the volume, in millilitres, of potassium permanganate solution used, to the nearest 0,01 ml.

8.2.4 Blank test

Carry out a blank test in parallel with the determination by using 20 ml of water instead of the test portion.

Record the volume, in millilitres, of potassium permanganate solution used, to the nearest 0,01 ml.

9 Calculation and expression of results

9.1 Calculation

Calculate the calcium content, w_{Ca} , expressed as a percentage mass fraction, using the following equation:

$$w_{\text{Ca}} = 0,000\ 4(V - V_0) \times \frac{1000f}{m}$$
$$= 0,4(V - V_0) \times \frac{f}{m}$$

where

- V is the volume, in millilitres, of potassium permanganate solution used for the test portion (see 8.2.3);
- V_0 is the volume, in millilitres, of potassium permanganate solution used for the blank test (see 8.2.4);
- m is the mass, in grams, of the test portion;
- f is the correction factor, given in Table 1, for the volume of precipitate resulting from the trichloroacetic acid precipitation.

Table 1 — Correction factor, f , as a function of the fat content of the sample

Fat content of the sample % mass fraction	Correction factor f
3,5 to 4,5	0,972
3	0,976
2	0,980
1	0,985
< 0,1	0,989

9.2 Expression of results

Express the results to three decimal places.

10 Repeatability

The absolute difference between two single test results, obtained using the same method on identical test material in the same laboratory by the same operator using the same equipment within a short interval of time, will in not more than 5 % of cases be greater than 0,002 %.

11 Test report

The test report shall contain at least the following information:

- a) all information necessary for the complete identification of the sample;
- b) the sampling method used, if known;

- c) the test method used, with reference to this International Standard (ISO 12081|IDF 36:2010);
- d) any operating conditions not specified in this International Standard, or regarded as optional, as well as details of any incidents which may have influenced the test result(s);
- e) the test result(s) obtained;
- f) if the repeatability has been checked, the final quoted result obtained.

ANEXO N°4²

Tabla N°4. Ingesta diaria de calcio en diferentes regiones del mundo, 1987-1989

Region	Calcium (mg)		
	Total	Animal	Vegetal
Norte America	1031	717	314
Europa	896	684	212
Oceania	836	603	233
Otros en Desarrollo	565	314	251
RUSIA	751	567	184
Todos Desarrollados	850	617	233
Africa	368	108	260
America latina	477	305	171
Cercano Oriente	484	223	261
Lejano Oriente	305	109	196
Otros en Desarrollo	432	140	292
Todos Desarrollados	344	138	206