



DOSEAMENTO DO CÁLCIO EM ALGAS E PRODUTOS ALIMENTARES

COMPARAÇÃO DE RESULTADOS OBTIDOS PELOS MÉTODOS COMPLEXOMÉTRICO E MANGANOMÉTRICO

BEATRIZ REIS MACHADO
ARMANDA MARIA BRÁS SEVERO
MARIA MANUELA COSTA REIS
MANUEL CARVALHO MARTINS

Laboratório de Bromatologia
Grupo de Laboratórios de Química e Biologia
Instituto Nacional de Investigação Industrial
Lisboa 6

Estuda-se o doseamento do ião cálcio em algas de várias espécies e produtos alimentares, constituindo um total de 180 amostras. Comparam-se os resultados obtidos com o método complexométrico, empregando o EDTA e a calceína, com o método oficial manganométrico. Feita a análise estatística dos resultados obtidos para as algas, conclui-se que os dois métodos estão correlacionados por uma recta de regressão de valor altamente significativo. O desvio-padrão de regressão calculado ao nível de probabilidade de 95 p. 200 permite a reconversão dos valores para amostras com elevado teor em cálcio.

A necessidade de doseamentos em série, suficientemente rápidos e precisos, dos iões cálcio e magnésio em algas nacionais de várias espécies levou-nos a pôr em prática e a adaptar a estes produtos um método complexométrico. Para aferição e significado dos valores obtidos, doseámos paralelamente o ião cálcio pelo método manganométrico (1) nas mesmas amostras, cujo número excedeu uma centena. Além de com ele familiarizados, é um método clássico universalmente aceite para os produtos de origem animal e vegetal, tendo sido base de construção de tabelas alimentares (2) a aplicar no campo nutricional. Na comercialização dos produtos alimentares, é problema constante o significado das tolerâncias em relação a dado produto colocado no mercado, quer como valor propriamente alimentar, quer como valor comercial. Assim, para os macroelementos minerais, a lei italiana referente a alimentos para animais (3) prevê uma tolerância de 20 por cento a mais e 10 por cento a menos em relação ao valor declarado; desvios excedendo estes limites terão de ser considerados.

O presente trabalho tem por fim verificar neste laboratório até que ponto haverá equivalência ou não-equivalência estatística entre os resultados obtidos com os dois métodos indicados e, no caso de não existir equivalência, até que ponto os desvios-padrão de regressão poderão comprometer um resultado. Apresentamos também os valores obtidos com vários alimentos analisados comparativamente, mas, por serem em menor número, não se lhes aplicou análise estatística. Para o ião magnésio não apresentamos resultados, por não nos ter sido possível a comparação com outro método.

LAUTIER (4), aplicando este método a algumas amostras de alimentos não discriminados, considera-o mais rápido que o método oficial manganométrico, permitindo, além disso, o doseamento simultâneo do cálcio e do magnésio de modo suficientemente preciso.

2 — PARTE EXPERIMENTAL

2.1 — PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Para a preparação das amostras, LAUTIER indica a calcinação dos diversos alimentos: a partir de tomas de ensaio de 5 g, calcinação progressiva até 500°C;

após 6 horas as cinzas brancas são retomadas com 10 cm³ de HCl N e 15 cm³ de água destilada. No nosso caso, a diluição empregada variava com as espécies de algas. De um modo geral, a partir de 5 g de algas secas (com 10 g a 20 g de humidade para 100 g), depois de quartejadas miudamente e misturadas, procedia-se à calcinação durante cerca de 18 horas. À adição de 10 cm³ de ácido clorídrico 2,7 N, seguia-se manutenção durante 10 minutos sobre banho-maria em ebulição. Filtrava-se e lavava-se o resíduo até reacção ácida negativa nas águas de lavagem. Os líquidos provenientes da filtração eram acumulados e completados com água bidestilada a 250 cm³, em balão marcado; no momento de ensaio recorriamos a uma diluição suplementar de 1/2 a 1/4.

Os ensaios eram efectuados partindo de 0,1 cm³, 0,2 cm³ ou 0,4 cm³. A escolha do volume apropriado era feita, de modo geral, a partir dos resultados obtidos pelo método manganométrico. Esta necessidade era devida à grande variabilidade do teor em cálcio com as diferentes espécies de algas e mesmo na própria espécie. Quando já tínhamos de certo modo um *controle* da variabilidade por análise de muitas espécies, o teor em cinza total auxiliava-nos para o cálculo dessa diluição, independentemente do método manganométrico.

Para alimentos contendo 0 a 300 mg de cálcio por 100 g do produto, empregávamos a diluição prescrita por LAUTIER, tomando de 0,1 cm³ a 0,5 cm³ do mineralizado. No caso dos queijos, empregávamos 0,1 cm³ do mineralizado contido em balão marcado de 250 cm³, obtido pelo processo descrito anteriormente.

2.2 — TÉCNICA

2.2.1 — Fundamento

A calceína é um produto de condensação do ácido iminodiacético, em presença de formaldeído. Por precipitação prévia do magnésio por meio de 8-hidroxi-quinoleína, doseia-se o ião cálcio. Para isso, adiciona-se à solução a analisar uma quantidade determinada de EDTA. O complexo de Ca-EDTA forma-se a um pH fortemente alcalino.

Titula-se em seguida o excesso de EDTA, em presença de calceína, por meio de uma solução-padrão de cálcio. Logo que haja iões Ca²⁺ livres o indicador vira de amarelo-acastanhado a verde-fluorescente. Esta

fluorescência é devida ao facto de o cálcio, fixando-se no radical iminodiacético, libertar a fluoresceína. É também necessário um ensaio em branco para estabelecer a equivalência entre os reagentes utilizados e a solução titulante de cálcio.

Para o doseamento do magnésio, procede-se semelhantemente, sem precipitação prévia deste ião, correspondendo a diferença obtida nos dois ensaios ao respectivo teor.

2.2.2 — Reagentes

Foi empregado o «Titriplex Merck p. a.» e a calceína «Fluka AG» e nas diluições utilizou-se água bidestilada.

Solução de calceína — a partir de uma solução mais concentrada, de conservação mais fácil (0,25 g + 4 cm³ de NaOH N e 30 cm³ de água bidestilada), obtém-se um volume conveniente de solução diluída a 1/100 no momento do emprego.

Solução-padrão de cálcio (1,000 mg/cm³) — Deitar cuidadosamente sobre 2,4972 g de CaCO₃ p. a., secos previamente 2 horas a 285°C, quantidade suficiente de HCl N até eliminação de efervescência. Diluir para 1000 cm³, com água bidestilada.

Solução-padrão de cálcio (100,0 mg/1000 cm³) — Obtida a partir da anterior, por diluição a 1/10.

Solução-padrão de magnésio (1,000 mg/cm³) — Dissolver 1,000 g de aparas de magnésio p. a., em HCl N e diluir para 1000 cm³ com água bidestilada.

2.2.3 — Ensaio

Num tubo de ensaio colocar:

0,5 cm³ de solução a dosear (concentrações vizinhas das do soro sanguíneo 10,2 mg de Ca/100 cm³, 3,4 mg de Mg/100 cm³), 0,2 cm³ de solução alcoólica de hidroxiquinoleína a 2%. Misturar e friccionar de encontro às paredes, com uma vareta de vidro, durante 2 a 3 minutos, e juntar em seguida: 2 cm³ de solução de EDTA 0,002 M, 1 cm³ de solução diluída de calceína, 0,5 cm³ de solução de OHNa N. Adicionar, gota a gota, a solução titulante de cálcio (100,0 mg de Ca por 1000 cm³), até aparecimento de fluorescência verde.

2.3 — PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO

Seguimos o processo de LAUTIER (4), estabelecendo um esquema de padrões. Esse esquema baseia-se na mistura de soluções-padrão de Ca e Mg em proporções semelhantes às existentes no soro sanguíneo para o qual foi acertado inicialmente o método. Embora nos alimentos o teor em cálcio seja superior ao do magnésio, a relação cálcio-magnésio nas algas afastava-se bastante destas proporções, pelo que nas diluições indicadas em 2.1 tivemos de ter em conta este factor. Este acerto resulta também do facto de 2 cm³ de solução de EDTA 0,002 M equivalerem teoricamente a uma titulação de 160 γ de cálcio e 98 γ de magnésio (o ensaio a branco com o padrão de cálcio na concentração de 0,1000 mg/cm³ correspondia, na prática, a um gasto de 1,55 a 1,58 de solução-padrão).

Esquema dos padrões empregados

- A — Solução-padrão de cálcio com 10,0 mEq/dm³
 B — Solução-padrão de cálcio com 20,0 mEq/dm³
 C — Solução-padrão de cálcio com 25,0 mEq/dm³
 D — Solução-padrão de magnésio com 2,9 mEq/dm³
 E — Solução-mistura de Ca + Mg
 E₁ — 0,5 cm³ A (100 γ de Ca) + 0,5 cm³ D (18 γ de Mg)
 E₂ — 0,25 cm³ B (100 γ de Ca) + 0,5 cm³ D (18 γ de Mg)
 E₃ — 0,25 cm³ C (125 γ de Ca) + 0,5 cm³ D (18 γ de Mg)
 F — Solutio-mistura de Ca + Mg
 F₁ — 0,25 cm³ A (50 γ de Ca) + 1 cm³ D (36 γ de Mg)
 F₂ — 0,20 cm³ B (80 γ de Ca) + 1 cm³ D (36 γ de Mg)
 F₃ — 0,10 cm³ C (50 γ de Ca) + 1 cm³ D (36 γ de Mg)

Estas proporções foram estabelecidas teoricamente para trabalharmos em boa zona visual de viragem e com um excesso conveniente de EDTA.

No caso E₁, atendendo a que (160 γ—100 γ) Ca=60 γ Ca e 60 γ Ca <> 36,7 γ de Mg, havia que adicionar na mistura uma quantidade inferior a esta de magnésio. Escolhemos uma quantidade correspondente a cerca de metade do excesso existente, para assegurar uma margem de saturação larga.

Para os casos seguintes raciocinámos na mesma base. Estas diversas soluções foram tituladas com a solução-

-padrão de cálcio (100,0 mg/dm³), indicada em 2.2.2, e acertado o ponto de viragem de tal modo que foram obtidos na prática os títulos indicados no quadro que se segue:

Soluções-padrão	Concentrações em cálcio		Concentrações em magnésio	
	Teóricas	Encontradas	Teóricas	Encontradas
	mEq/dm ³			
A	10,0	10,0		
B	20,0	20,1		
C	25,0	25,1		
D			2,9	2,8
E ₁	5,0	5,0	1,4	1,5
E ₂	6,7	7,0	1,9	1,8
E ₃	8,3	8,3	1,9	1,8
F ₁	2,0	2,0	2,3	2,4
F ₂	3,3	3,5	2,4	2,1
F ₃	2,3	2,5	2,6	2,5

3 — RESULTADOS E DISCUSSÃO

Segundo LAUTIER, esta técnica apresenta três grandes vantagens: a de empregar pequeno volume de solução a dosear, a de ser rápida e a de poder determinar o ião cálcio e o ião magnésio simultaneamente. O ponto delicado, porém, é a viragem, que se obtém com um mínimo de reagente. A fluorescência verde deve observar-se sobre um fundo negro e sob luz ultravioleta, para um observador pouco experimentado.

Observámos fluorescência diferente antes e após precipitação do magnésio; no primeiro caso, a luminosidade era intensa, o que tornava o ponto de viragem mais delicado ainda. Para análises em série, a sensibilidade elevada do ponto de viragem e a necessidade de titulação sob luz ultravioleta tornava o doseamento visualmente cansativo para o executante, que não poderá efectuar grandes séries de ensaios ininterruptos. No entanto, o método complexométrico é mais cómodo na execução que o método manganométrico, quando suficientemente padronizado em relação aos reagentes e experiência analítica.

Além dos valores obtidos em 144 amostras de algas, foram salientados também os valores correspondentes a 4 amostras de ágar-ágar comercial, a 6 amostras de alimentos simples para animais e a 26 amostras de queijo-da-serra. Os resultados podem observar-se nos quadros I a II, expressos em mg por 100 g de amostra.

Na fig. 1 estão representadas as frequências de distribuição dos teores em cálcio relativos às 144 amostras de algas, por classes de 500 mg/100 g. A zona de distribuição estende-se à classe dos 6000-6500 mg/100 g.

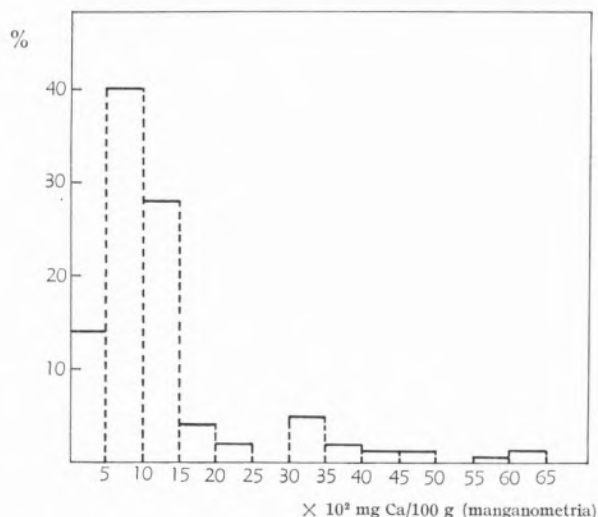


Fig. 1 — Frequências de distribuição dos teores em cálcio obtidos com 144 amostras de algas.

Os teores em cálcio de 82 % das amostras localizaram-se na zona abaixo de 1500 mg/100 g.

A aplicação de uma análise de regressão aos resultados obtidos com as algas e com os dois métodos levou-nos a estabelecer uma equação de regressão: $y = 0,991X + 0,13$, em que os valores de X correspondem aos valores obtidos por manganometria e os valores de y aos valores obtidos por complexometria. No estabelecimento desta recta foram eliminados os valores assinalados no quadro II, considerados aberrantes segundo o cálculo do intervalo de confiança pela tabela de Fischer e a um nível de probabilidade de 95 %. O prosseguimento da análise levou-nos a determinar a variância de Y (V_y), em relação à recta de regressão, o desvio-padrão da regressão (S_y) e o erro-padrão da regressão $\left(\frac{S_y}{\sqrt{n}}\right)$. Os valores

obtidos foram: $V_y = 9639,50$; $S_y = 98,1$; $\frac{S_y}{\sqrt{n}} = 8,4$.

Determinámos ainda a probabilidade de regressão:

$$S_a = \frac{S_y}{\sqrt{\sum (x - \bar{x})^2}} = 0,0079 \quad (a = 0,991);$$

$$t_{exp} = \frac{|a|}{S_a} = 125$$

e $\pm S_y \cdot t$ (95 p. 100) = ± 194 .

Consultada a tabela de Fischer, podemos concluir que a regressão é altamente significativa; no entanto, o

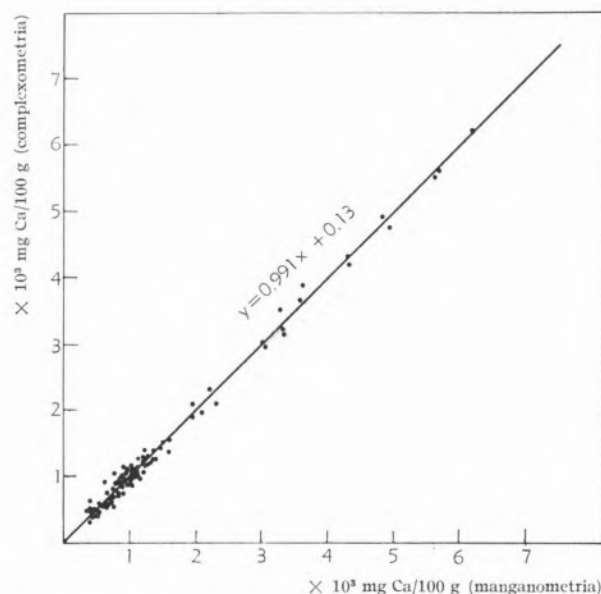


Fig. 2 — Equação de regressão obtida com 144 amostras de algas.

erro relativo entre os dois métodos, calculado a um nível de probabilidade de 95 p. 100, é superior a 10 p. 100 para valores inferiores a 1940 mg Ca por 100 g, ou seja para cerca de 86 % das amostras, e assim se ultrapassa o limite indicado na lei italiana para valores inferiores em relação ao valor declarado nos contratos de venda, o que pode ocasionar litígios. Convém, portanto, indicar no valor declarado o método seguido ou os desvios que o possam comprometer em relação ao método manganométrico.

4 — CONCLUSÕES

1 — O método complexométrico é mais cómodo na execução, quando suficientemente padronizado em relação aos reagentes e experiência analítica.

2 — Os resultados obtidos com os métodos manganométrico e complexométrico (calceína) não são perfeitamente equivalentes.

3 — Foi estabelecida uma recta de regressão entre os dois métodos para os resultados obtidos com 144 amostras de algas, de valor altamente significativo.

4 — O erro relativo obtido entre os dois métodos, a um nível de probabilidade de 95 p. 100, foi superior a 10 p. 100 para 86 % das amostras, com teor em cálcio inferior a 1940 mg por 100 g. É, portanto, útil, como margem de segurança, fazer acompanhar o teor em cálcio obtido com o método complexométrico, pelos desvios-padrão de regressão em relação ao método manganométrico.

Quadro I

ALIMENTOS

AMOSTRAS	CALCEÍNA	KMnO ₄
	VALORES MÉDIOS (mg/100 g)	
PALMISTE	275	285
COCO	87	115
SÊMEA DE TRIGO	137	170
MILHO AMARELO	35	33
FOLHELHO	370	410
ALFARROBA	336	328
QUEIJO-DA-SERRA	671	676
»	840	923
»	693	787
»	818	869
»	876	775
»	824	753
»	891	805
»	750	736
»	907	794
»	700	610
»	663	708
»	837	880
»	694	787
»	679	637
»	805	664
»	674	739
»	688	739
»	720	749
»	690	670
»	640	612
»	647	615
»	964	801
»	894	660
»	747	709
»	659	664
»	649	659

Quadro II

ALGAS E ÁGAR-ÁGAR (a)

AMOSTRAS N.º	CALCEÍNA	KMnO ₄
	VALORES MÉDIOS (mg/100 g)	
1	1095	1151
2	600	609
3	3029	3032
4	824	794
5	574	619
6	546	534
7	3904	3744
8	5545	5648
9	4745	4952
10	1398	1593
11	898	1044
12	675	724
13	1150	1139
14*	3924	3601
15	1000	1046
16	974	1084
17	3536	3311
18*	3833	3229
19	1199	1049
20	1416	1364
21	1999	2100
22	2335	2235
23	1245	1310
24	4909	4856
25	548	543
26	4399	4320
27	988	890
28	555	640
29	1191	1250
30	1265	1222
31	748	774
32	3248	3338
33	2122	2322
34	6241	6231
35	3164	3346
36*	3842	3477
37	4203	4328
38*	5345	6070
39	2951	3091
40	841	756
41	924	905
42	1054	989
43	624	739
44	500	560
45	450	470
46	450	485
47	400	515
48	600	560
49	500	495
50	500	375
51	449	449
52	674	425
53	799	849
54	798	857
55	1337	1310
56	550	430
57	524	679
58	348	442
59	497	432
60	373	365
61	942	813
62	424	480
63	400	475

Quadro II

ALGAS E ÁGAR-ÁGAR (continuação)

AMOSTRAS N.º	CALCEÍNA	KMnO ₄
	VALORES MÉDIOS (mg/100 g)	
64	524	504
65	424	484
66	400	409
67	548	548
68	396	416
69	501	501
70	600	680
71	562	570
72	448	478
73	511	489
74	425	475
75	499	514
76	447	541
77	449	489
78	424	449
79	574	769
80	775	665
81	616	540
82	804	860
83	1293	1398
84	1288	1412
85	1238	1322
86	1249	1269
87	1133	1134
88	1086	1244
89	1219	1279
90	1195	1200
91	574	619
92	615	670
93	1399	1378
94	2105	1961
95	1439	1493
96	1289	1160
97	1124	984
98	1108	1044
99	723	833
100	944	979
101	750	839
102	900	971
103	1268	1326
104	1049	1154
105	995	1045
106	594	1009
107	949	649
108	1198	1159
109	1146	1071
110	949	849
111	875	899
112	1008	1134
113	999	1184
114	1098	789
115*	1337	878
116	1324	1319
117	912	829
118	758	814
119	719	794
120*	5057	6049
121	3669	3692
122	1094	1074
123	1680	1664
124	1241	1316
125	1949	1979
126	745	854
127	1424	1244

Quadro II

ALGAS E ÁGAR-ÁGAR (continuação)

AMOSTRAS N.º	CALCEÍNA	KMnO ₄
	VALORES MÉDIOS (mg/100 g)	
128	1174	939
129	1571	1606
130	1086	997
131	993	911
132	1288	1258
133	938	958
134	1321	1381
135	1512	1537
136	1297	1375
137	1189	1120
138	849	904
139	836	868
140	808	835
141	832	840
142	1097	1168
143	899	919
144	1310	1220
145 (a)	224	252
146 (a)	453	501
147 (a)	456	500
148 (a)	375	427

BIBLIOGRAFIA

1. «Méthodes Officielles pour l'Analyse des Echantillons de Produits de l'Alimentation Animale», *Ann. Fals. Expert. Chim.*, 54 (628), 199 (1961).
2. Ferreira, F. A. G. e Graça, M. E. S., «Tabela de Composição dos Alimentos Portugueses», Direcção-Geral de Saúde, Lisboa, 1961.
3. «La Nuova Legge sulla Disciplina della Preparazione e del Commercio dei Mangimi per Uso Zootecnico», *Zoo-profilassi*, 2, 131 (1963).
4. Lautier, F., *Ann. Fals. Expert. Chim.*, 55 (642), 202 (1962).
5. «Official Methods of Analysis», 9.^a ed., Association of Official Agricultural Chemists, Washington, D. C., 1960.
6. Neto, I., ed. «Análise de Géneros Alimentícios», Lisboa, 1959.
7. Lacroix, Y., «Analyse Chimique — Interprétation des résultats par le calcul statistique», Masson, Paris, 1962.
8. L'Héritier, Ph., «Les méthodes Statistiques dans l'Expérimentation Biologique», Centre Nat. Rech. Sci., Paris, 1949.
9. «Farmacopeia Portuguesa», Suplemento 4, Imprensa Nacional, Lisboa, 1961.

ABSTRACT

The results obtained using EDTA and calcein complexometric methods are compared with those obtained with the official manganometric method in 180 samples. From the statistical analysis of the results obtained with the seaweed, it was concluded that both methods are tied up by a regression straight line of highly significant value. The standard deviation between both methods as calculated at 95 p. 100 level of probability permits reversion of the values in the case of samples with high Ca content.

Recebido 31. Maio. 1966