

**NORMA
VENEZOLANA**

**COVENIN
2474:2001**

**CARNE Y PRODUCTOS CÁRNICOS.
DETERMINACIÓN
DE FÓSFORO TOTAL.
MÉTODO COLORIMÉTRICO**

(1^{ra} Revisión)



PRÓLOGO

La presente norma sustituye totalmente a la Norma Venezolana COVENIN **2474-87**, fue revisada de acuerdo a las directrices del Comité Técnico de Normalización **CT10 Productos Alimenticios**, por el Subcomité Técnico **SC5 Productos Cárnicos** y aprobada por **FONDONORMA** en la reunión del Consejo Superior N° **2001-07** de fecha **25/07/2001**.

En la revisión de esta Norma participaron las siguientes entidades: Ministerio de Salud y Desarrollo Social, Instituto Nacional de Higiene, Instituto Nacional de Nutrición, Universidad Simón Bolívar, CIEPE, Pillsbury de Venezuela, Herma, S.A., Industria Alimenticia Corralito, Plumrose Latinoamericana, C.A., Proagro-Protinal, Charvenca, AICAR.

**NORMA VENEZOLANA
CARNE Y PRODUCTOS CÁRNICOS.
DETERMINACIÓN DE FÓSFORO TOTAL.
MÉTODO COLORIMÉTRICO**

**COVENIN
2474:2001
(1^{ra} Revisión)**

1 OBJETO

Esta norma venezolana establece dos métodos de ensayo para la determinación del contenido de fósforo en carne y productos cárnicos.

2 REFERENCIAS NORMATIVAS

Las siguientes normas contienen disposiciones que al ser citadas en este texto, constituyen requisitos de esta Norma Venezolana. Las ediciones indicadas estaban en vigencia en el momento de esta publicación. Como toda norma está sujeta a revisión, se recomienda a aquellos que realicen acuerdos con base en ellas, que analicen la conveniencia de usar las ediciones más recientes de las normas citadas seguidamente.

COVENIN 1178:83 Alimentos. Determinación de fósforos.

3 MÉTODOS DE ENSAYO

3.1 Definiciones

3.1.1 Contenido de fósforo: Es la cantidad de fósforo contenido en la muestra, determinado por medio de los procedimientos descritos en esta norma y expresado como porcentaje de pentóxido de fósforo (P_2O_5).

3.2 Método de fósforo (Colorimétrico)

3.2.1 Principio

Este método se basa en medir cuantitativamente el color amarillo, producido por la formación de un complejo de fósforo y vanadomolibdato, el cual es proporcional a la cantidad de fósforo presente.

3.2.2 Equipos

3.2.2.1 Espectrofotómetro

3.2.2.2 Balón aforado (25, 100, 200, 500 ml)

3.2.2.3 Estufa

3.2.2.4 Mufla

3.2.2.5 Mechero

3.2.2.6 Rejilla

3.2.2.7 Plancha eléctrica

3.2.2.8 Papel de filtro Watman N° 1 ó su equivalente

3.2.2.9 Pipetas volumétricas (de 5, 10, 25 y 50 ml)

3.2.2.10 Crisoles o cápsulas de porcelana

3.2.2.11 Espátula

3.2.2.12 Dispensadores de agua

3.2.2.13 Embudos

3.2.3 Reactivos

Todos los reactivos deben ser de grado analítico y el agua debe ser destilada o de pureza equivalente a menos que se especifique lo contrario.

3.2.3.1 Fosfato diácido de potasio (KH_2PO_4) $d=136,09 \text{ g/mol}$

3.2.3.2 Ácido clorhídrico concentrado (HCl) $d = 1.19$

3.2.3.3 Monovanadato de amonio (NH_4VO_3)

3.2.3.4 Ácido nítrico (HNO_3) concentrado $d= 1.422 \text{ g/ml}$

3.2.3.5 Molibdato de amonio tetrahidratado ($(\text{NH}_4)_6 \text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$).

3.2.4 Soluciones

3.2.4.1 Solución patrón de fósforo ($500 \mu\text{g/ml}$) expresados como fósforo (P): Se disuelven $1,0984 \text{ g}$. de fosfato diácido de potasio en 400 ml de agua en un balón aforado de 500 ml , agregar 5 ml de ácido clorhídrico concentrado y llevar a volumen

3.2.4.2 Solución de trabajo ($20 \mu\text{g/ml}$): Tomar 10 ml de la solución patrón de fósforo, transferir a un balón aforado de 250 ml y llevar a volumen

3.2.4.3 Solución vanadomolibdica: Disolver $1,2 \text{ gr}$ de Metavanadato de amonio en aproximadamente 125 ml de agua a una temperatura de $80-90^\circ\text{C}$ y añadir gradualmente 170 ml de ácido nítrico concentrado, luego pesar $8,85 \text{ grs}$ de molibdato de amonio tetrahidratado, disolverlos en agua y agregarlos a la solución vanadolibdica y llevar a volumen de 500 ml

3.2.4.4 Solución ácido clorhídrico 1:1 (por cada 1 ml de ácido, 1 ml de agua)

3.2.4.5 Solución ácido clorhídrico $0,2 \text{ N}$: Diluir $16,5 \text{ ml}$ de ácido clorhídrico concentrado en agua destilada y llevar a volumen en un balón de 1000 ml

3.2.5 Procedimiento

3.2.5.1 Elaboración de la curva patrón

3.2.5.2 A partir de la solución de trabajo ($20 \mu\text{g/ml}$) tomar alícuotas de $0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9$ y 10 ml , transferirlas a balones aforados de 25 ml . Seguidamente agregar $2,5 \text{ ml}$ de la solución de ácido clorhídrico ($0,2\text{N}$) para lograr el pH adecuado y $2,5 \text{ ml}$ de la solución vanadomolibdica. Llevar a volumen con agua y dejar reposar 10 min . Estas soluciones contienen $0,0; 0,8; 1,6; 2,4; 3,2; 4,0; 4,8; 5,6; 6,4; 7,2; 8,0 \mu\text{g/ml}$ de fósforo respectivamente.

3.2.5.3 Leer la absorbancia de cada una de las soluciones contra el blanco, usando el espectrofotómetro a una longitud de onda de 420 nm .

3.2.5.4 Se construye la curva patrón de la absorbancia contra la concentración de las soluciones.

3.2.6 Determinación

3.2.6.1 En un crisol de porcelana previamente desecado en estufa a 105°C y tarada hasta peso constante, pesar 2 g de muestra homogeneizada en una cápsula de porcelana previamente desecada.

3.2.6.2 Carbonizar cuidadosamente la muestra con un mechero o plancha eléctrica y luego llevar a la mufla a $550 \pm 10^\circ\text{C}$, hasta obtener cenizas de color blanco, gris o amarillento (dicha coloración dependerá de la naturaleza de la muestra).

3.2.6.3 Humedecer las cenizas obtenidas con 5 ml de la solución de ácido clorhídrico 1:1, evaporar casi a sequedad en una plancha eléctrica con regulador de temperatura.

3.2.6.4 Añadir otros 5 ml de la solución ácido clorhídrico (1:1) calentando a baja temperatura en una plancha eléctrica con regulador de temperatura, por 30 minutos aproximadamente, para hidrolizar los pirofosfatos a ortofosfatos.

3.2.6.5 Filtrar el hidrolizado utilizando papel de filtro recibiendo el filtrado en un matraz aforado de 100 ml y llevar a volumen con agua destilada.

3.2.6.6 Transferir 1 ml de la solución obtenida en el paso anterior a un balón aforado de 25 ml.

3.2.6.7 Añadir 2,5 ml de la solución vanadomolibdica, llevar a volumen con agua destilada y agitar. Dejar reposar a temperatura ambiente durante 10 min.

3.2.6.8 Leer la absorbancia contra el blanco de reactivo, usando el espectrofotómetro a una longitud de onda de 420 nm.

3.2.7 Expresión de resultados

3.2.7.1 El contenido de fósforo en la muestra expresado como porcentaje (%) de pentóxido de fósforo (P_2O_5) se calcula mediante la siguiente expresión:

$$\%P_2O_5 = \frac{C}{M} 5,72 \times 10^{-3}$$

Si se modifica el procedimiento descrito en esta norma se puede utilizar la siguiente fórmula

$$\% P_2O_5 = \frac{C \times V \times F \times 2,5 \times 10^{-3}}{V_o \times M}$$

Donde:

P_2O_5 g de fósforo/100 gr de muestra, expresado como (%) de pentóxido de fósforo.

C μ g/ml de fósforo obtenidos en la curva de patrón.

V Volumen total de la solución de cenizas en (ml) mililitros.

V_o Alicuota tomada de la solución de cenizas, en mililitros (ml).

M Masa de la muestra en gramos.

F Factor de conversión de fósforo (P_2O_5) = 2,29.

NOTA: Para la determinación de fósforo se puede utilizar la referencia de la Norma Venezolana COVENIN 1178:83, con la modificación del tratamiento de la muestra para productos cárnicos

3.2.8 Informe

El informe debe contener:

3.2.8.1 Fecha de realización del análisis.

3.2.8.2 Identificación completa de la muestra.

3.2.8.3 Resultado del análisis.

3.2.8.4 Número y título de la Norma Venezolana COVENIN consultada

3.2.8.5 Nombre del análisis

3.2.8.6 Observaciones.

3.3 Método Colorimétrico (Referencia ISO 2294)

3.3.1 Definiciones

3.3.1.1 Contenido total de fósforo en carne y productos cárnicos: Es el contenido de fósforo determinado por el fósforo determinado por el procedimiento descrito y expresado como porcentaje de pentóxido de fósforo por masa.

3.3.2 Principio

El método se basa en la mineralización de una porción de muestra con ácido sulfúrico, ácido nítrico, precipitando el fósforo contenido en la muestra como fosfornolbato de quinolina. Secar y pesar el precipitado.

Una alternativa el método de mineralización es descrito en la punto 3.3.8.

3.3.3 Reactivos

Todos los reactivos deben ser de grado analítico. Agua destilada o agua de pureza equivalente debe ser usada en la prueba.

3.3.3.1 Ácido Sulfúrico $d_{20} = 1,84$ g/ml

3.3.3.2 Ácido Nítrico $d_{20} = 1,40$ g/ml

3.3.3.3 Reactivos para la precipitación.

3.3.3.3.1 Disolver 70 g de Molibdato de Sodio dihidratado ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) en 150 ml de agua.

3.3.3.3.2 Disolver 60 g de ácido cítrico monohidratado $\{\text{CH}_2(\text{CO}_2\text{H})\text{COH}(\text{CO}_2\text{H})\text{CH}_2(\text{CO}_2\text{H}) \cdot \text{H}_2\text{O}\}$ en 150 ml de agua y añadir 85 ml de ácido nítrico.

3.3.3.3.3 Gradualmente añadir la solución 3.3.3.3.1 a la solución 3.3.3.3.2 mediante agitación.

3.3.3.3.4 Añadir sucesivamente a 100 ml de agua 35 ml de ácido nítrico y 5 ml de Quinolina destilada. Gradualmente añadir esta solución en la mezcla 3.3.3.3.3 mediante agitación. Dejar reposar por 24 horas a temperatura ambiente. Filtrar, añadir 280 ml de acetona y diluir a 1000 ml con agua. Almacenar el reactivo en una botella plástica bien tapada y mantenerla en la oscuridad.

3.3.4 Aparatos

Equipos usuales de laboratorio y otros más específicos:

3.3.4.1 Picador mecánico de carne o (molinillo), de tamaño para laboratorio con una placa con orificios de diámetro no menor a 4 mm.

3.3.4.2 Balanza analítica.

3.3.4.3 Un balón Kjeldahl, capacidad 250 ml, o en un balón de cuello largo con fondo redondo.

3.3.4.4 Aparato para calentamiento, en el cual el frasco puede ser calentado en una posición inclinada de tal modo que la fuente de calor solo toque la parte de fondo de balón, lo que está por debajo del nivel del líquido. Por calentamiento a gas, o mechero es conveniente un aparato con una placa de asbesto provisto de orificios circulares, de tal manera que solo la parte más baja del frasco esté expuesta a la llama.

3.3.4.5 Aparato de succión, para remover los ácidos generados durante la digestión.

3.3.4.6 Filtro de vidrio de poros con diámetros de 5 a 15 μm (P.16).

3.3.4.7 Balón de succión cónica.

3.3.4.8 Desecador provisto con un desecante.

3.3.4.9 Pipeta Pasteur.

3.3.5 Muestra

Preparar una muestra representativa mínima de 200 g. Almacenar la muestra de tal forma de prevenir el deterioro y cambio en la composición.

3.3.6 Procedimiento

3.3.6.1 Preparar una muestra homogénea pasando como mínimo dos veces a través del molinillo de carne y mezclar. Guardar la mezcla homogénea en un frasco hermético, cerrado, completamente lleno, y almacenado

de tal forma que prevenga el deterioro y cambio en la composición de la muestra. Analizar la muestra tan rápido como sea posible, pero antes de 24 horas, de acuerdo al método dado en 3.3.6.2 a 3.3.6.4, según el punto 3.3.8.

Si la muestra no es analizada inmediatamente después de haber sido pasada por el molinillo, puede ocurrir la separación del líquido en reposo. Por consiguiente se debe homogenizar la muestra completamente con un tenedor inmediatamente antes de tomar la porción para la prueba.

3.3.6.2 Porción para la prueba: Pesar con una apreciación de 0.001 g alrededor de 3 g de muestra, en el frasco, véase NOTA en el punto 3.3.6.4.

3.3.6.3 Mineralización: Agregar 20 ml de ácido nítrico, y algunas perlas de vidrio. Colocar el balón en una posición inclinada (desde un ángulo de 40°C con respecto a la vertical), en el aparato de calentamiento,

Calentar por cinco minutos, enfriar y después agregar 5 ml de ácido sulfúrico. Calentar el frasco poco a poco hasta que cese la espuma. Calentar después un poco más fuerte. Tan pronto como la muestra comience a carbonizarse, añadir más ácido nítrico con una pipeta pasteur y continuar calentado. Repetir la operación hasta que haya cesado la formación de vapores pardos.

Finalmente, cuando el líquido comience a cambiar de color, calentar hasta que aparezcan vapores blancos. Enfriar y añadir 15 ml de agua y hervir poco a poco por 10 min, minimizando la evaporación de agua (por ejemplo: por medio de un bulbo de vidrio en forma de pera, insertado en el cuello del frasco). Transferir el líquido cuantitativamente a un Beaker de 2 ml o a un balón cónico, enjuagando el balón con agua. Añadir 10 ml de ácido nítrico. El total del volumen líquido debería ser entonces 50 ml.

3.3.6.4 Determinación

Adicionar 50 ml del reactivo para precipitación al líquido obtenido en el paso anterior, cubrir con un vidrio de reloj y hervir por un minuto en una plancha de calentamiento colocando el aparato de succión. Dejar enfriar a temperatura ambiente agitando el contenido tres o cuatro veces.

Filtrar por medio de una succión, la cual debe haber sido previamente calentada por 30 min. Lavar el precipitado obtenido en filtro cinco veces con una porción de 25 ml de agua, usando esta agua al mismo tiempo el precipitado remanente que haya quedado en el frasco cónico y en el filtro durante la filtración. Secar en el horno, a una temperatura de 260 +/- 20°C, por una hora. Enfriar en el desecador y pesar con una apreciación de 1 mg. Realizar dos determinaciones de la misma muestra.

NOTA: Si la masa del precipitado seco es mayor de 750 mg, repetir el análisis con una porción más pequeña que la muestra.

3.3.6.5 Prueba de blanco reactivo

Llevar simultáneamente una prueba en blanco, paralelo al análisis mismo, usando el mismo procedimiento y las mismas cantidades de todos los reactivos pero omitiendo la porción para la muestra.

3.3.7 Expresión de resultados

3.3.7.1 Método de cálculo y fórmula: Calcular el contenido de fósforo, expresando como porcentaje de pentóxido de fósforo por masa, y por medio de la fórmula.

$$0.03207 \times m_1 \times \frac{100}{m_0} = 3.207 \frac{m_1}{m_0}$$

Donde:

m_0 es la masa, en gramos de la porción en la prueba.

m_1 es la masa, en gramos del precipitado de fosfomolibdato de quinolina.

Tomar como resultado la medida aritmética de las dos determinaciones, proporcionan que las condiciones de repetibilidad son satisfechas (véase 3.3.7.2). Reportar los resultados con una apreciación de 0,01 g de pentóxido de fósforo por 100 g de muestra.

3.3.7.2 Repetibilidad

La diferencia encontrada en los resultados de las dos determinaciones realizadas simultáneamente o en forma consecutiva por el mismo analista, debe ser mayor que 0,02 g de pentóxido de fósforo por 100 g de muestra.

3.3.8 Nota sobre el procedimiento

Si se quiere, la mineralización puede ser llevada a cabo por incineración. Luego procede como sigue:

Tomar las cenizas, añadir 15 ml de ácido nítrico concentrado, usando una varilla para agitar la disolución. Transferir el líquido a 250 ml de un frasco cónico. Lavando las cenizas del crisol y la varilla varias veces con agua, y añadiendo al lavado el líquido contenido en el balón. Diluir con aproximadamente 75 ml.

Calentar por 30 min en un baño de agua hirviendo. Dejar enfriar y proceder de acuerdo al punto 3.3.7.

3.3.9 Reporte del ensayo

El reporte del ensayo debe indicar el método usado y los resultados obtenidos. Se debe mencionar cualquier condición de operación no especificada en estas normas de ensayo o cualquier consideración opcional. Así como cualquier circunstancia que puedan haber influido en los resultados.

El reporte debe incluir todos los detalles requeridos para la completa identificación de las muestras o de la muestra analizada.

3.3.10 Informe

Véase el punto 4.1.8.

BIBLIOGRAFÍA

Graner C.A. F.Meita y Muccialo P. 1975 - 1976. Determinacao do fósforo.

Determinación de fósforo en productos cárnicos. Revistas Instituto Adolfo Lutz N° 35 y 36 Pag. 55 y 62. Brasil

ISO 2294: 1974 Meat and meat products Determination of total phosphorus content

Participaron en la segunda revisión de esta norma: Brito, Odoardo; Cols, Manuel; Chávez, José; González, Zulay; Heredia, Luis; Herrera, Ofelia; Hispano, Valladares; Imbs, Jorge; Lagonell, Reinaldo; León, María; Méndez, Gladys; Monfort, Arantza; Ortega, Elizabeth; Pérez, Idda; Salazar, Jesús.

Participaron en la revisión de esta norma: Afanador, María Victoria, Ascanio, Norelis; Castro, Roger; Di Ciano, Gabriel; Fermín, Lesly; Lugo, del Valle; Miranda, Mariela; Molina, Mildred; Ovalles, Martha; Vivas, Elizabeth.

COVENIN
2474:2001

CATEGORÍA
B

FONDONORMA

Av. Andrés Bello Edif. Torre Fondo Común Pisos 11 y 12

Telf. 575.41.11 Fax: 574.13.12

CARACAS



publicación de:

FONDONORMA

I.C.S: 67.120.10

ISBN: 980-06-2769-3

RESERVADOS TODOS LOS DERECHOS
Prohibida la reproducción total o parcial, por cualquier medio.

Descriptores: Carne, producto cárnico, fósforo total, método colorimétrico.