

ADAPTACIÓN DE UN MICROMÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA DETERMINACIÓN DE FÓSFORO EN HUESO

CARLOS R. SABIDO COUOH, J. GABRIEL ROSADO RUBIO, ARTURO F. CASTELLANOS RUELAS*, DAVID A. BE-TANCUR ANCONA, LUIS A. CHEL GUERRERO, PABLO O.M. ACERETO ESCOFFIÉ

(Received February 2010; Accepted August 2010)

ABSTRACT

The aim of this work was to adapt the method of phosphorus (P) determination proposed by the A.O.A.C. (2005) in order to work with bone samples obtained through biopsy with a size being equal or smaller to 0.5g. Samples of the twelfth rib of ovines were collected, by means of biopsy. After adapting the method concerning the amount of used reagents, several calculations were carried out: the percentage of recovery, the precision and exactitude, sensitivity and linearity. The percentage of recovery was 89.97; the method showed 6.3% of precision and 3.56% exactitude; sensitivity of calibration was $0.132 \mu\text{g}^{-1}$ and the linearity was 0.999. It is concluded that it is feasible to determine P in bone samples of a size equal or smaller to 0.5 g by means of the use of the modified technique of A.O.A.C. (2005) adapted to micro-samples. This modified technique demonstrated to be reliable when considering these analytical parameters.

Key words: Phosphorus, bone minerals, biopsy, validation.

RESUMEN

El presente trabajo se realizó con la finalidad de adaptar el método de determinación de fósforo (P) propuesto por la A.O.A.C. (2005) para analizar muestras de hueso obtenidas a través de biopsia de un tamaño igual o menor a 0.5g. Para ello, se colectaron muestras de la decimosegunda costilla de ovinos mediante biopsia. Después de adaptar el método en cuanto al volumen de los reactivos utilizados, se calculó el porcentaje de recuperación, la precisión y exactitud, la sensibilidad y finalmente la linealidad. Los resultados indicaron que el porcentaje de recuperación fue de 89.97; el método mostró 6.3% de precisión y una exactitud del 3.56%; se estableció la sensibilidad de calibración en $0.132 \mu\text{g}^{-1}$ y la linealidad fue 0.999. Se concluye que es factible determinar P en muestras de hueso de un tamaño igual o menor a 0.5 g mediante el empleo de la técnica propuesta por la A.O.A.C. (2005) adaptada a micromuestras. Esta técnica modificada demostró ser confiable al considerar sus parámetros analíticos.

Palabras clave: Fósforo, minerales en hueso, biopsia, validación.

Facultad de Ingeniería Química. Universidad Autónoma de Yucatán.
Campus de las Ingenierías y Ciencias Exactas. Periférico Nte. km 33.5. Tablaje Catastral 13615. Col. Chuburná de Hidalgo Inn. C.P. 97203. Mérida, Yuc. México.

*Correspondencia a: Dr. Arturo F. Castellanos Ruelas. Teléfono (999)946.0989 extensión 1113. Correo electrónico: cruelas@uady.mx

INTRODUCCIÓN

El diagnóstico del estatus mineral de los rumiantes en pastoreo está basado en el análisis de los forrajes que consumen; sin embargo, es una herramienta incompleta ya que no considera el grado de absorción intestinal. Una manera de reforzarlo es mediante el estudio mineral de muestras de hueso obtenidas *in vivo*. Dado que las costillas y el esqueleto axial son rehabilitados más rápidamente que los huesos largos, es ahí que pueden ser detectados los cambios minerales atribuibles a la dieta (Underwood y Suttle, 2001). El resultado e interpretación del análisis permite llevar a cabo estrategias de suplementación mineral tendientes a incrementar la productividad (Fick *et al.*, 1979; Underwood y Suttle, 2001).

La metodología de muestreo ha sido descrita previamente (Little, 1972). Consiste en la obtención de una porción de costilla del animal mediante biopsia, en condiciones asépticas. Para que sea confiable, es necesario que se obtengan varias muestras procedentes de diversos animales ubicados en un mismo sitio geográfico (rancho o región).

El tamaño de la muestra de costilla debe ser el requerido por la técnica analítica. Para el caso del fósforo (P), en ausencia de un método específico para cuantificarlo en hueso, se utiliza la técnica empleada para determinarlo en plantas y vegetales, la cual requiere de 2 g de muestra (BS) (Método oficial 931.01) (A.O.A.C., 2005). Sin embargo en la práctica, este tamaño de muestra en la mayoría de las ocasiones no es posible de obtenerla *in vivo* por el daño que se le ocasiona a los animales sobre todo en aquellas especies de talla pequeña, como los ovinos y caprinos. Es por ello que se requiere adaptar el método oficial al análisis de muestras pequeñas, por lo que resulta necesario realizar la validación del mismo.

El término validación puede definirse como la comprobación de la repetibilidad y

de la efectividad de una técnica, operación o proceso. La validación de un método analítico se refiere a su evaluación cuantitativa y tiene como objetivo proporcionar información fiable, exacta y de fácil interpretación sobre el objeto de análisis (Coy, 1999).

Para validar un método analítico se debe cumplir con ciertos parámetros analíticos (Coy, 1999) entre los cuales destacan los siguientes:

Porcentaje de recuperación. Es la capacidad que tiene un procedimiento analítico para determinar cuantitativamente un analito que ha sido adicionado a una muestra. Se expresa como porcentaje (% R).

Precisión y exactitud. La precisión es la repetibilidad de los resultados. Una forma de expresarla es calculando el coeficiente de variación (CV). Para muestras macro el CV debe ser menor que 1%; para muestras trazas se puede aceptar un CV hasta del 5%; para ultratrazas se puede considerar que un CV de 10% es bueno (Villegas *et al.*, 2006). Se consideran muestras macro las concentraciones mayores de 0.1g/100g; trazas las que estén comprendidas entre 0.005 a 0.1 g/100g; y ultratrazas, concentraciones menores de 0.0005g/100g (Villegas *et al.*, 2006). Por otro lado la exactitud es una medida de cuánto se desvían los valores obtenidos experimentalmente del valor aceptado como verdadero. Se expresa en términos de error absoluto o error relativo.

Sensibilidad. Es el cambio de la respuesta instrumental atribuible al cambio de concentración y se expresa como la pendiente de la recta de regresión. Como valor se puede utilizar el promedio de las pendientes obtenidas en las rectas de los ensayos de estandarización, indicando su desviación estándar.

Linealidad. Es el intervalo de concentraciones donde la respuesta del detector es proporcional a la variación de la cantidad de analito. Hay linealidad cuando la pendiente que se obtiene al representar gráficamente

la absorbancia *vs* la concentración del analito es una línea recta (Villegas *et al.*, 2006).

Con base en lo anterior, se llevó al cabo el presente trabajo teniendo como objetivo adaptar el método de determinación de fósforo propuesto por la A.O.A.C. (2005) para analizar muestras de hueso obtenidas a través de biopsia de un tamaño igual o menor a 0.5g.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se obtuvieron muestras *in vivo* de costilla de ovinos de raza Pelibuey los cuales estaban en condiciones de pastoreo en el estado de Yucatán (Turriza *et al.*, 2007). Se utilizó la técnica de Little (1972), observando los lineamientos relativos al trato de los animales experimentales propuestos por el C.I.C.U.A.E. (2009).

Para la determinación de P se utilizó como base el procedimiento propuesto en las normas oficiales de la A.O.A.C. (2005) (Método oficial 931.01).

La preparación de los reactivos y las muestras utilizados así como la descripción del método se describen a continuación:

Reactivos

a) Solución estándar de fósforo 0.025 mg P/mL. Disolver 0.4394 g de KH_2PO_4 en agua y diluir a 1.0 L. Diluir 50.0 mL de ésta solución a 200.0 mL.

b) Solución de nitrato de magnesio. Disolver 950 mg de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ libre de fósforo en agua. Completar el volumen hasta 1.0 L.

c) Solución de molibdato de amonio. Disolver 25 g de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ en 300.0 mL de agua. Diluir 75.0 mL de H_2SO_4 a 200.0 mL y añadir a la solución de molibdato de amonio.

d) Solución de hidroquinona. Disolver 0.5 g de hidroquinona en 100.0 mL de agua y añadir una gota de H_2SO_4 para retardar la oxidación.

e) Solución de sulfito de sodio. Disolver 200 g de Na_2SO_3 en agua. Diluir a 1.0 L y filtrar. Mantener esta solución bien tapada o preparar una nueva cada vez que se vaya a utilizar.

Preparación de las muestras de costilla

Se colocaron muestras de aproximadamente 0.5 g de hueso en una cápsula de porcelana, se añadió 1.0 mL de solución de HCl y se sometieron a baño maría. Después de aproximadamente 10 minutos se añadieron 3 a 5 gotas de HCl QP teniendo el cuidado de no salpicar fuera de la cápsula de porcelana. Se repitió la adición de ácido hasta 2 veces mientras la solución de la muestra permaneció en el baño maría, todo con el único propósito de evitar que la muestra se secase o carbonizara durante el tratamiento. Cuando la muestra se volvía viscosa durante el tratamiento a baño maría, era necesario completar el secado en una placa de calentamiento, siempre controlando el proceso y evitando la carbonización. Posteriormente las cápsulas se colocaron en una mufla a 500°C por 6 horas o hasta que se obtuvieron cenizas grises (en algunas muestras fue necesario disolver las cenizas en un poco de agua o en una mezcla 1:1 de alcohol-glicerol mientras la cápsula estaba fría, evaporar a sequedad y volver a colocar las cápsulas en la mufla durante otras 4 o 5 horas). Concluida la incineración se dejaron enfriar, se agregó 0.5 ml de HCl (1:4) y se transfirió la mezcla a un vaso de precipitados de 100.0 mL. A la mezcla ácida se le añadieron otros 5.0 mL de HCl y se volvió a evaporar a sequedad en baño maría con el propósito de eliminar SiO_2 . Los residuos se humedecieron otra vez con 2.0 mL de HCl; se añadió 50.0 mL de agua y se calentó unos minutos nuevamente en el baño maría. Una vez concluido el tratamiento, la muestra se transfirió a un matraz volumétrico de 100.0 mL, se enfrió bruscamente (sumergiendo en agua con hielo), se completó con agua destilada hasta el aforo agitando continuamente y por último se filtró.

Determinación de fósforo (P)

El método original consiste en la formación de fosfomolibdato de amonio. Para ello, a una alícuota de 5.0 mL del filtrado de la muestra (2 g) se le añade 1.0 mL de la solución de molibdato de amonio, se mezcla y se deja reposar unos segundos; posteriormente se agrega 1.0 mL de solución de hidroquinona, se agita la mezcla y se adiciona 1.0 mL de la solución de sulfito de sodio. Por último se completa con agua destilada hasta el aforo y se agita vigorosamente en un Vortex dejando reposar la muestra por espacio de 30 minutos. Pasado este tiempo se lee la absorbancia de la muestra en la longitud de onda de máxima absorción del fosfomolibdato de amonio, λ_{650} nm. Este procedimiento está diseñado para su aplicación a muestras provenientes de plantas. En el diagrama de flujo de la figura 1 se muestran los ajustes de los volúmenes utilizados para el análisis de P en muestras de 0.5 g de costilla.

Para la cuantificación de P se preparó una recta de calibrado utilizando siete

estándares de concentración conocida de fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4 , J.T. Baker, USA), incluyendo un blanco de agua para extrapolar hasta cero. Cada estándar se leyó por triplicado durante tres días consecutivos, dando un total de 63 lecturas de absorbancia. A los valores obtenidos en cada día de mediciones, se les calculó el coeficiente de correlación lineal.

Tanto las muestras, como los estándares mostraron una coloración azul cuya intensidad fue proporcional a la concentración de P, de tal manera que las concentraciones y absorbancias correspondientes fueron consistentes con la ley de Lambert y Beer (Harris, 1992; Skoog *et al.*, 2001).

Las absorbancias de las muestras se obtuvieron mediante lecturas a λ_{650} nm en un espectrofotómetro marca Spectronic modelo 20 Genesys equipado con cubetas de vidrio. La concentración de las muestras se determinó por interpolación de sus valores de absorbancia en las rectas de calibrado.

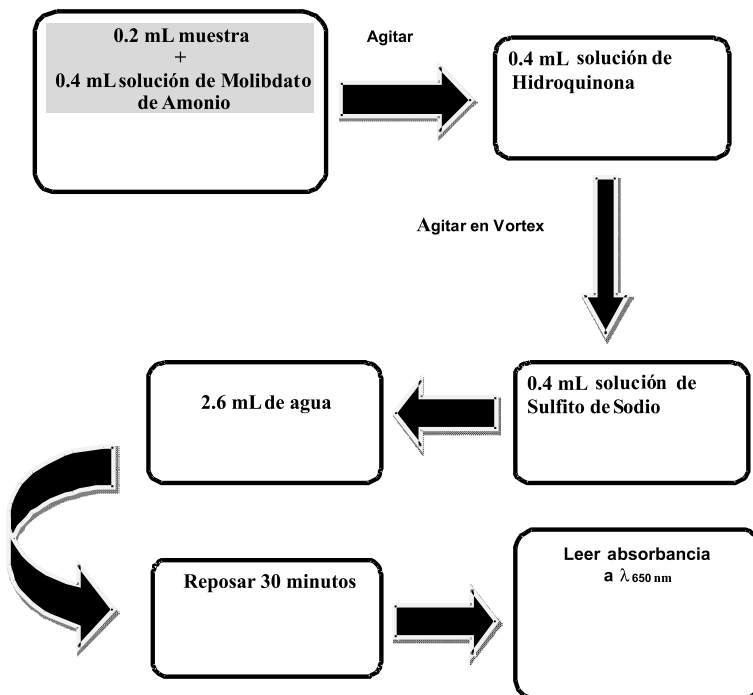


Figura 1. Diagrama que muestra el procedimiento para la determinación de fósforo en muestras pequeñas de hueso de costilla de ovinos.

Validación del método para determinar P en micromuestras de hueso

1. Porcentaje de recuperación

Se utilizó el método de añadido y recuperado, empleando disoluciones de concentración conocida bajo un régimen de 3 réplicas con dos repeticiones por réplica haciendo un total de 6 preparaciones. Las muestras de hueso utilizadas se identificaron como R21M3H; R4M2H; R31M1H, fueron seleccionadas al azar (Turriza *et al.*, 2007) y su contenido de P fue previamente evaluado. Durante los análisis se utilizó un blanco de reactivo el cual contenía todas las soluciones excepto la muestra. Como referencia se usó un blanco de agua, preparando una solución con un volumen de agua bidestilada igual al volumen de muestra utilizado en las determinaciones. Las muestras se sometieron al protocolo de análisis descrito en el diagrama de flujo de la figura 1, y los valores de absorbancia obtenidos en cada repetición se interpolaron en una recta de calibrado preparada en paralelo para cada serie. En el mismo sentido, y como control del experimento, se utilizó la recta de la determinación de P calculada con los siete estándares, para asegurar la linealidad y repetitividad del método. Una vez obtenidas las absorbancias, se interpolaron los valores, y las cantidades de P obtenidas en cada muestra se compararon con las cantidades esperadas de las muestras adicionadas con una cantidad equivalente de estándar de concentración conocida (100 μl = 2.5 μg de P). Las diferencias encontradas entre las cantidades de P de las muestras con y sin añadido corresponden al valor de recuperación del método, el cual se indica en porcentaje.

En concreto, se puede decir que el porcentaje de recuperación (recobro) es la fracción de analito adicionada a una muestra de prueba (fortificada o con "spike") previa al análisis (Scheilla *et al.*, 2006). El porcentaje de recuperación (% R) se calculó utilizando la siguiente ecuación;

$$\%R = ((CF-CU)/CA) * 100$$

En donde:

CF = Concentración del analito medida en la muestra fortificada

CU = Concentración de analito medida en la muestra sin fortificar

CA = Concentración de analito adicionada.

2. Precisión y exactitud

Se procedió a tomar una muestra del estándar de P con una concentración de 1.43 μg . El procedimiento consistió en tomar de la solución experimental, diez alícuotas de 57.2 μl utilizando dos jeringas Hamilton, una de 50 μl con graduación de 10 μl y para completar el volumen fraccionado, otra de 5 μl con graduación de 0.1 μl . Los volúmenes se vertieron en tubos de ensaye previamente marcados del uno al diez. Las muestras se sometieron al método descrito para la cuantificación de P, y posteriormente se leyeron sus absorbancias y sus concentraciones se obtuvieron por interpolación en una recta de calibrado preparada paralelamente durante el experimento. A las concentraciones obtenidas se les calculó la precisión y la exactitud del método. Para determinar la precisión se calculó el valor medio de las concentraciones obtenidas a partir de las absorbancias estimándose el CV.

Para la exactitud se determinó la desviación estándar, el error absoluto y el error relativo porcentual, mediante el uso de las formulas siguientes:

$$CV = (\sigma/\text{media}) * 100\%$$

Donde σ es la desviación estándar.

$$\sigma = (\text{Varianza})^{1/2}$$

Error absoluto.

$$Ea = |Xi - x|$$

Donde Xi es el valor obtenido en las mediciones.

X es el valor verdadero

Error relativo porcentual.

$$Er\% = (Ea/x) * 100$$

Donde x es el valor verdadero.

3. Sensibilidad

Tomando en consideración que se puede utilizar los valores ya sea de la pendiente de la recta de calibrado (m) o de la precisión (Harris, 1992), en este trabajo se optó por realizar los cálculos correspondiente con el valor de m . Para lograrlo se realizó el siguiente procedimiento. Partiendo de la solución estándar de P se preparó una serie de soluciones de concentración conocida con 7 tubos de ensaye, una cada día durante tres días; se midieron sus absorbancias y se promediaron los valores obtenidos. En total se realizaron 21 lecturas a partir de las cuales se obtuvo la recta de calibrado. Para el cálculo de la sensibilidad, los datos de la recta de calibrado se sustituyeron en la ecuación; $S = mc + S_{bl}$, en donde S = absorbancia, c = concentración del analito, S_{bl} = señal instrumental del blanco, o bien la intersección en el eje de las ordenadas.

4. Linealidad

Se sabe que la ley de Beer describe en forma precisa el comportamiento de absorción de un medio que contiene concentraciones de analito relativamente bajas, como es el caso de trabajo que nos ocupa. En este sentido, la propia ley limita el método. A concentraciones altas (generalmente >0.01 M) la distancia media entre las moléculas responsables de la absorción disminuye hasta el punto en que cada molécula altera la distribución de carga de las moléculas vecinas (Silverstein *et al.*, 1991; Skoog *et al.*, 2001).

Dicha interacción a su vez puede alterar la capacidad de las moléculas para absorber la radiación de una determinada λ . Como la magnitud de la interacción depende de la concentración y de la longitud de paso óptico, la aparición de este fenómeno da lugar a desviaciones de la linealidad entre la absorbancia y la concentración. Efecto

similar se puede encontrar en medios que contienen concentraciones del analito muy bajas pero concentraciones de otras especies en disolución elevadas.

En este trabajo se determinó considerar como referencia y punto inferior de partida una absorbancia de 0.08 (Villegas *et al.*, 2006), que corresponde a una concentración de $P \approx 0.625$ μ g de las soluciones estándar, y como valores máximos de absorbancia (dentro de la propia linealidad del método) un absorbancia de 0.8 para concentraciones de analito equivalentes a 6.25 μ g.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El promedio de las lecturas de los siete estándares de P empleados se presenta en el cuadro 1, en donde se observa consistencia en los resultados, debido a la poca dispersión observada entre las absorbancias. En el cuadro 2 se presentan los coeficientes de correlación lineal de los mismos resultados agrupados por día, todos arriba de 0.99.

1. Porcentaje de recuperación

La aplicación de la ecuación $\%R = ((CF-CU)/CA) * 100$ dio como resultado valores de porcentaje de recobro cercanos o mayores al 90% (cuadro 3). Estos porcentajes de recuperación se encuentran dentro de los límites establecidos por la A.O.A.C. (2005) para la validación o prevalidación de métodos analíticos de análisis espectrofotométricos.

Normalmente el $\% R$ se utiliza para evaluar la recuperación del analito presente o agregado a una muestra como control de calidad, evaluando la eficiencia de extracción, proceso de preparación o interferencias que pueden existir al aplicar el método de ensayo.

2. Precisión y exactitud

En el cuadro 4 se presentan los valores de absorbancia y las concentraciones obtenidas de 10 muestras de una solución estándar.

Cuadro 1. Relación de cantidad de fósforo y absorbancias obtenidas con soluciones estándar de concentración conocida.

Muestra	Vol μl .	[P] μg	Media de absorbancias (Día 1) (n=3)	Media de absorbancias (Día 2) (n=3)	Media de absorbancias (Día 3) (n=3)	Media General	Desviación Estándar
1	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
2	25	0.625	0.080	0.083	0.081	0.0813	0.001
3	50	1.250	0.171	0.160	0.156	0.1726	0.003
4	100	2.500	0.342	0.336	0.352	0.3433	0.007
5	150	3.750	0.507	0.501	0.481	0.4963	0.011
6	200	5.000	0.658	0.643	0.660	0.6536	0.008
7	250	6.250	0.890	0.795	0.851	0.8153	0.025
8	300	7.500	0.980	0.989	0.961	0.9623	0.029

Cuadro 2. Valores comparativos de los coeficientes de correlación lineal obtenidos en las relaciones Abs/mg P de cada serie estándar de P

	Día 1 (n=21)	Día 2 (n=21)	Día 3 (n=21)	Media
b[0]	7.0606×10^{-3}	5.0868×10^{-3}	0.01313	8.394×10^{-3}
b[1]	0.12954	0.12905	0.1271	0.1285
r^2	0.9991	0.9992	0.9992	0.9991

Cuadro 3. Resultado de las concentraciones obtenidas con las muestras R21M3H, R4M2H y R31M1H preparadas por duplicado utilizadas para la prueba del porcentaje de recuperación.

Volumen de muestra = 75 μl		Muestra + añadido (100 μl de solución estándar de concentración 0.025 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ = 2.5 μg de P)		%R
Muestras/Abs $\lambda_{650 \text{ nm}}$ media	μgP	Abs $\lambda_{650 \text{ nm}}$ media	Concentración analítica de P (μg)	
R21M3H 0.234	1.75	0.527	4.013	90.52
R4M2H 0.250	1.975	0.532	4.052	83.08
R31M1H 0.263	1.875	0.562	4.283	96.32
Conc. Promedio	1.867	0.540	4.116	89.97

Cuadro 4. Resultados obtenidos en 10 mediciones de una muestra de concentración conocida para la determinación de la precisión y exactitud.

57.2 ml de sol. estándar [$\approx 1.43 \mu\text{g}$]		
Muestra	Abs	$\mu\text{g P}$
1	0.184	1.36
2	0.194	1.44
3	0.197	1.46
4	0.197	1.46
5	0.174	1.28
6	0.178	1.31
7	0.166	1.22
8	0.198	1.47
9	0.194	1.44
10	0.183	1.35
Media	0.1865	1.379
Dev. Estándar	0.0112	0.088

dar. Estos resultados muestran poca dispersión entre los valores de absorbancias y concentraciones. La desviación estándar resultante fue de 0.088 y el valor medio de las concentraciones de 1.379, cuyo cociente dio como resultado 6.3% de precisión del método y una exactitud del 3.56%.

El criterio de aceptación en ambos casos toma en consideración la concentración del analito (Villegas *et al.*, 2006), por lo que estos porcentajes dan cuenta de muestras conteniendo P entre concentraciones relativas a trazas y ultratrazas, siendo la precisión y exactitud datos consistentes para considerar adecuado el método empleado (Villegas *et al.*, 2006).

3. Sensibilidad

La sensibilidad aunque es independiente de la concentración, se obtiene como el cociente de dividir la señal medida (absorbancia) entre su valor ($m = \frac{S}{C}$), y por lo que se puede observar es simplemente igual a la pendiente promedio.

En el cuadro 5 se correlacionan los datos mencionados y se muestra el valor de la m (sensibilidad) = $0.132 \mu\text{g}^{-1}$

Cuadro 5. Valores obtenidos para la sensibilidad de calibración del método propuesto ($n=3$).

Concentración del analito (C) [P] μg	Absorbancia (S) $\lambda_{650 \text{ nm}}$	Sensibilidad (m) μg^{-1}
0	0	
0.625	0.080	0.128
1.250	0.171	0.137
2.500	0.342	0.137
3.750	0.507	0.135
5.000	0.658	0.132
6.250	0.800	0.128
7.500	0.980	0.131
Media		0.132

4. Linealidad

En la figura 2 se muestra la recta de calibrado que se obtuvo graficando los promedios de las absorbancias de los siete estándares de P, así como el blanco de agua. En esta figura multi-componente se aprecia claramente que las lecturas de absorbancia tuvieron una tendencia lineal, sin presentar dispersión significativa.

La porción de la recta de calibrado que asegura una correlación lineal entre c y S se encuentra entre valores de absorbancia 0.2 (mínimo) y 0.8 (máximo) (figura 2). Este intervalo asegura la reproducibilidad de las lecturas dependientes de la concentración, presenta muy poca dispersión y un valor de $r^2 \geq 0.9991$.

CONCLUSIONES

Es factible determinar fósforo en muestras de hueso de un tamaño igual o menor a 0.5 g mediante el empleo de la técnica propuesta por la A.O.A.C. (2005) adaptada a dichas condiciones. Esta técnica modificada demostró ser confiable al considerar sus

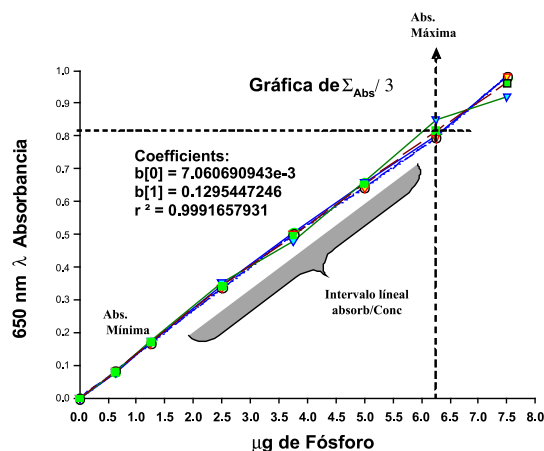


Figura 2. Cantidades máxima y mínima de fósforo en un intervalo de absorbancias consistentes con la ley de Lambert y Beer. El intervalo lineal del método puede establecerse entre los valores 0.171 a 0.815 de absorbancia.

parámetros analíticos. Las modificaciones al método de determinación de P aquí propuestas permite analizar muestras de un tamaño $\leq 0.5\text{g}$ y de esta forma se logrará reducir el daño quirúrgico a los pequeños rumiantes sometidos a biopsia de costilla, facilitando la toma de muestra.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue parcialmente financiado por el proyecto del Fondo Sectorial de Investigación en Materias Agrícola, Pecuaria, Acuicultura, Agrobiotecnología y Recursos Filogenéticos CONACyT-SAGARPA clave 12284 titulado "Caracterización mineral en el sistema suelo, planta, animal en la península de Yucatán y su aplicación en la nutrición animal".

REFERENCIAS

- A.O.A.C. (2005). Official methods of analysis. Arlington VA, USA. Association of Official Analytical Chemists. Official Method 931-01. Phosphorus in plants. Cap 3, pp. 21.
- C.I.C.U.A.E. (2009). Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales Experimentales. Lineamientos generales en la revisión de protocolos de experimentación en donde se utilizan animales. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. U.N.A.M. México, D.F. pp. 1-6.
- Coy, G.A. (1999). Estandarización de métodos analíticos. Ed. Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales. Bogotá, Col.
- Fick, K.R., Mc Dowell, L.R., Miles, P.H., Wilkinson, M.S., Kunk, J.D., Conrad, J.H. (1979). Métodos de análisis de minerales para tejidos de plantas y animales. Gainesville. Departamento de Ciencia Animal. Universidad de Florida. Gainesville, Fla. U.S.A. pp. (201)1-(201)12.
- Harris, D.C. (1992). Análisis Químico Cuantitativo. D. Iberoamericana, México pp 495-531.
- Little, D.A. (1972). Bone biopsy in cattle and sheep for studies of phosphorus status. *Australian Veterinary Journal* 48(12):668-670.
- Scheilla, V.C., Pinto, C.T., Junqueira, R.G. (2006). In-house method validation: Application in arsenic analysis. *Journal of Food Composition and Analysis* 20(3-4):241-247.

- Silverstein, R.M., Bassler, G.C., Morrill, T.C. (1991). Spectrometric Identification of Organic Compounds. Fifth Edition. John Wiley and Sons, Inc. New York pp. 289-314.
- Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, T.A. (2001). Principios de Análisis Instrumental 5ª. Edit. McGraw Hill. España pp 322-340.
- Turriza, Ch.J.L., Vivas, M.E., Heredia, A.M., Rosado, R.J.G., Castellanos, R.A.F., Cabrera, T.E.J. (2007). Concentración de cuatro minerales en tejido óseo de ovinos en pastoreo en el estado de Yucatán [Resumen]. XLIII Reunión nacional de investigación pecuaria. Culiacán, Sin. p. 246.
- Underwood, E.J., Suttle, N.F. (2001). Mineral nutrition of livestock. Third Edition. CABI Publishing. London pp 121-133.
- Villegas, C.W., Acereto, E.P., Vargas, Q.M. (2006). Análisis ultravioleta visible. La teoría y la práctica en el ejercicio profesional. Ed. Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida Yucatán pp 1-20.