

86  
24

**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA  
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**"ESPECTROSCOPIA DE ABSORCION ATOMICA  
APLICADA A LA DETERMINACION DE ALGUNOS INORGANICOS  
EN LECHE"**

TRABAJO MONOGRAFICO DE ACTUALIZACION

Que para obtener el titulo de

**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

Presenta

**MARIA PATRICIA GABRIELA MENDEZ GAONA**

MEXICO, D. F.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

1991



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# INDICE

	página
<b>INTRODUCCION</b>	<b>1</b>
<b>CAPITULO I</b>	
<b>GENERALIDADES</b>	<b>3</b>
<b>CAPITULO II</b>	
<b>METODOS</b>	<b>32</b>
<b>CAPITULO III</b>	
<b>RECOMENDACIONES</b>	<b>54</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>63</b>

## INTRODUCCION

La leche contiene aproximadamente 1.1% de sales de gran importancia para la nutrición humana.

El estudio de los elementos minerales de la leche se aborda en la literatura científica con dos finalidades claramente diferentes:

- Conocimiento bromatológico de su composición mineral.
- Aplicación de diferentes técnicas físico-químicas al estudio de esa misma composición, con objeto de seleccionar métodos analíticos adecuados.

En general, los elementos más estudiados desde el punto de vista bromatológico son los macroelementos calcio y magnesio, que se encuentran en la leche en fase coloidal, destacando también la riqueza en magnesio de las membranas de los glóbulos de grasa. El sodio y el potasio, siempre en la fase acuosa, se presentan en forma de sales solubles y complejas.

Los microelementos hierro, cobre y zinc, pueden estar absorbidos en la superficie de los glóbulos de grasa, relacionándose directamente con la riqueza en grasa de la leche. El estudio del hierro y del cobre es muy importante por su influencia en los procesos industriales, siendo causantes de la aparición de sabores extraños.

El estudio de la alimentación es un tema de gran actualidad, que ha introducido al químico en problemas de interés público, haciéndole participar en el desarrollo internacional de la nutrición, el medio ambiente y la calidad adecuada.

Varios organismos internacionales, entre ellos la FAO y la OMS, han demostrado su interés por la alimentación infantil, dando una serie de recomendaciones sobre la composición adecuada de las leches destinadas a los niños. Las concentraciones de elementos alcalinos y alcalinotérreos presentes en fórmulas lácteas en polvo para infantes, deben mantenerse dentro de límites estrechos para que se puedan satisfacer sus requerimientos nutricionales y evitar así alteraciones en la salud. Es por lo anterior que existen valores recomendados, tanto mínimos como máximos, para calcio, magnesio, sodio y potasio, especialmente para leches en polvo. Estos valores son usados para establecer límites legales en cuanto a la concentración de dichos elementos.

Los procedimientos analíticos oficiales, para la determinación de elementos traza, estaban basados antiguamente en determinaciones espectrofotométricas convencionales. En los últimos años,

con el rápido desarrollo de la espectrofotometría de absorción atómica, se ha producido un declinar en el uso de estas técnicas. La determinación de elementos traza esenciales y tóxicos en leche mediante absorción atómica, es ahora de amplia aplicación en los laboratorios de control, debido a la confiabilidad de los resultados. Este método predomina también en los trabajos de investigación e incluso ha sido recomendado como método de referencia.

En el presente trabajo se hace una revisión bibliográfica extensa sobre la determinación de elementos esenciales en leche, así como la de elementos traza tóxicos debidos a la contaminación, mediante técnicas de espectrofotometría de absorción atómica, tomando en cuenta todas sus variantes.

## CAPITULO I

# **GENERALIDADES**

La leche es un líquido segregado por las glándulas mamarias de las hembras de los mamíferos, tras el nacimiento de la cría.

Desde el punto de vista legal, la leche es el producto de ordeño higiénico efectuado profunda y completamente en una o más hembras de ganado lechero bien alimentado y en buen estado de salud.

## COMPOSICION DE LA LECHE

Es corriente reducir la leche a sus cuatro componentes más importantes: lactosa, grasas, proteínas y sales y despreñar las sustancias presentes en pequeñas cantidades (86).

Esta simplificación no puede aceptarse más que para el cálculo del valor energético de la leche. Desde cualquier otro punto de vista no pueden despreñarse los pequeños componentes que en buen número se encuentran en la leche, ya que sólo pueden considerarse como secundarios en lo que se refiere a su proporción ínfima; en determinadas circunstancias pueden tener una importancia preponderante. Tales son las representantes de la gran familia de la bioquímica:

- Fosfolípidos (lecitina).
- Carotenoides, esteroides, tocoferoles.
- Flavinas y vitaminas hidrosolubles.
- Enzimas.
- Nucleótidos.

En el cuadro núm. 1 se da la composición media de la leche de vaca en sus principales elementos.

## CONTENIDO MINERAL DE LAS LECHE

Las materias minerales se encuentran en todas las leches en una proporción que varía de 3 a 10g por litro, pero ciertas sales son de importancia considerable, sobre todo aquéllas que constituyen la originalidad de la leche, por su naturaleza o por su concentración. Más que como grupo aparte de componentes de la leche, se deben considerar como elementos de un conjunto, ya que un estudio separado como sales tiene poco interés.

Efectivamente, una relación de las sales que pueden existir en la leche tiene en realidad poco significado. Las determinaciones químicas dan valores en aniones o cationes, o bien en metaloides y metales; por una parte, se valoran los cloruros, fosfatos y citratos y por otra, el calcio, sodio, potasio, etc.

## CUADRO NUM. I

**COMPOSICION MEDIA DE LA LECHE DE VACA  
EN SUS PRINCIPALES ELEMENTOS**

ELEMENTOS	Composición gramos por litro	
Agua	905	
Glúcidos: lactosa	49	
Lípidos	35	
Materia grasa propiamente dicha		34
Lecitina (fosfolípidos)		0.5
Parte insaponificable (esteroles, carotenos, tocoferoles)		0.5
Prótidos	34	
Caseína		27
Prótidos "solubles" (globulinas, albúminas)		5.5
Sustancias nitrogenadas no protéicas		1.5
Sales	9	
del ácido cítrico (en ácido)		2
del ácido fosfórico (P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )		2.6
del ácido clorhídrico (NaCl)		1.7
Componentes diversos (vitaminas, enzimas, gases disueltos)		trazas
Extracto seco (total)	127	
Extracto seco desengrasado		92

En el cuadro núm. II se da la composición mineral media de leches en diferentes especies de mamíferos.

Como puede observarse en el cuadro, las leches de vaca y de cabra tienen una composición mineral parecida; el potasio es el elemento dominante, más que el calcio y el fósforo. Por el contrario estos dos últimos elementos son los más abundantes en las leches de oveja y cerda, que presentan similitudes de composición. La leche humana está poco mineralizada en relación con la leche de vaca. Los contenidos en fósforo y calcio de la leche de una especie animal determinada son tanto más elevados cuanto más rápida es la velocidad de crecimiento del animal joven.

El contenido mineral de la leche es el menos variable de todos sus constituyentes. Los minerales de la leche están compuestos de sales ácidas y alcalinas de potasio, calcio y sodio, parcialmente en solución, parcialmente en suspensión. A causa del hecho de que los elementos metálicos se encuentran en mayor cantidad que los no metálicos, el contenido mineral es siempre de carácter alcalino.

El contenido global de materias minerales de la leche se determina, habitualmente, por incineración; mediante este procedimiento, en la leche de vaca pueden encontrarse de 7 a 8,5 g de cenizas por litro. Estas cenizas no representan el total de las sales de la leche en su estado natural; la proporción de sales es un poco más elevada, de 8 a 10 g por litro en la leche de vaca.

Mientras que la leche tiene una reacción ligeramente ácida, las cenizas son netamente alcalinas; se ha producido, por tanto, una modificación importante en el equilibrio ácido - básico en el curso de la incineración. Estas modificaciones son casi constantes. Además, se producen pérdidas de los elementos más volátiles, que dependen estrechamente de la temperatura alcanzada en el horno.

Pérdidas:

El yodo (indicios) desaparece siempre.

Los cloruros alcalinos permanecen fijos hasta 550° C; por encima de esta temperatura, las pérdidas son sensibles.

Fósforo, hay pérdidas en el rojo vivo.

No deben rebasarse los 550° C en el curso de la calcinación (es decir, antes del rojo sombra).

Modificaciones principales:

Los citratos se destruyen completamente.

## CUADRO NUM. II

COMPOSICION MINERAL MEDIA DE LECHE  
EN DIFERENTES ESPECIES DE MAMIFEROS

ELEMENTO	valor medio 0/100 en varios tipos de leche					En la leche de vaca	
	vacca	cabra	oveja	cerda	humana	Valores Extremos (0/100)	Molaridad media
	Potasio (K <sub>2</sub> O)	1.6 [1.8]	1.6 [2.0]	1.5 [1.8]	1 [1.2]	0.5 [0.7]	1.2 (1.5) - 1.8 (2.2)
Sodio (Na <sub>2</sub> O)	0.5 [0.7]	0.4 [0.54]	0.4 [0.54]	0.35 [0.47]	0.16 [0.2]	0.35(0.47)-1.1(1.5)	0.02
Calcio (CaO)	1.3 [1.8]	1.3 [1.8]	2.3 [3.2]	2.1 [3.0]	0.2-0.4 [0.42]	0.9 (1.3)- 1.6 (2.2)	0.032
Magnesio (MgO)	0.14 [0.2]	0.15 [0.25]		0.2 [0.32]	0.05 [0.08]		0.005
Fósforo (P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )	1 [2.3]	1 [2.3]	1.6 [3.7]	1.5 [3.6]	0.15 [0.4]	0.75(1.7)- 1.25(2.9)	0.032
Cloro (NaCl)	1.1 [1.8]	1.5 [2.5]	0.7 [1.15]		0.5 [0.8]	0.7(1.1) - 1.65 (2.7)	0.03
Azufre	0.3	0.2			0.15		
CO <sub>2</sub> de los carbonatos	0.2						
Acido cítrico	1.8	1.5			0.8		

Se forman carbonatos por acción del  $\text{CO}_2$  (procedente de la combustión de las materias orgánicas) sobre las bases.

Se forman también fosfatos y sulfatos, con el fósforo y azufre incluidos en las moléculas protéicas, y que anteriormente no se encontraban, por lo tanto, en estado salino.

La determinación de las cenizas y su alcalinidad es un medio para reconocer una eventual neutralización de la leche por un agente alcalino (principalmente en el caso de las leches en polvo).

Los cloruros constituyen la parte más importante de las sales solubles ionizadas. Expresadas en cloruro sódico, forman el 1.8% de la leche.

Después de los cloruros se encuentran los fosfatos solubles, aunque solamente 1/3 del fósforo se halla en esta forma; en fosfato disódico representa 1.5% de la leche.

La mayor parte del azufre, entra en la composición de las moléculas protéicas; sólo una pequeña parte está en forma de sulfatos.

Los bromuros, yoduros y fluoruros se encuentran en indicios.

Es probable que todo el sodio y el potasio se encuentren en solución iónica, pues no se ha demostrado su presencia en la fase coloidal.

El calcio y el fósforo forman lo esencial de la parte "minerocoloidal", que es una de las más características de la leche; el magnesio contribuye en pequeña proporción (en moléculas, hay 6 veces menos Mg que Ca). Asociado a estos elementos se encuentra un ácido orgánico, el cítrico. Dos tercios del fósforo y el calcio escapan a la solución y forman parte, principalmente, del complejo fosfocaseinato de calcio.

En la leche se encuentran también pequeñas cantidades de combinaciones orgánico -fosforadas, como son las lecitinas, ésteres hexosafosfóricos, nucleótidos y un complejo vitamínico con riboflavina.

La modificación del equilibrio natural entre las 2 formas

(1) $\text{Ca}^{++}$ iónico	Ca complejo (2)
(sales solubles	(sales no disociadas,
disociadas)	Ca coloidal)

tiene un papel determinante en la estabilidad de la leche.

La leche contiene otros minerales en pequeñas cantidades. El zinc es el más abundante de los metales en estado de indicios (3 a 6 mg/l de leche).

Los metales pesados, sobre todo el cobre, tienen una acción catalítica. El hierro es menos activo que el cobre; el estaño y el aluminio son prácticamente inactivos.

Normalmente, la leche no contiene más que escasos indicios de cobre (0.12 mg/l), cuando la cantidad se excede (1.5 mg/l) existe peligro de oxidación rápida.

Las variaciones accidentales del contenido de cobre y hierro tiene consecuencias en lo que se refiere a la oxidación de la grasa de la leche, dado que los metales pesados catalizan esta reacción.

## PROPIEDADES FISICAS Y FISICOQUIMICAS

Algunas propiedades físicas dependen del total de los componentes: densidad, tensión superficial y calor específico, color, olor, sabor; otras dependen de las sustancias disueltas: índice de refracción y punto de congelación; hay otras que sólo dependen de los iones: PH y conductibilidad; o de las sustancias reductoras: potencial Redox.

Los valores relativos a la solución verdadera pueden considerarse, con cierta aproximación, como constantes. Los otros valores con más o menos variables, ya que dependen de las proporciones relativas de sustancias que tienen influencias diversas sobre las propiedades consideradas (87).

El agua es un componente de la leche que tiene gran importancia; a pesar de su extrema simplicidad, plantea problemas desde el punto de vista físico.

**Color:** la coloración de una leche fresca es blanca, medio aporcelanada; cuando es rica en grasa es ligeramente crema.

**Olor:** La leche fresca no tiene un olor característico, pero debido a la presencia de grasas, la leche conserva con mucha facilidad los olores del ambiente o de los recipientes que la guardan.

**Sabor:** Entre los principales componentes de la leche, la lactosa y los cloruros son los que tienen los sabores más característicos: dulce y salado. Pero no hay que omitir los componentes menores, de sabor fuerte, como la lecitina. Las proteínas son insípidas; sin embargo su papel es importante, ya que forman una masa que atenúa y equilibra los sabores. La leche fresca y limpia tiene un sabor medio dulce y neutro por la lactosa que contiene.

**Densidad:** La densidad de la leche recién ordeñada es inestable y se eleva un poco después, siendo el aumento del orden de 0.001. En las leches individuales los valores medios se encuentran entre 1.030 y 1.033, medida a 15° C, ya que la densidad varía con la temperatura. La densidad de la leche de mezcla es más significativa; se encuentra próxima a 1.032. La densidad de las leches desnatadas se eleva por encima de 1.035.

**Tensión superficial.**- La presencia de sustancias orgánicas en la leche explica el descenso de su tensión superficial en relación con la del agua pura:

	tensión superficial a 15°C
leche entera	47 - 53 dinas/cm
leche desnatada	52 - 57 dinas/cm
agua	76 dinas/cm

**Gravedad específica.**- La gravedad específica de la leche es igual al peso en kilogramos de un litro de leche a temperatura de 15° C; generalmente se expresa en grados de densidad. Fluctúan estos valores de 1.028 a 1.034.

**Viscosidad.**- La leche es mucho más viscosa que el agua, lo cual se debe, sobre todo, a la materia grasa en estado globular y a las macromoléculas proteicas; las sustancias en solución sólo intervienen en una pequeña parte. La viscosidad media a 20°C de la leche entera es de 2.2 centipoises.

**Calor específico.**- Es el número de calorías necesarias para elevar en 1°C la temperatura de la unidad de peso de la leche. Es un valor un poco más bajo que el del agua. Los valores encontrados a diferentes temperaturas son:

	0°C	15°C	40°C	60°C
leche entera	0.92 cal	0.94 cal	0.93 cal	0.92 cal

**pH.**- En general, la leche tiene una reacción iónica cercana a la neutralidad. La leche de vaca tiene una reacción débilmente ácida, con un pH comprendido entre 6.6 y 6.8, como consecuencia de la presencia de caseína y de los aniones fosfórico y cítrico.

El pH no es un valor constante. La variación de este parámetro, depende en gran parte del estado sanitario de la glándula mamaria, de la cantidad de CO<sub>2</sub> disuelto en la leche, del desarrollo de microorganismos que, al desdoblarse la lactosa, promueven la producción de ácido láctico, etc.

**Acidez.**- La acidez presentada por la leche es resultado de cuatro fuentes:

- A.- Acidez natural
  - Acidez debida a la caseína
  - Acidez debida a las sustancias minerales y a los indicios de ácidos orgánicos.
  - Reacciones secundarias debidas a los fosfatos.
- B.- Acidez desarrollada
  - Debida al ácido láctico y a otros ácidos procedentes de la degradación microbiana de la lactosa.

Generalmente la leche fresca posee una acidez de 0.15 a 0.16%

**Punto de congelación.-** La leche se congela por debajo de 0°C, ya que las sustancias disueltas bajan el punto de congelación de los disolventes puros. Una de las características más constantes de la leche es el punto de congelación, que en general es de -0.539° C como valor promedio (-0.55° para la leche de vaca), teniendo un rango que va de -0.513 a -0.561°C.

**Punto de ebullición.-** La leche hierve por encima de los 100°C; entre 100.17°C y 100.15°C

**Conductividad eléctrica.-** La presencia de electrolitos minerales en la leche (cloruros, fosfatos y citratos), principalmente, y de iones coloidales, secundariamente, disminuyen la resistencia al paso de la corriente. La conductibilidad de la leche varía con la temperatura; normalmente se la mide a 25°C. Sus valores medios se sitúan entre  $40 \times 10^{-4}$  y  $50 \times 10^{-4}$  mhos.

**Potencial de óxido - reducción.-** La leche fresca tiene un potencial "redox" (E) positivo comprendido entre + 0.20 y + 0.30 volt.

**Transmisión de la luz.-** La leche no presenta una absorción característica en la parte del espectro que corresponde a la luz visible, es decir para longitudes de onda entre 400 y 700 milimicras; es un líquido no coloreado, cuyos pigmentos se encuentran en muy baja concentración para que puedan intervenir. Por el contrario, la leche contiene sustancias orgánicas que son la causa de bandas de absorción características por debajo de 300 milimicras (zona de los ultravioleta) y por encima de las 750 milimicras (zona de infrarrojo).

**Turbidez.-** La leche es un líquido opalescente que parece blanco si el espesor es suficiente. Este aspecto característico resulta principalmente de la dispersión de la luz por las micelas de fosfocaseinato de calcio. Los glóbulos grasos dispersan igualmente la luz, pero intervienen poco en la opalescencia blanca, ya que su dimensión es muy superior a la longitud de onda media de la luz solar.

**Refracción.-** El valor del índice de refracción de la leche fluctúa entre 1.3440 y 1.3485, y es el resultado de la combinación de los índices de refracción de todos los componentes de la leche.

**Agua y sólidos de la leche.-** La leche está formada de aproximadamente 87.5% de agua y 12.5% de sólidos o materia seca.

El agua es la fase continua de la leche y es el medio de soporte para sus componentes sólidos y gaseosos. La materia seca está formada por los compuestos sólidos de la leche.

## LA LECHE COMO ALIMENTO

La leche es el alimento natural más completo que existe. Su función natural es la de ser alimento exclusivo de los mamíferos jóvenes durante el período crítico de su existencia, tras el nacimiento.

La complejidad de la composición de la leche responde a esta necesidad. La leche y los productos lácteos tienen un papel primordial en la alimentación humana; la leche de vaca es un alimento de gran valor para el hombre, al que suministra más sustancias alimenticias esenciales que cualquier otro alimento natural; sin embargo, existen factores limitantes cuando se trata de cubrir las necesidades energéticas en las etapas de adolescente y adulto. Un litro de leche de vaca aporta 650 calorías y cubre más de la mitad de las necesidades energéticas del niño de 5 años, y más de un cuarto en el caso del adulto.

La importancia alimenticia de la leche reside principalmente en el aporte que hace al organismo de proteínas, calcio y vitaminas A, B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>.

La leche contiene todos los aminoácidos esenciales para el hombre adulto; contiene igualmente histidina, que parece ser esencial para el crecimiento del niño.

Los minerales de la leche son sumamente esenciales como alimento para los jóvenes, ya que ayudan a construir los huesos y a promover el desarrollo adecuado de los dientes.

Los principales constituyentes minerales de la leche son:

Ca, Mg, P, K, Na, S, Fe, I<sub>2</sub> (trazas).

Aún cuando el contenido mineral medio de la leche es de solamente 0.7%, la presencia de este constituyente proporciona una de las principales razones por las cuales la leche es un alimento tan importante, especialmente para los niños.

Las leches de diferentes especies animales contienen numerosos aniones y cationes, además de elementos ligados a la caseína. El fósforo y el calcio se encuentran entre los más abundantes; son también los más útiles para la alimentación, ya que intervienen principalmente en la osificación. La leche de vaca y los productos lácteos son las principales fuentes de calcio y de fósforo en los hombres; especialmente es un buen corrector de las raciones pobres en calcio.

Además, los elementos minerales de la leche se absorben y retienen mejor que los de otros alimentos. En el niño alimentado con leche de vaca, hay un exceso de aporte de calcio y fósforo; la parte sobrante se excreta. La relación Ca/P es de 1/3 en la leche de vaca.

Por otro lado, la leche contiene muy poco magnesio, hierro y yodo, para asegurar una cobertura perfecta de todas las necesidades minerales.

En el cuadro núm. III se muestran las necesidades alimenticias del hombre y su satisfacción por la leche y los productos lácteos:

## DIFERENTES CLASES DE LECHES

Las diferentes especies de mamíferos producen leches que, de una forma general, tiene una composición semejante pero pueden presentar diferencias importantes en su composición centesimal y tener, como consecuencia, propiedades muy diferentes.

La leche de los rumiantes comunes es la única que ha sido analizada con la frecuencia necesaria para poder establecer una composición media fidedigna; en estas especies, la selección tiende a uniformar la composición.

Para la leche de otras especies, no se pueden dar más que cifras aproximadas.

En general, las leches son tanto más ricas, principalmente en materias nitrogenadas y en sales, cuanto menos completo sea el desarrollo in-útero y el crecimiento sea más rápido. El contenido en lactosa sigue un orden inverso, pero paralelo, al desarrollo del cerebro; los tejidos nerviosos son ricos en galactósidos.

La materia grasa es un alimento energético: se encuentra en proporción elevada en la leche de los mamíferos de las regiones frías y de los océanos (relación climática).

La leche humana es la más rica en lactosa, pero es relativamente pobre en elementos nutritivos; lo mismo ocurre con la leche de los équidos.

Las leches de vaca y de cabra son las mejor equilibradas desde el punto de vista de la distribución de los tres mayores componentes: contienen alrededor del 4% de cada uno de ellos: proteínas, grasa y lactosa.

Dentro de una misma especie, las diferentes razas producen leches cuya composición varía, aunque dentro de límites reducidos, conservando constantes ciertos caracteres. En términos generales,

**CUADRO NUM. III**  
**NECESIDADES ALIMENTICIAS DEL HOMBRE**  
**Y SU SATISFACCION POR LA LECHE Y LOS PRODUCTOS LACTEOS**

ELEMENTO	Necesidades (*)	1 litro de leche aporta (**)	Necesidades (***)	1 litro de leche aporta (**)	100g de queso aportan (****)
Energía	1500 cal	40%	2800 cal	22%	13%
Proteínas	50 g	70%	70 g	45%	38%
Calcio	0.8 g	más de 100	0.8 g	más de 100	más de 100
Fósforo	0.8 g	más de 100	1.0 g	100%	60%
Hierro	10 mg	10%	15 mg	6%	5%
Vitamina A	5000 U. I.	40%	5000 U. I.	40%	30%
Vitamina D	450 U. I.	5%			
Vitamina B1	0.7 mg	60%	1.5 mg	30%	1.50%
Vitamina B2	1.3 mg	más de 100	2.5 mg	60%	8%
Vitamina PP	9 mg	12%	15 mg	8%	
Vitamina C	50 mg	40%	75 mg	25%	

(\*) Necesidades de un niño de cinco años en buen estado de salud.  
(\*\*) Leche de buena calidad.  
(\*\*\*) Necesidades del adulto en buen estado de salud con un trabajo moderado.  
(\*\*\*\*) Queso de leche entera, de pasta dura.

son más bien la cantidad de leche producida y su riqueza global, las que varían de una raza a otra y de una manera inversamente proporcional.

En el cuadro núm. IV se proporcionan datos sobre las diferentes clases de leches.

## **METABOLISMO DE LOS ELEMENTOS MINERALES**

Los organismos necesitan ingerir agua y ciertas sales minerales en cantidades determinadas, para que en la época del crecimiento éste sea normal y para que en cualquier edad su funcionamiento fisiológico no se altere.

En el crecimiento, los balances que se han podido establecer indican fijación de elementos minerales por el organismo; en el adulto hay un estado de equilibrio.

Aunque en el equilibrio, la excreción es igual a la ingestión, no debe pensarse que las sales excretadas son las mismas que fueron ingeridas. Las excretadas representan un tanto por ciento de las que están presentes en el organismo, hayan sido recientemente ingeridas o no.

El empleo de elementos radiactivos ha permitido seguir el metabolismo de átomos individuales, determinar los desplazamientos que efectúan en el organismo los elementos acabados de absorber y establecer el tiempo que una cantidad determinada tarda en excretarse.

Los elementos minerales llenan muchas funciones, entre las cuales pueden considerarse de mayor importancia:

- 1.- La mineralización de los tejidos óseo y cartilaginoso.
- 2.- Su intervención en los procesos de regulación osmótica.
- 3.- Su intervención en la regulación del equilibrio ácido - base.
- 4.- Su intervención en el equilibrio iónico, que es necesario para el normal funcionamiento del organismo.
- 5.- La formación de sustancias de gran importancia biológica (hemoglobina, enzimas, vitaminas).
- 6.- Su intervención en la activación y regulación de procesos enzimáticas.

**CUADRO NUM. IV**  
**DIFERENTES CLASES DE LECHEs**

CLASES DE LECHES	Composición por 100 g						
	Extracto seco (total) [1]	M. G. [2]	Lactosa [3]	Sales [4]	Materias nitrogenadas		
					Totales [5]	Caséina % [6]	N.N.P. (*) % [7]
Leche humana	11.7	3.5	6.5	0.25	1.4	28	17
Equidos							
yegua	10	1.5	5.9	0.4	2.2	50	
burra	10	1.5	6.2	0.5	1.8	45	
Rumiantes							
vaca	12.5	3.5	4.7	0.8	3.5	78	5
cabra	13.8	4.3	4.7	0.8	4	75	7
oveja	19.1	7.5	4.5	1.1	6	77	5
búfala	17.8	7.5	4.7	0.8	4.8	80	
reno	31.9	17.5	2.5	1.5	10.4	80	
Suidos							
cerda	18.3	6	5.4	0.9	6	50	8
Carnívoros y Roedores							
gata	20	5	5	1	9	33	
perra	25.2	10	3	1.2	11	50	
coneja	29.3	12	1.8	2	13.5	70	
Cetáceos							
marsopa	59.9	46	1.3	0.6	12		
ballena	46.3	35	0.8	0.5	10		

(\*) N.N.P.: Materias Nitrogenadas No protéicas.

Los organismos vivos contienen por lo menos 29 elementos. Entre ellos, 13 son no metales: C, H, O, N, S, P, Cl, F, Br, I, B, Si, As. Los metales son: Ca, Mg, K, Na, Fe, Cu, Zn, Ni, Co, Mn, Al, Pb, Sn, Mo, V y Ti.

Entre los elementos necesarios en cantidades mayores que 1 mg. figuran Ca, Mg, Na, K, P, S, Cl y Fe; éstos se llaman macroelementos. Los otros están presentes en indicios,  $10^6$  a  $10^{12}$  g por gramo de tejido húmedo, y reciben el nombre de microelementos u oligoelementos (74).

En el cuadro núm. V podemos apreciar la distribución de estos elementos en el cuerpo humano.

## CLASIFICACION DE LOS ELEMENTOS EN EL CUERPO HUMANO

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, los elementos traza en la nutrición humana se clasifican como esenciales, no esenciales y tóxicos; aunque esta clasificación tan categórica puede resultar imprecisa y engañosa (14).

No obstante, todos los elementos esenciales llegan a ser tóxicos si su ingestión es suficientemente alta. El ejemplo obvio de esto es el rol del flúor y el selenio en la dieta; pero más recientemente se ha inferido que puede haber roles fisiológicos para los muy tóxicos elementos cadmio, arsénico y plomo.

Aunque algunos elementos, por ejemplo, B, Cu, F, Mn, Mo, Ni, Se y Zn ejercen funciones esenciales, muestran por encima de ciertos niveles umbrales acciones tóxicas sobre los organismos vivos. La mayor parte de ellas en exceso suficiente pueden ejercer deterioros sobre la salud. La distinción entre sustancia favorable y veneno, por tanto es una cuestión de dosis. Así, por ejemplo, el Cu y el Zn son elementos esenciales a la vida por su papel de coenzimas, y, sin embargo, a concentraciones un poco superiores a sus niveles fisiológicos se conducen como tóxicos, por lo que su presencia en los productos alimenticios debe estar estrictamente reglamentada.

Para algunos elementos las concentraciones encontradas han sido suficientes para que tanto su metabolismo como su interés alimentario hayan podido ser estudiados desde hace bastante tiempo mediante técnicas químicas, pero la mayor parte de ellos se encuentran en cantidades del orden de trazas, cuya determinación plantea serios problemas al analista.

**CUADRO NUM. V**  
**DISTRIBUCION**  
**DE MACROELEMENTOS**  
**EN EL CUERPO HUMANO**

<b>ELEMENTO</b>	<b>PORCENTAJE</b>
Oxígeno	65
Carbono	18
Hidrógeno	10
Nitrógeno	3
Calcio	2
Fósforo	1.1
Potasio	0.35
Azufre	0.25
Sodio	0.15
Cloro	0.15
Magnesio	0.05
Hierro	0.004
Manganeso	0.00013
Cobre	0.00015
Yodo	0.00004

En los últimos años se ha podido apreciar la importancia que tiene el contenido de elementos minerales en las leches, leches matenizadas y productos lácteos, ya que desempeñan un gran papel en el organismo (81).

De entre estos elementos, se han seleccionado para el presente trabajo, aquéllos que son de mayor importancia en la nutrición humana: calcio, cobre, hierro, magnesio, potasio, sodio y zinc.

También se estudian los elementos arsénico, cadmio, mercurio y plomo, por su interés toxicológico (82).

### CALCIO

El calcio es uno de los elementos más abundante en el cuerpo humano. Un hombre de 70 kg de peso contiene 1184 g de calcio.

Los requerimientos diarios de este elemento son:

adultos	0.8 g
mujeres	
embarazadas	2 g
lactantes	2 g
niños	1 - 1.4 g

Un 99% del calcio total en el cuerpo se encuentra en los huesos. Cantidades menores están presentes en los dientes (dentina y esmalte dental).

En la sangre el calcio se encuentra exclusivamente en la porción plasma, en donde existen cantidades hasta de 9 a 11.5 mg X 100 ml. En el plasma se conocen 3 formas de calcio: calcio ionizado; calcio difusible pero no iónico; calcio no difusible, combinado en su mayor parte con albúmina de suero.

La fracción ionizable del calcio total en plasma es la que tiene más importancia fisiológica y la que está en equilibrio con el calcio de diversos tejidos. La fracción ionizable participa en la coagulación de la sangre, la actividad neuromuscular, la contractilidad muscular y la actividad del miocardio.

La absorción de calcio aumenta por la presencia de vitamina D y es inhibida por la presencia de ácido fítico (hexafosfato de inositol), que forma sales insolubles con los iones  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$ .

El mantenimiento en la sangre de un nivel de calcio constante es necesario por su influencia en muchas propiedades celulares importantes. Cuando no se ingiere calcio en la dieta, el elemento es movilizado desde los huesos bajo la influencia de la hormona paratiroidea (89, 90).

El calcio no difusible, en el plasma, está enlazado a proteínas y por ello puede existir en forma soluble a niveles muy superiores a los que serían posibles en ausencia de proteínas, pues de ordinario precipitaría en forma de sales de calcio insoluble. Una disminución de la albúmina en suero, como por ejemplo en la nefrosis, conduce también a una disminución del calcio en plasma.

### COBRE

El cobre es un elemento indispensable para el organismo, aunque las cantidades diarias requeridas son muy pequeñas: entre 1 y 2 mg por día, según la edad.

Las funciones principales del cobre en el cuerpo son: la prevención de anemias; formar parte en la composición de sistemas enzimáticos; ser necesario para la formación de hemoglobina y actuar sobre la absorción y la movilización del hierro en los tejidos.

En las anemias por deficiencias nutritivas, que se producen por falta de hierro en la dieta, la hemoglobina no se forma por la simple incorporación de este elemento, sino que es necesario adicionar cobre, el cual acelera la incorporación de hierro radiactivo a la hemoglobina.

El organismo humano adulto, contiene entre 100 y 150 mg. de cobre, de los cuales 1 mg/l. aproximadamente, se encuentra en el plasma en forma del complejo protéico ceruloplasmina. La sangre completa contiene de 80 a 120 mcg de cobre /100ml, distribuido por igual entre el plasma y los eritrocitos. El resto se acumula principalmente en el hígado y en otros tejidos.

Ciertas enzimas oxidantes, como oxidasa de citocromo, oxidasa de ácido ascórbico, polifenoloxidasas, lactasa y tirosinasa, son complejos cobre - proteína.

Otros compuestos de cobre fueron descubiertos por Keiling y Mann, quienes aislaron un compuesto cobre - proteína de los eritrocitos de mamífero, el cual llamaron hemocuprefina. Del hígado aislaron otro compuesto cobre - proteína, el cual llamaron hepatocuprefina.

## HIERRO

Es un elemento indispensable en la dieta. Su ausencia o su ingestión en cantidad menor que la adecuada determina una anemia por deficiencia nutritiva, caracterizada por una disminución de la hemoglobina sanguínea, con una cantidad anormal o algo inferior de glóbulos rojos.

Los requerimientos de hierro para el hombre y la mujer adultos son de 10 - 12 mg diarios. Para la mujer embarazada o durante la lactancia se llega a 15 mg. Para los niños, desde 6 mg, antes del primer año, hasta 15 mg en la pubertad (89, 90).

El hierro es necesario para la formación de hemoglobina, de miohemoglobina y de pigmentos y enzimas de constitución similar, que poseen un grupo hemo en su estructura.

La absorción del hierro tiene lugar, casi exclusivamente, en el duodeno. Se absorbe como iones ferrosos y todos los factores que determinan su paso y su estabilización en ese estado, la favorecen; por el contrario, los compuestos que dan sales de hierro insolubles, como los fosfatos y el ácido fítico o que determinan un medio alcalino, que precipita al Fe de sus sales, disminuyen su absorción.

Existe además un mecanismo que regula la absorción del hierro y que la limita a las necesidades del organismo.

El control de esta absorción parece depender de una proteína, la ferritina, que se encuentra en la mucosa intestinal y que contiene hasta un 23% de su peso en hierro, presente éste en estado férrico. La ferritina se encuentra también en el hígado, bazo y médula ósea, y en todos los casos su función sería la de almacenar el hierro para proveer al organismo de una reserva.

En el plasma existe una pequeña cantidad de hierro al estado férrico, combinado con una proteína llamada transferrina o siderofilina. Normalmente, el plasma transporta de 60 a 300 mcg de hierro por 100 ml, con un promedio de 160 mcg.

El hierro absorbido es transportado por el plasma, encontrándosele rápidamente en los órganos donde hay apoferritina.

Muy poco tiempo después de la ingestión (4 horas), ya se le encuentra formando parte de la hemoglobina, pero su utilización completa necesita casi una semana.

## MAGNESIO

El cuerpo humano contiene unos 20 g de magnesio, del cual aproximadamente la mitad se encuentra en los huesos. Se ha calculado que el requerimiento de este elemento es de 200 a 300 mg por día.

Además de su importancia en el proceso de osificación, el magnesio interviene también en la contracción muscular. En animales de experimentación, la deficiencia de magnesio va acompañada de tetania, trastornos cardíacos y convulsiones. Es necesario para el funcionamiento normal del sistema nervioso. Su función bioquímica más importante está asociada con la actividad de enzimas que también requieren la presencia de ATP. Se presume que  $Mg^{++}$  y ATP forman complejos activos con dichas enzimas. Es indispensable en la síntesis de DNA, y en la interrelación con cationes como sodio, potasio y calcio. Además puede afirmarse que es un depresor del sistema nervioso central y periférico.

## POTASIO

El ion potasio es el que se encuentra en mayor cantidad dentro de las células. En ellas está en equilibrio con los iones cloruro, bicarbonato y en algunos casos particulares con proteínas.

El potasio contenido en el organismo de un hombre con un peso de 70 kg es de 175 g. De esta cantidad, aproximadamente 8 g están en la sangre, 0,3 g corresponden al plasma, 3 g a los fluidos extracelulares y el resto se encuentra dentro de las células.

La cantidad diaria ingerida se calcula en alrededor de 3 g.

Constituye uno de los factores de regulación de la presión osmótica y del equilibrio ácido - base. Además parece tener acción específica en ciertos procesos metabólicos. Es indispensable para el funcionamiento normal del intestino. Las ratas alimentadas con dietas deficientes en potasio tienen un crecimiento disminuido y desarrollan lesiones cardíacas y renales.

El potasio, que se encuentra en los alimentos en forma de sales solubles, se absorbe fácilmente en el intestino. Pasa a la sangre y es intercambiado con el contenido en los músculos y en otros órganos internos, como el hígado.

Se ha demostrado experimentalmente que durante la conducción nerviosa hay una disminución de potasio en el nervio. También en el cerebro disminuye el potasio durante la extenuación o el esfuerzo, lo que se acompaña de una mayor excreción de este elemento. Un exceso de potasio se manifiesta especialmente en la actividad del corazón, debido a la intoxicación.

El potasio puede ser movilizado del hígado por la acción de la adrenalina o de sustancias que provoquen su liberación y por los agentes que actúan sobre el sistema simpático.

Las hormonas de la corteza suprarrenal actúan también en el metabolismo del potasio.

## SODIO

El sodio es el ion que se encuentra en mayor concentración en los líquidos extracelulares del organismo. La cantidad total de sodio de un organismo adulto se calcula en 60 a 65 g, el 60% del cual está en el líquido extracelular. Un 30% se encuentra en el esqueleto en forma fácilmente movilizable y el resto en las células.

El sodio, en forma de cloruro sódico, tiene dos funciones importantes: contribuir al equilibrio ácido-base del cuerpo y ser causa en gran medida de la presión osmótica total de los líquidos extracelulares.

Su ingestión es indispensable, pues en animales en cuya alimentación se había disminuido el sodio notablemente, se observó disminución en el crecimiento, trastornos digestivos, retención disminuida del agua, lesiones en los ojos y, finalmente, muerte prematura.

## ZINC

Que el zinc es un elemento mineral esencial, lo confirma su presencia como parte de la estructura de la enzima anhidrasa carbónica. Es también muy necesario en el crecimiento, pues forma parte de varias otras enzimas y es un componente de insulina activa.

Se ha calculado que la dieta diaria media contiene 12 a 20 mg de zinc. Gran parte de la excreción es por el tracto intestinal. El zinc radiactivo se acumula en la mucosa intestinal, en el páncreas, el hígado y los glóbulos rojos. La retención por otros tejidos es mínima.

## METALES PESADOS

El incremento de la industrialización y de nuestras actividades domésticas, a consecuencia del desarrollo tecnológico actual, ha alterado el ciclo biogeoquímico de multitud de elementos, incluidos los metales pesados. El primer efecto de estos procesos es una gran acumulación de estos metales en nuestros ecosistemas naturales (48).

Desde el punto de vista toxicológico, el término metal pesado se refiere a que sus cationes forman con el hidrógeno sulfurado, sulfuros metálicos insolubles de carácter acumulativo asociado a sus propiedades tiobloqueantes y de otros grupos activos en la catálisis enzimática (toxicidad bioquímica).

El contacto con estos metales se produce por las interacciones de ellos con nuestro entorno medio - ambiente y por su traslado a la cadena alimentaria, bien por procesos naturales o industriales.

Los metales en los ecosistemas sufren interacciones metal - metal, con el pH, con la temperatura, con el biotopo acuático (aguas de diverso grado de dureza) que influyen en su forma físico - química lo que modifica su biodisponibilidad y, por tanto, su mayor o menor potencialidad toxicológica.

Así, el plomo ve incrementada su toxicidad por su mayor biodisponibilidad en aguas duras, donde se encuentra al estado de  $PbOH^+$ .

Por otro lado, esta acumulación ambiental de metales pesados conlleva el paso a la cadena alimentaria, a través de muy diversos mecanismos, como por ejemplo, la absorción de los cultivos por las aguas de riego o por deposición atmosférica (Pb y Hg en la gasolina).

Sin olvidar que la tecnología alimentaria, utiliza envases que pueden provocar migración a nuestros alimentos de consumo habitual. Todo esto determina una serie de propiedades de la toxicidad de los metales:

- 10.- Persistencia en el ambiente.
- 20.- Progresiva acumulación en la cadena alimentaria.
- 30.- Toxicidad creciente en el hombre por bioacumulación.

## ARSENICO

El arsénico es un elemento ubicuo en la corteza terrestre, generalmente combinado con azufre, fósforo y hierro. La contaminación ambiental es generalmente debida a su uso como herbicida, rodenticida, fungicida y en la industria del vidrio.

Es transportado al medio ambiente principalmente por el agua. Debido a las contribuciones de contaminación industrial, el arsénico también es transportado por el aire, en donde su concentración puede variar desde unos pocos nanogramos hasta algunos microgramos por metro cúbico.

Debido a la capacidad de bioconcentración de este elemento en el agua de mar, tiende a acumularse en ciertos animales marinos de alimentación inferior, en forma de arsenobetaina..

Los compuestos trivalentes de arsénico son las formas tóxicas principales, y los compuestos de arsénico pentavalente tienen menos efecto sobre la actividad enzimática. Las propiedades toxicológicas varían en un mismo compuesto arsenical dependiendo de su administración en solución acuosa o en extracto seco, siendo la forma administrada en solución mucho más tóxica que la seca.

Los estudios muestran que al administrar arsénico en forma oral, se absorbe casi completamente en el tracto gastrointestinal; del 6 al 9% se elimina en heces pero principalmente por vía urinaria.

Tiene predilección por la piel y se excreta con la descamación y el sudor; también se concentra en uñas y cabellos.

**Toxicología.-** Los efectos toxicológicos se centran en degeneración grasa del hígado y necrosis celular.

Actúa a nivel del protoplasma celular inhibiendo las enzimas mitocondriales por unión del grupo sulfhidrilo e impide la respiración tisular. También inhibe la actividad de la deshidrogenasa succínica y desacopla la fosforilación oxidativa, lo cual resulta en la estimulación de la actividad de la ATPasa mitocondrial.

Los efectos más conocidos del arsénico son los que ocasiona en el sistema nervioso; el daño se produce esencialmente en la neurona periférica, causando axonopatía distal y desmielinización.

Los derivados minerales del arsénico atraviesan rápidamente la barrera placentaria, concentrándose en los tejidos fetales.

Es cancerígeno a nivel del sistema nervioso. También se han demostrado lesiones del DNA. En fumadores produce aberraciones cromosómicas y cambios en la cromátida de linfocitos.

Los efectos de la exposición industrial son dermatitis, especialmente en cara y manos, acompañada de efectos en las membranas mucosas y muy raramente disturbios intestinales.

La ingestión de grandes dosis (70 a 180 mg) puede ser fatal. Los síntomas consisten en fiebre, anorexia, hepatomegalia, melanosis y arritmia cardíaca con cambios encefalográficos que pueden ser signos de fallo cardiovascular eventual.

Otros rasgos incluyen síntomas del tracto respiratorio superior, neuropatía periférica y efectos gastrointestinales, cardiovasculares y hematopoyéticos.

Las exposiciones crónicas pueden provocar daño en el hígado hasta progresar a cirrosis y ascitis. También puede provocar padecimientos vasculares periféricos, que pueden degenerar en endoarteritis obliterante y gangrena de las extremidades inferiores (48, 85).

En personas que han estado expuestas durante varios años a aguas potables con arsénico se han reportado tumores hepáticos, ya que el arsénico tiene efectos específicos sobre las células endoteliales de los vasos sanguíneos del hígado.

## CADMIO

El cadmio se encuentra entre los elementos cuyas cifras en los niveles de contaminación ambiental han crecido rápidamente en los últimos tiempos.

La concentración de cadmio en el agua, suelo, aire y alimentos varía ampliamente de un área a otra. Aparece como contaminante muy significativo en áreas próximas a minas de plomo y de zinc. Cada vez es mayor la utilización de este metal en productos manufacturados. Su presencia en abonos procedentes de los residuos de grandes ciudades, hace que pueda pasar de los suelos a las plantas y de éstas al hombre.

El cadmio se absorbe principalmente por el sistema respiratorio, la absorción gastrointestinal es sólo de 5 a 8%. Su absorción se incrementa por deficiencias dietéticas de calcio y hierro y dietas bajas en proteína. Las dietas bajas en calcio estimulan la síntesis de calcio unido a proteínas, lo cual aumenta la absorción de cadmio. Por el contrario, el zinc disminuye la absorción del cadmio (6, 55).

El cadmio es transportado en la sangre unido a las células rojas y a las proteínas de alto peso molecular en el plasma, particularmente albúmina.

**Toxicología.-** Los principales efectos por exposición durante largo tiempo a bajos niveles de cadmio son padecimientos pulmonares obstructivos crónicos, enfisema y enfermedades crónicas de los túbulos renales. También puede haber efectos sobre los sistemas cardiovascular y esquelético.

La toxicidad en el aparato respiratorio es proporcional al nivel y tiempo de exposición. El padecimiento pulmonar obstructivo resulta de bronquitis crónica, fibrosis progresiva de las vías aéreas inferiores y acompañado de daño alveolar que conducen al enfisema.

Los efectos sobre la función de los túbulos proximales se manifiestan por incremento de cadmio en la orina, proteinuria, aminoaciduria, glucosuria y decremento de la reabsorción de fosfato en los túbulos renales.

La neuropatía ocurre cuando la concentración de cadmio en el riñón alcanza un nivel de 200 mcg/g, que ha sido considerada como la concentración crítica de cadmio.

**Hipertensión y padecimientos cardiovasculares.-** La ingestión crónica de agua potable con bajos niveles de cadmio (5ppm) en ratas, indujo hipertensión.

**Carcinogenicidad.-** Se ha comprobado el incremento de carcinoma en trabajadores expuestos a la inhalación de cadmio (84).

## MERCURIO

Existen 3 formas de mercurio presentes en la alimentación: elemental (metálico), inorgánico (mercúrico) y orgánico.

El mercurio metálico en la atmósfera representa la mayor vía de transporte aéreo de mercurio. No obstante, las descargas industriales también son factores de contaminación.

El mercurio metálico se volatiliza a temperatura ambiente para convertirse en vapor de mercurio, por lo tanto, la mayor exposición humana es por inhalación. El vapor se difunde rápidamente a través de la membrana alveolar y es soluble en los lípidos, así que tiene afinidad por las células rojas y el sistema nervioso central.

Otras vías de llegada del mercurio al ser humano son su infiltración en los cursos de agua, debido a los desechos, y la contaminación de los alimentos debido a la utilización de pesticidas organomercuriales como fungicidas. La absorción de estos fungicidas se realiza por vía folicular debido a la gran volatilidad de sus sales.

En el tracto gastrointestinal se absorbe muy lentamente (0.01%).

Como muchos otros metales pesados sufre el problema de la bioacumulación que determina que escasas cantidades del mismo o derivadas al ambiente sean acumuladas por las especies animales que nos pueden servir como fuente alimentaria.

**Metabolismo y excreción.-** El mercurio elemental es oxidado a mercurio divalente después de su absorción en los tejidos del cuerpo. El vapor de mercurio absorbido por inhalación en las células rojas se transforma a mercurio divalente, pero una parte también es transportada como mercurio metálico hacia los tejidos más distantes, particularmente el cerebro, donde puede ocurrir una biotransformación.

Dentro de las células, el mercurio bloquea el metabolismo de las enzimas con grupos catalíticos sulfhidrilo (incluyendo aquéllas de microsomas y mitocondrias), a los cuales se fija inactivándolos. Si el tiempo de inhibición es muy largo, puede causar la muerte celular.

**Toxicología.-** Las toxicidades de los distintos componentes mercuriales son diferentes dependiendo de su forma química. Así, el mercurio metálico no es tóxico, ya que no se absorbe en el tracto gastrointestinal. Sin embargo, los compuestos alquilmercuriales son más tóxicos debido a su estabilidad y liposolubilidad. El tiempo medio de eliminación del mercurio total presente en el organismo es de 72 días y de 40 días para el cloruro de mercurio.

**Vapor de mercurio.-** Su inhalación puede producir bronquitis y pneumonitis intersticial y, si no es fatal, puede estar asociada con síntomas del sistema nervioso central tales como temblores y excitabilidad incrementada.

**Mercurio mercúrico.-** La ingestión de cloruro de mercurio u otras sales de mercurio producen ulceración corrosiva, sangrado y necrosis del tracto gastrointestinal, acompañado por shock y colapso circulatorio.

**Mercurio orgánico.-** El metil mercurio es la forma de mercurio más importante desde el punto de vista toxicológico. Los rasgos clínicos principales son neurológicos, consistiendo en parestesia, ataxia, disartria y sordera, apareciendo en ese orden. Los principales síntomas patológicos de la toxicidad del metil mercurio incluyen degeneración y necrosis de neuronas en áreas focales de la corteza cerebral, particularmente en las áreas visuales de la corteza occipital y en la placa granular del cerebelo provocando malformaciones esqueléticas oculares y craneocerebrales (microcefalia) además de trastornos psicomotores.

La Organización Mundial de la Salud ha aceptado la cantidad de 5 mcg/kg/día como la dosis de mínima toxicidad para el metil mercurio.

Su toxicidad a largo plazo se ejerce principalmente en el sistema nervioso y renal, ya que se reabsorbe en la parte distal de los túbulos proximales.

Los efectos genotóxicos también dependen de su forma química. El cloruro de mercurio y el metil mercurio inducen anomalías cromosómicas (aberraciones) de tipo cromátido; además se relacionan con anomalías de segregación cromosómica.

El metil mercurio, es también excretado en la leche materna, siendo su concentración del 5% de la cantidad total encontrada en la sangre materna.

## PLOMO

El plomo es el más ubicuo de los metales tóxicos contaminantes. Por ello es el elemento traza no esencial más encontrado en el cuerpo (18, 88).

En promedio, la población recibe casi el 70% de su exposición al plomo a través de la comida. Otras fuentes son el agua y el aire.

La absorción gastrointestinal del plomo está influenciada por un gran número de factores en la dieta, tales como pectinas, proteínas y grasas; en animales con dieta restringida se ha observado una gran acumulación de plomo.

Debido a que el metabolismo del plomo parece estar mediado por los mismos mecanismos que controlan el metabolismo del calcio y del fósforo, bajos niveles de estos elementos en la dieta pueden propiciar la retención de plomo. También las deficiencias de hierro y zinc incrementan la retención del elemento.

Los niveles tolerables en la ingesta de plomo han sido formulados para minimizar o prevenir efectos fisiológicos adversos. La Organización Mundial de la Salud estableció provisionalmente la ingesta tolerable, teniendo en cuenta todas las fuentes, aproximadamente en 429 mcg/día o 7 mcg/kg de peso corporal/día para un adulto. En cuanto a los niños, la ingesta no debe ser mayor a 100 mcg/día si tienen de 1 a 6 meses; ó 150 mcg/día si su edad es de 6 meses a 2 años.

El plomo absorbido es excretado principalmente por vía urinaria, aunque también por la vía biliar, transpiración, cabello y uñas. Una de las características del plomo retenido en el organismo, es su enorme afinidad por los huesos; 90% del total lo encontramos unido al tejido óseo. El resto se divide entre la sangre y los tejidos blandos, especialmente el hígado y los riñones. En el esqueleto el plomo es razonablemente estable con un tiempo de residencia de casi 3 décadas; en cambio en la sangre y tejidos su período es de 4 - 6 semanas.

Aunque los efectos de la intoxicación aguda por plomo son dramáticos, los síntomas de la intoxicación crónica son muy difíciles de reconocer.

La severidad de las manifestaciones clínicas en la intoxicación por plomo depende de la duración y la intensidad de la exposición. Sus efectos han sido más estudiados en la hematopoyesis (formación de la sangre), en los riñones y en el sistema nervioso.

**Efectos hematológicos.-** Uno de los signos de intoxicación crónica es la aparición de anemia hemolítica microcítica e hipocrómica, caracterizada por eritrocitos anormalmente pequeños y reducido contenido en hemoglobina. Este tipo de anemia resulta de la interferencia del plomo con sistemas enzimáticos específicos involucrados en la síntesis de heme y es acompañado por la aparición de concentraciones anormales en sangre y orina de precursores heme tales como el ácido delta - aminolevulínico.

**Efectos renales.-** En el envenenamiento tanto agudo como crónico, es el mecanismo de excreción renal el que se ve principalmente afectado. En el caso agudo los efectos renales incluyen degeneración del revestimiento celular de los túbulos proximales, variando el grado de necrosis celular, y

decremento en la absorción de aminoácidos, glucosa y fosfatos. Clínicamente la nefropatía aguda por plomo se caracteriza por aminoaciduria, glucosuria e hipofosfatemia. Estos cambios funcionales y morfológicos pueden ser reversibles después de terapia de quelatación, si la exposición ha sido de corto tiempo.

Cuando la exposición al plomo ha sido durante largo tiempo, se presenta una nefropatía crónica, la cual se caracteriza generalmente por una lenta y progresiva degeneración del tejido renal, acompañada por un decremento en su función.

**Efectos neurológicos.-** La absorción excesiva de plomo está asociada a daños al sistema nervioso, tanto al central como al periférico. La forma más severa de intoxicación que involucra al sistema nervioso central es la encefalopatía aguda por plomo, que se caracteriza por la rápida aparición de edema cerebral masivo, convulsiones, coma y muerte como resultado de falla cardiopulmonar. Frecuentemente es precedido por sutiles síntomas que incluyen pérdida de la memoria, irritabilidad, letargo mental, pérdida de concentración y lasitud. En los casos no fatales, las secuelas neurológicas incluyen retardo mental, anomalías en la conducta tales como irritabilidad, hiperactividad, ocasionalmente ceguera, pérdida del habla y/o comprensión del lenguaje, debilidad muscular que usualmente afecta un lado del cuerpo.

El efecto principal del plomo sobre el sistema nervioso periférico es reducir la función motora. Debilidad muscular, especialmente de los músculos extensores, temblor, fatiga y pérdida de la coordinación muscular son síntomas comunes en la neuropatía por plomo. También se han reportado reflejos motores reducidos y velocidades de conducción nerviosa disminuidas.

Una vez absorbido en el aparato circulatorio, el plomo es transportado a todo el cuerpo, como casi la mayoría de metales pesados, unido a las células sanguíneas y constituyentes del plasma. El plomo en la sangre se une principalmente a los eritrocitos, en donde su concentración es casi 16 veces más alta que en plasma. Algo del plomo absorbido es transportado al cerebro. El plomo metálico, no obstante, no se acumula ahí en gran cantidad. El tetraetil plomo, por otra parte, se retiene preferentemente en el tejido cerebral, en donde es roto parcialmente para formar el derivado trietil.

El plomo encuentra un camino de salida del cuerpo por medio de la leche. Niveles altos hasta de 0.12 mg/l se han encontrado en la leche humana en Japón. El incremento del contenido de plomo tanto en leche humana como en la de vaca, se ha encontrado en áreas donde el plomo ambiental es anormalmente alto.

## CAPITULO II

# ***METODOS***

## TECNICAS PARA EL ANALISIS DE LECHE

Uno de los objetivos más importantes de las industrias de alimentación es obtener productos de calidad controlada. Para lograr este objetivo, es necesario empezar por conocer la calidad de las materias primas y de los productos elaborados, base indispensable para orientar, por un lado, la mejora del nivel de calidad actual, y por otro, obtener datos y experiencias suficientes en qué fundar una legislación realista y eficaz, así como dictar normas que garanticen la uniformidad de los productos que llegan al mercado.

En relación con metales pesados hay que señalar la considerable atención que se ha prestado a las consecuencias ambientales de los contaminantes no orgánicos. En este contexto, la contaminación por metales pesados de la leche y productos lácteos ha sido ampliamente estudiada en la mayor parte de los países europeos. Al igual que en el caso de los pesticidas, la recopilación de los datos existentes es un requisito para asegurar el alcance de la contaminación y el riesgo potencial para la salud (3, 27).

A nivel de laboratorio desde hace bastantes años se ha utilizado la espectrofotometría de absorción atómica (EAA), con y sin llama, para la determinación de series completas de oligoelementos.

El análisis por EAA consiste en esencia en la determinación de metales o de metaloides por conversión de la muestra en un vapor atómico y medida de la radiación espectral de resonancia a longitudes de onda que son específicas a cada uno de los elementos determinados. La observada falta de interferencia entre metales, acoplada con una buena sensibilidad en la determinación de un amplio número de elementos, contribuye al auge de esta técnica en la industrial alimentaria, en el análisis de trazas de elementos metálicos; especialmente en la determinación de cationes naturales de la leche, así como de metales contaminantes. (36).

## PRETRATAMIENTO DE LA MUESTRA

Para llevar a cabo la detección y cuantificación de los elementos contenidos en una muestra, no importando el estado físico de ésta ni el método que se utilice para su análisis, el analista lo primero que tiene que realizar es poner estos elementos en solución. Para ello ha ideado una serie de métodos, los cuales se sintetizan a continuación:

Tanto la oxidación por vía húmeda (digestión) como las técnicas de incineración por vía seca tienen desventajas cuando se aplican a la determinación de metales en alimentos (68,69). Durante la

calcificación pueden originarse pérdidas por volatilización, adsorción, combustión incompleta del carbón, o formación de silicatos insolubles. En los métodos de digestión no pueden tratarse grandes cantidades de muestra; requieren así mismo una supervisión constante, y al emplear volúmenes elevados de reactivos originan en algunos casos valores de blancos elevados (75,76).

Un paso importante en el análisis de elementos metálicos en la leche es la mineralización. Esta rompe las uniones de los elementos inorgánicos con la materia orgánica, poniendo en solución a éstos (15, 20, 25, 35).

Frecuentemente, los procedimientos de mineralización son específicos para el método usado en la determinación de un elemento.

Las leches con alto contenido de grasa pueden ser analizadas por mineralización húmeda o procedimientos de extracción ácida. Los procedimientos de extracción ácida aceleran el análisis sin pérdida notable del elemento.

La cantidad de muestra frecuentemente afecta la pérdida del elemento durante la mineralización. Con cantidades de muestra menores de 1 g de masa seca, se incrementa la repetibilidad como resultado de la heterogeneidad de la muestra, y, en el caso de mineralización en seco, es frecuente observar un "efecto de pared", en donde el elemento es en parte adsorbido en el recipiente. Con muestras grandes, de más de 25 g de masa seca, las pérdidas se incrementan debido a la mineralización prolongada. Por lo tanto, es muy importante la selección de la cantidad óptima de muestra que debe ser mineralizada de acuerdo al elemento bajo consideración.

Cuando la materia orgánica deba ser destruida como paso preliminar a la determinación de trazas metálicas, la elección del método dependerá:

- a) De la naturaleza del material orgánico, así como de cualquier constituyente inorgánico.
- b) Del metal que va a ser determinado y el método que va a usarse para su determinación.

Se han logrado resultados muy prometedores en la descomposición de leche en polvo trabajando a presión. Las muestras son fácilmente descompuestas así, aunque no totalmente mineralizadas. A pesar de este inconveniente y de que esta técnica es relativamente cara, si la medida analítica final se efectúa por EAA, suministra un tratamiento rápido y sencillo, obteniéndose valores de blancos muy bajos. La digestión completa puede conseguirse con mezclas de  $\text{HNO}_3$  -  $\text{HClO}_4$  en conjunción con  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

La digestión permite, tras la dilución de la solución, la aplicación de EAA a contenidos de elementos traza del orden de ppb. Recientemente se ha descrito un aparato para la digestión húmeda de materiales orgánicos con mezclas de  $\text{HNO}_3$ .  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (70).

## INCINERACION POR VIA SECA

Antila (36) argumenta que todos los procesos de digestión húmeda por él ensayados son tediosos y consumen tiempo, por lo que recurre a la incineración seca. Parte de 50 a 100 ml de leche, colocados en un recipiente de cuarzo de 200 ml de capacidad. Se seca la muestra en la estufa a  $105^\circ\text{C}$ . A continuación carboniza la muestra elevando gradualmente la temperatura de la estufa a  $250^\circ\text{C}$  y llevándola a un horno de mufla a  $450 - 500^\circ\text{C}$ . El residuo grisáceo se blanquea tratando con  $\text{HNO}_3$  12N. Al residuo se añade 1 ml de  $\text{HNO}_3$  y se evapora a sequedad en un baño de agua. Tras esta operación la muestra se lleva de nuevo al horno a  $450 - 500^\circ\text{C}$  durante 1 hora. Al residuo blanqueado se añaden 10 ml de HCl 1:1, se calienta a ebullición y se evapora a sequedad. El residuo obtenido de la evaporación a sequedad se disuelve en 50 ml de HCl 0.1N y en esta solución se procede a la determinación de los metales Fe, Cu, Zn, Mn y Mo.

Rebmann y Hoeth, en la determinación de Fe y Cu en leche, parten de 25 g de muestra, evaporándola a sequedad en un baño de agua, y calcinando a continuación el residuo a  $600^\circ\text{C}$ . Disuelven el residuo obtenido en HCl y diluyen la solución a 50 ml, previamente a la realización de las determinaciones. Roschnick efectúa la calcinación a  $525^\circ\text{C}$  para la determinación de Cu, mientras que Morgan calcina en primer lugar la muestra a  $500^\circ\text{C}$ , añade a continuación unas gotas de  $\text{HNO}_3$  y efectúa una segunda calcinación también a  $500^\circ\text{C}$ . Murthy y Rhea en cambio, en la determinación de Cu, Fe, Mn y Zn en leche evaporada y en preparados infantiles efectúan la calcinación a  $550^\circ\text{C}$ . En un estudio sobre el Cu, Fe, Mn y Zn, Murthy y col. calcinan la leche a  $450^\circ\text{C}$  (36).

Dequidt y col. evaporan lentamente 50 ml de leche en un tubo de cuarzo, calcinando después a  $500^\circ\text{C}$  durante 6 horas en un baño de arena. A continuación añaden 2 ml de  $\text{HNO}_3$  concentrado y llevan la solución en baño de agua hasta evaporación completa. Tratan el residuo con 10 ml de agua bidestilada, y en la solución que contiene los metales en forma de nitratos determinan Mn, Zn y Cu.

Juárez y Martínez (71) parten de 100 ml de leche (10 g de leche en polvo o 25 g de leche concentrada) y evaporan a sequedad la solución sobre una placa caliente. Disuelven el residuo en  $\text{HNO}_3$  1N calentando, y transfieren cuantitativamente a un tubo de centrífuga de 10 ml, provisto de tapón.

Centrifugan durante 10 minutos a 1800 rpm con objeto de separar las posibles partículas de sílice y en el líquido sobrenadante determinan Fe, Cu y Mn.

El método de incineración por vía seca involucra la completa descomposición de las sustancias orgánicas por oxidación. Puede efectuarse también en horno eléctrico a temperatura controlada. El procedimiento es el siguiente (25):

Dependiendo del elemento que se va a determinar, se pesan 10 g de muestra o porciones menores (0.1 - 0.01 g), se colocan en una cápsula o crisol, se añade  $\text{HNO}_3$  (1:1) calculado en base a un ml de ácido por cada 50 mg de producto; se mezcla, se coloca en plancha eléctrica caliente y se carboniza hasta que cese el humo (para acelerar la carbonización, calentar el recipiente con muestra por medio de lámpara infrarroja). Se coloca entonces en horno eléctrico a aproximadamente  $250^\circ\text{C}$ . Calentar las muestras gradualmente, incrementando la temperatura del horno  $50^\circ\text{C}$  a intervalos de 30 minutos hasta llegar a  $450^\circ\text{C}$ , cuando se forma una ceniza gris. Sacar el recipiente del horno, enfriar a temperatura ambiente y añadir 0.5 - 1.0 ml de  $\text{HNO}_3$ . Evaporar lentamente el ácido hasta sequedad en plato eléctrico y colocar el recipiente en horno eléctrico a  $250^\circ\text{C}$ . Incrementar gradualmente la temperatura hasta  $450^\circ\text{C}$  y mantenerlo así 1 hora. La mineralización se considera completa cuando la ceniza es blanca o débilmente coloreada sin partículas carbonizadas.

Para efectuar la determinación de Fe, tratar las muestras con  $\text{HNO}_3$ . Humedecer el contenido del recipiente con 2 - 3 ml de  $\text{HNO}_3$ , calentando en baño de agua hasta que la evolución de vapores cese. Repetir el tratamiento con  $\text{HNO}_3$  dos veces más. Carbonizar el residuo en platillo caliente (para acelerar la carbonización también se puede usar lámpara infrarroja) y colocar entonces el recipiente en horno eléctrico a  $250^\circ\text{C}$ , incrementando gradualmente la temperatura a una velocidad de  $50^\circ\text{C}$  cada 30 minutos hasta  $450^\circ\text{C}$ .

Cuando el elemento a determinar es As se procede de la siguiente forma, dependiendo del estado físico en que se encuentre la muestra. Si la muestra contiene menos de 80% de humedad, añadir una mezcla de óxido de magnesio y nitrato de magnesio (1:1), en proporción del 10 - 15% del peso de la muestra, seguido de agua para formar una suspensión. Para muestras con más de 80% de humedad, añadir la mezcla de óxido de magnesio y nitrato de magnesio (1:1) en una cantidad de 2 - 5% del peso de la muestra, sin añadir agua. Evaporar hasta sequedad colocando el recipiente en baño de agua u horno de aire o al vacío a  $80 - 100^\circ\text{C}$ . Transferir la porción de muestra a plato caliente y carbonizar suavemente hasta que cese el humo. Colocar el recipiente en horno eléctrico a  $250^\circ\text{C}$ , incrementar gradualmente la temperatura hasta  $450^\circ\text{C}$  a una velocidad de  $50^\circ\text{C}$  por hora, y continuar la mineralización hasta obtener una ceniza gris. Sacar el recipiente del horno, enfriar a temperatura ambiente y humedecer con 0.5 - 1.0

ml de agua. Entonces evaporar lentamente hasta sequedad en parrilla caliente y volver a poner en horno a 250°C, elevando la temperatura gradualmente hasta 450°C, manteniéndola durante 1 hora. Se considera que la mineralización es completa cuando la ceniza está blanca o levemente coloreada sin partículas carbonizadas.. Si hay carbón presente, repetir el tratamiento con agua (15).

## DESCOMPOSICION HUMEDA

La descomposición húmeda de la materia orgánica por la acción de varios ácidos es casi de aplicación universal y las condiciones pueden ser ajustadas para prevenir la pérdida de los elementos más volátiles (por ejemplo As y Hg) (32, 34).

Este método involucra destrucción completa de sustancia orgánica en porciones de prueba por calentamiento con ácidos concentrados sulfúrico o nítrico y con ácido perclórico al 57% o peróxido de hidrógeno al 30%, o por calentamiento en presencia de peróxido de hidrógeno únicamente.

### APARATOS:

Nota: Todos los aparatos de vidrio deben ser lavados perfectamente con ácidos sulfúrico y nítrico; después deben enjuagarse con agua destilada inmediatamente antes de usarse, para asegurarse de que no contienen trazas de los metales que van a ser sometidos a prueba.

Cuando la materia orgánica se calienta con mezclas de ácidos concentrados en matraz Kjeldahl, la descomposición se efectúa más eficientemente cuando se proveen algunos medios para que los ácidos calientes estén en reflujo parcial; esto puede lograrse con una extensión en el cuello del matraz. La extensión sirve para condensar los vapores dentro de un condensador de vapores - ácidos y conectar un embudo a través del cual pueden introducirse los reactivos. Los matraces deben ser de vidrio borosilicato o de sílice de 100 a 250 ml de capacidad. A través del condensador se mantiene un flujo de agua, y la remoción de los vapores ácidos también puede efectuarse conectando la salida superior a una bomba de agua.

**REACTIVOS:**

Es esencial usar reactivos y agua destilada con un adecuado bajo contenido en metales, tomando en consideración que los ácidos minerales concentrados generalmente son usados en cantidades que son varias veces la de la muestra. Algunos de los reactivos más comúnmente usados se pueden obtener en grados adecuados para análisis de alimentos. (77, 78).

Los métodos de digestión húmeda que utilizan  $\text{HClO}_4$  en mezclas con  $\text{HNO}_3$  o  $\text{H}_2\text{SO}_4$  -  $\text{HNO}_3$  pueden emplearse con éxito en el análisis, aunque pueden producirse pérdidas de Cr, y presentarse así mismo problemas de precipitación con muestras que contengan una elevada proporción de K, debido a la baja solubilidad de  $\text{KClO}_4$ .

Dequidt y col. (36), preconizan la utilización del método sulfonítrico de Denegés en la determinación de Fe. En un matraz de tipo Kjeldahl se introducen 50 ml de leche, 5 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado puro (exento de As), y de 20 a 30 ml de  $\text{HNO}_3$ . Se somete a ebullición suave en vitrina, con lo que se produce un abundante desprendimiento de vapores rojizos, y se prosigue el calentamiento hasta el ennegrecimiento de la muestra. Se añade a continuación gota a gota, manteniendo la ebullición,  $\text{HNO}_3$  puro redistilado hasta decoloración completa de la muestra. Se deja que ésta se enfríe y se eliminan los productos nitrados añadiendo al residuo 50 ml de agua y algunos decigramos de urea ( $2\text{HNO}_3 + \text{CO}(\text{NH}_2)_2 = 2\text{N}_2 + \text{CO}_2 + 3\text{H}_2\text{O}$ ). Se concentra entonces hasta la aparición de humos blancos y se trasvasa el líquido obtenido en la mineralización a un matraz aforado de 25 ml, completando hasta el aforo con agua destilada.

Evans y col. emplean una mezcla de  $\text{HNO}_3$  y  $\text{H}_2\text{SO}_4$  en la destrucción de la materia orgánica de la leche como uno de los pasos previos a la determinación de Ni, Cu, Fe, Mn y Zn. Asimismo, Jackson y col. utilizan esta misma mezcla en el caso del Co y Cr. El procedimiento seguido es el preconizado por el Comité de Métodos Analíticos de la Sociedad para el Análisis Químico, con ligeras variantes. El  $\text{HNO}_3$  (10 ml de peso específico (pe) 1.41) se añade antes que el  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (5 ml de pe 1.84). Cuando la oxidación se completa se diluye a 100 ml con agua para obtener una solución con una concentración final en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  del 5% V/V, incolora. Se preparan al mismo tiempo dos soluciones blancas, son los mismos volúmenes de ácidos empleados en la oxidación de la muestra, y se tratan de idéntica manera.

El procedimiento de digestión húmeda con cualquiera de las mezclas comunes de ácidos, muestran resultados satisfactorios.

## OTROS METODOS

Junto a los métodos de incineración por vía seca y digestión húmeda se han empleado métodos de no destrucción o de destrucción parcial de la matriz de la leche. El desarrollo de estos métodos refleja la tendencia general de combinar distintas operaciones analíticas.

Las muestras de leche, con un elevado contenido salino, originan problemas en EAA cuando se introducen directamente en la llama, por lo que se han descrito dispositivos especiales que posibilitan su tratamiento directo. Hell determina así Zn en leche de vaca tras dilución (1:25) con agua destilada, y Fry y Denton determinan Zn y Cu en leche evaporada concentrada.

También se ha descrito el uso de detergentes en la determinación directa de Fe, Zn y Cu en leche. La muestra (1 ml) se mezcla con 3 ml de una solución recién preparada de saponina al 0.1% y con una solución de Meriten al 0.2 - 0.4%. Arpadjan y Nadova secan 1 g de muestra a 80°C durante 24 horas y la disuelven a continuación en una solución de Meriten al 0.1% o en Triton X-100 al 0.05%, llevándola entonces a la llama. La concordancia obtenida entre los resultados obtenidos de esta manera y los logrados después de calcinar o de someter la muestra a una digestión húmeda es buena, por lo que los autores proponen el método para uso rutinario.

## PROCEDIMIENTOS DE PRECONCENTRACION Y EXTRACCION CON SOLVENTES ORGANICOS

Muchos problemas asociados con el análisis de elementos traza en alimentos están asociados con el bajo nivel de concentración a determinar y por tanto resulta necesario clasificar a los elementos de acuerdo con su contenido en una muestra determinada (9):

- i) elementos mayoritarios y minoritarios (0.01 - 100%);
- ii) elementos traza (0.01 - 100 mg/kg);
- iii) elementos ultratrazas (< 0.01 mg/kg).

La tarea más común del analista consiste en determinar la cantidad de alguna especie en particular o analito presente en una matriz compleja y a veces heterogénea. Para lograr esto es generalmente necesario llevar a cabo una preconcentración de tal manera que el analito disponible sea suficiente como para llevar a cabo la apropiada determinación cuantitativa con un aceptable nivel de precisión. Las interferencias de los demás elementos de la matriz deben de reducirse por debajo de ciertos niveles mediante procedimientos de separación o de enmascaramiento, que pueden, en mayor o

menor extensión, incorporarse o ser inherentes a la etapa de preconcentración. A este respecto conviene enfatizar la interdependencia de los métodos físicos y químicos de análisis. En particular, los métodos de análisis se benefician a menudo por combinación de los métodos químicos de separación y preconcentración.

El zinc se encuentra en cantidad suficiente, por lo que su determinación no presenta problemas especiales en EAA, pero otros elementos traza se presentan en la leche a tan bajas concentraciones que la EAA convencional no es lo suficientemente sensible como para lograr con éxito su determinación cuantitativa. El método de adición estándar, ampliamente utilizado en análisis instrumental, extiende las posibilidades determinativas de los métodos, pero su aplicación puede resultar insuficiente en determinados problemas.

La determinación de Fe en leche (diluida con agua) por EAA de llama no es posible, no sólo debido a la baja concentración en que se encuentra, sino también a problemas relacionados con la dispersión de la luz en la llama.

Con objeto de dar una respuesta a estos problemas la técnica ha evolucionado en dos direcciones. La más antigua y más frecuentemente empleada ha sido la quelación de los elementos seguida de extracción por solvente y medida directa del extracto en la llama. La otra alternativa, más moderna, es de naturaleza instrumental e implica el uso de atomización electrotérmica.

Para evitar por tanto problemas relacionados con la dispersión de la luz en la llama, y aumentar al mismo tiempo la concentración de metales en la solución a medir, la extracción con solventes tras la previa complejación de los iones metálicos constituye un excelente procedimiento. El efecto de matriz de la muestra desaparece.

En las técnicas de extracción resulta necesario elegir un buen solvente tanto del agente quelatante como del complejo. Cuando el acabado analítico se efectúa mediante la espectrofotometría UV - visible, se utilizan a menudo solventes clorados, tales como  $\text{CHCl}_3$  y  $\text{CCl}_4$ , especialmente en el caso de que se emplee ditizona como reactivo colorimétrico.

Otros solventes, en particular cetonas tales como la metilisobutilcetona (MIBC), 2,4-Pentanodiona (acetilacetona) y 6-metil-2,4-heptanodiona son empleados cuando la determinación posterior va a efectuarse por EAA. Se puede igualmente acudir a ésteres: propionato o acetato de etilo y acetato de butilo. Estos solventes, combustible, se prefieren a los clorados ininflamables y generadores de ácidos agresivos. El  $\text{CHCl}_3$  se evapora además muy rápidamente dejando el complejo sólido detrás, el cual

puede obtener la cámara de vaporización. El benceno tampoco resulta un solvente apropiado para EAA debido a que produce llamas turbulentas e inestables. De entre los solventes acetato de etilo, MIBC, acetato de isoamilo y acetato de n-butilo, los que originan mayores aumentos de absorbancia en comparación con la absorbancia de cantidades idénticas de metal en solución acuosa son la MIBC y el acetato de etilo, aunque éste último presenta el inconveniente de ser demasiado volátil.

El sistema de extracción por solventes más útil en EAA es el de la MIBC en conjunción con el pirrolidindietilditiocarbamato de amonio (APDC), producto que puede prepararse en el laboratorio según la técnica de Malissa y Schoeffmann. El APDC forma complejos con un gran número de elementos en un amplio rango de pH, y es más estable en soluciones ácidas que otros reactivos similares. Los dietilditiocarbamatos sódico y amónico pueden emplearse también. Una fuente potencial de error en determinaciones con APDC es la solubilidad de la MIBC en agua, que varía con el pH.

Se ha sugerido que el dietilditiocarbamato de amonio (DDCA) es más apropiado que el APDC, ya que forma quelatos estables a partir de soluciones ácidas en xileno como solvente (72). Se ha usado también con éxito el hexametilenditiocarbamato de hexametilenamonio. Este último reactivo se sintetiza a partir de hexametilenimina, un subproducto de la manufactura del nylon. Recientemente se ha investigado la efectividad de reactivos quelatantes mixtos APDC - DDCA, con respecto a unos cuantos elementos, a valores diferentes de pH. El APDC es insoluble en MIBC y también posee una solubilidad limitada en medio ácido, el DDCA en cambio es soluble en MIBC.

## IMPORTANCIA DE LOS REACTIVOS ORGANICOS EN EAA

El uso de los reactivos orgánicos analíticos puede mostrar variados efectos en EAA (73). En primer lugar el grado de atomización de los elementos se altera, dependiendo esta alteración del modo y mecanismo de atomización. La absorción específica aumenta generalmente, mejorando el rendimiento de la nebulización y elevando por combustión la temperatura del solvente (operación exotérmica y no endotérmica como es el caso de la evaporación del agua de las soluciones acuosas). En segundo lugar, el reactivo puede suprimir o disminuir la interferencia de elementos presentes durante la determinación de un analito determinado.

Cuando se usa un solvente orgánico éste puede, por tanto, influenciar la conducta de un determinado sistema. Mientras que cuando se emplea la EAA con llama a soluciones acuosas no es muy importante qué método se utiliza para aislar el elemento a determinar, en la EAA de extractos orgánicos aparecen importantes peculiaridades conectadas con las diferentes viscosidades de los solventes

orgánicos en comparación con la del agua, su combustibilidad, y con los cambios en el mecanismo del proceso en la llama.

La ventaja de tales métodos en comparación con la determinación del elemento en soluciones acuosas es que el límite de detección es más bajo, lográndose análisis más sencillos y exactos. Se evitan operaciones tales como la evaporación de los extractos y re-extracciones, lo que conduce a una disminución en la corrección para el experimento en blanco. En todos los casos, los blancos y los patrones deben tratarse de la misma manera que las muestras.

En cuanto a la leche se refiere, el sistema APDC/MIBC se ha empleado en la preconcentración de Fe, Cu y Mn. El dietilditiocarbamato de amonio en MIBC ha sido utilizado en la preconcentración de Co, y el sistema mixto APDC-DCCA/MIBC en la de Ni. El dietilditiocarbamato sódico en MIBC ha sido empleado en la preconcentración de Mn (22, 46, 47).

La mayor parte de los elementos traza forman quelatos con APDC, con más facilidad que el mismo Mn, por lo que para efectuar su determinación en leche resulta necesario realizar una extracción previa a pH 2 con APDC/MIBC. A continuación se lleva a la fase acuosa a pH 4 y se determina en ella el Mn. Resulta preciso llevar a cabo dos extracciones con APDC/MIBC con un periodo de agitación de 1 minuto cada una. Estas dos extracciones no pueden reemplazarse por una sola extracción con un periodo de agitación más largo, ya que la prolongación del tiempo de agitación influye, originando la destrucción del complejo.

El pH óptimo para la extracción, en la determinación de Mn con dietilditiocarbamato de sodio es de 6.5. Antila, en la determinación de Mn en leche trabaja a un pH de 6.2, en este caso se requiere un periodo de agitación mayor para la extracción de Mn de la solución obtenida, tras la mineralización de la leche, que cuando se emplea APDC.

Tsutsumi extrae el Cu en forma de yoduro en MIBC antes de su determinación en leche. Silva ha utilizado con este mismo fin la tiosemicarbazona de la 1,2-naftoquinona.

Baetz y Kenner concentran Cu, Co, Mn, Ni y Zn utilizando una columna de intercambio iónico, eluyendo con  $H_2SO_4$  2N y llevando a cabo la determinación de estos por EAA.

## DETERMINACIONES

### I ELEMENTOS ESENCIALES

#### CALCIO

No hay un acuerdo acerca de cual es el mejor procedimiento para conseguir una adecuada mineralización de la leche cuando va a determinarse su contenido en Ca (17, 39, 40, 49 y 61). La evaporación a sequedad y posterior incineración exige una cuidadosa vigilancia del proceso de la temperatura, que no puede pasar de 500°C porque puede haber pérdida del elemento por volatilización (41). La vía húmeda con mezclas de  $\text{HNO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ó  $\text{HClO}_4$  no está exenta de riesgo, por lo que se sugiere el uso de ácido tricloroacético; el filtrado obtenido después del tratamiento de la muestra con dicho ácido, y separado el precipitado, es un líquido completamente claro, exento de proteínas y de grasa, que se puede introducir al espectrofotómetro sin temor a obstrucciones. Se ha comprobado que el ácido tricloroacético no interfiere en la determinación.

El anión fosfato interfiere seriamente, por formación de fosfatos insolubles (54); de esta forma, cuando aumenta la concentración de fosfatos, la absorbancia del Ca decrece. Para evitar esto se puede añadir La (III), que tiende a desplazar a los elementos alcalinotérreos de sus fosfatos, haciendo la absorbancia del Ca independiente de la cantidad de fosfato presente. Si no se cuenta con la solución de La (III), se puede usar flama de óxido nitroso - acetileno para el mismo fin.

De la Guardia (39) sugiere un procedimiento de dispersión directa, aplicable a la leche en polvo, en donde no es necesaria la digestión previa de la muestra.

Juárez (8) efectuó estudios en muestras de leche en polvo entera, leche esterilizada (UHT) y leche descremada, con ensayos de recuperación, adicionando a una serie de alícuotas de la misma muestra, cantidades conocidas del elemento a analizar, con objeto de comprobar la influencia de la matriz, para evitar en lo posible las interferencias. Preparó disoluciones patrón que contenían también Na, K y Mg, que acompañan al Ca en la leche.

Mohite (45) realizó una extracción con solvente para determinar Ca en leche de vaca, con objeto de separarlo de otros iones alcalinos y alcalinotérreos. La extracción se lleva a cabo con 18-Crown-6 0.01M en ácido pícrico 0.01M y a pH 3.0-9.0. El método es simple, rápido, selectivo y puede aplicarse a la muestra para posteriormente emplear EAA. Se pueden separar y determinar concentraciones mínimas de Ca de hasta 5 mcg/ml.

Mediante el uso de horno de grafito, pueden determinarse concentraciones de Ca de aproximadamente 20 pg.

Masami (53) realiza la determinación de Ca por EAA valiéndose de atomización electrotérmica en microtubos de molibdeno. Este atomizador metálico requiere de un período de calentamiento corto para proveer una temperatura uniforme en todo el atomizador. La máxima concentración de la nube de átomos se logra en un periodo de tiempo extremadamente corto, en contraste con los atomizadores convencionales de carbón (83).

La FAO y la OMS establecen un contenido mínimo de Ca en leche de 50.0 mg/100 Kcal.

## COBRE

La vía seca se considera la forma de digestión más adecuada para la determinación de Cu en muestras de leche por EAA (23, 24, 61 y 80).

La temperatura debe ser siempre inferior a 500°C para evitar pérdidas por volatilización.

La leche de casi todos los animales tiene un bajo contenido en Cu; en la de vaca la concentración de dicho elemento tiene un valor promedio de 10 mcg/100 ml y en la humana es de 30 mcg/ml. Por lo tanto, de acuerdo a la cantidad de muestra usada, puede ser necesario realizar un trabajo previo de concentración del elemento.

Saito (19) determina Cu mediante EAA, previa digestión húmeda de la muestra. Esta, en cantidad de 1 a 3 g, se digiere con mezcla de  $\text{HNO}_3$  -  $\text{H}_2\text{SO}_4$  -  $\text{HClO}_4$  en un tubo de centrifuga unido a un tubo de vidrio recto que previene la pérdida de  $\text{HNO}_3$  por volatilización. Después de la digestión se añaden yoduro de potasio,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y MIBC para extraer el metal en forma de yoduro con MIBC. La solución de MIBC se inyecta y el metal es determinado por EAA de flama con el método de Zeeman. Las recuperaciones de muestras de leche tratadas mediante este método son satisfactorias, siendo los límites de cuantificación 0.02 ppm. Este método es simple y seguro para análisis de rutina en la determinación de altos niveles de Cu.

Los valores mínimos de concentración de Cu en leche, según la FAO y la OMS, son de 60 mcg/100kcal.

## HIERRO

Al igual que los demás oligoelementos de la leche, la digestión de la muestra se realiza preferentemente por vía seca, cuidando de que la temperatura sea menor a 500°C para prevenir pérdidas por volatilización (23, 24 y 40), resultando ser éste el mejor método. Aunque no se descarta por completo la vía húmeda.

A pesar de que la concentración de hierro en la leche no es grande, generalmente se puede realizar su determinación en forma directa, sin necesitar una preconcentración previa.

Según la FAO y la OMS, la leche debe tener una concentración mínima de Fe de 0.15 mg/100kcal.

## MAGNESIO

El Analytical Methods Committee of the Society for Analytical Chemistry, así como la Association of Official Agricultural Chemists, recomiendan la digestión por vía seca para la determinación de Mg en alimentos (31).

Osada y Goto determinan Mg, previa destrucción de la materia orgánica a 550°C, disolución de las cenizas en HCl y eliminación de interferencias de aluminio y sílice mediante adición de estroncio a la muestra.

Otro elemento usado para evitar interferencias en la determinación de Mg es el La (III), en forma de  $\text{LaCl}_3$  ó  $\text{La}_2\text{O}_3$ .

Lambert concluyó de sus estudios que la eliminación de silicio no era necesaria. Ensayó diferentes reactivos para la disolución de las cenizas y encontró que el  $\text{HNO}_3$  (1:1) daba tan buenos resultados como tres digestiones con HCl (1:1); demostró además que en determinación de Mg no existen pérdidas por calcinación a temperaturas de 430, 530 y 620°C.

Knaver realizó estudios para encontrar los parámetros óptimos en la digestión de la muestra y determinó los siguientes:

Peso de muestra -0.2 g

Temperatura de calcinación -535-620°C

Tiempo necesario para la oxidación -8 horas.

De la Guardia (39) describe un procedimiento de dispersión directa, aplicable a la leche en polvo, en el cual no es necesaria la digestión previa. Pesa 0.1 g de leche y añade 10 ml de solución de  $\text{La}_2\text{O}_3$  al 4% m/v; la mezcla se dispersa en agua a un volumen total de 100 ml. La muestra puede introducirse directamente en una flama aire-acetileno. Para obtener una mejor dispersión de la leche en el agua y garantizar la estabilidad durante el ensayo se puede añadir un surfactante a la mezcla, que no contenga Mg en su formulación; aunque los estudios comparativos demostraron que no hubo diferencia significativa entre los resultados obtenidos con y sin adición del surfactante. Los valores están de acuerdo a los de las muestras procedentes de la International Atomic Energy Agency.

La FAO y la OMS establecen un contenido mínimo de Mg en la leche de 6 mg/100kcal.

### POTASIO

El método más usado para la digestión de muestras de leche, previa a la determinación de K por EAA, es la vía seca (17, 49 y 61).

Las interferencias por otros iones pueden eliminarse si se añade a las muestras La (III).

La FAO y la OMS establecen los valores mínimos y máximos de K en leche como 20 mg/100kcal y 60 mg/100kcal respectivamente.

### SODIO

La literatura reporta que el método más usado para la digestión de las muestras de leche, en la determinación de Na por EAA, es la vía seca (17, 39, 49 y 61).

Para prevenir interferencias provocadas por otros iones, a las muestras se les añade solución de La (III) ( $\text{La}_2\text{O}_3$ ,  $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ ,  $\text{LaCl}_3$ ).

Se puede hacer una determinación en la muestra, rápidamente, sin previa digestión, añadiendo solución de La (III) a leche en polvo y dispersando a ésta en agua (39).

La cantidad mínima de Na que puede contener la leche, según la FAO y la OMS, es de 20 mg/100kcal. La cantidad máxima es de 60 mg/100kcal.

## ZINC

Para la determinación de este elemento en leche por EAA, se recomienda la digestión de la muestra tanto por vía seca como por vía húmeda (24). Esta última se lleva a cabo en tres formas: con mezcla sulfo-nítrica a presión atmosférica, con mezcla sulfo-nítrica en reactor a presión y la última, con ácido tricloroacético. Al realizar pruebas de recuperación en las condiciones anteriormente expuestas, se observa un mayor porcentaje de recuperación en la digestión por vía seca.

Las muestras incineradas en mufla no deben alcanzar una temperatura mayor a 500°C, pues se producirían pérdidas por volatilización.

El Zn es el oligoelemento que se encuentra en mayor proporción en la leche, por lo tanto, debe tenerse en cuenta la necesidad de realizar una dilución de la muestra (23).

La FAO y la OMS proponen un contenido mínimo de Zn en la leche de 0.5 mg/100kcal.

De Ruig (61) determinó el contenido de los minerales Ca, Cu, Fe, Mg, K, Na y Zn en leche, deduciendo la siguiente fórmula para encontrar la concentración de cada uno de estos elementos:

$$\text{Elemento (mg/kg)} = c/m \times 100$$

En donde: c = concentración, en mcg/ml, del elemento en la solución de prueba final.

m= Masa, en la muestra, presente en 100 ml de solución de prueba final.

Los resultados se expresan en mg/kg de masa seca.

## II ELEMENTOS TOXICOS

### ARSENICO

Según la literatura, tanto la digestión por vía seca como la digestión por vía húmeda, son apropiadas para la determinación de As mediante EAA (4, 13, 37, 44, 52 y 56).

Su cuantificación es difícil por EAA con el método de flama convencional, debido a la absorción extremadamente alta, de los gases de la flama, a longitudes de onda menores a 200 nm, en donde se localizan las líneas de resonancia más sensibles del As. Además, pueden ocurrir interferencias químicas cuando se usan flamas más frías; otra inconveniencia es que el As fácilmente da lugar a la aparición de formas moleculares, lo cual disminuye la sensibilidad. Aunque el uso de flamas de óxido nitroso - acetileno, por separado, supera muchas interferencias, la sensibilidad permanece pobre.

El análisis directo de las muestras no es posible debido a la presencia de sodio, potasio y sulfatos.

Dabeka (44) desarrolló un método para cuantificar As total en leche por medio de EAA con horno de grafito, el cual tiene varias ventajas sobre otros. La cantidad de muestra es 1g y se digiere por calcinación añadiendo  $\text{HNO}_3$  y  $\text{MgO}$ , calentando a una temperatura de  $500^\circ\text{C}$ . Después de disolver en  $\text{HCl}$ , el As es reducido con yodo y ácido ascórbico y precipitado con APDC en presencia de níquel. El precipitado se recolecta en filtros de acetato de celulosa y se disuelve en  $\text{HNO}_3$  al 10% que contiene  $\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$  para remover las interferencias por sulfato, los cuales resultan de la descomposición del APDC. El límite de detección es de 10 ng.

Para incrementar el rango de aplicabilidad, se han propuesto otros atomizadores, tales como las celdas de absorción de tubo largo, con flamas de argón, helio o nitrógeno/aire-hidrógeno. Estos sistemas incrementan la sensibilidad, pero sufren de múltiples interferencias. Además, el efecto del estado de valencia del As puede provocar problemas en su determinación. Para evitar estas dificultades, ha sido ampliamente usada la técnica de conversión del As a arsina, introduciéndolo a una flama de argón-hidrógeno. De esta forma se eliminan muchas interferencias y los límites de detección se mejoran, aunque la absorción de fondo sigue siendo un problema.

Holak (13) describe un sistema cerrado para digerir las muestras, aplicando posteriormente la EAA con generación de hidruro. El sistema de descomposición en vasos de teflón bajo presión tiene la ventaja de prevenir la pérdida de elementos volátiles; además, el teflón está libre de contaminación.

Tam (4) utiliza también la generación de hidruro. Digiere la muestra por vía seca en presencia de  $Mg(NO_3)_2$  -  $MgO$  y disuelve con  $HCl$ . El arsenato es reducido a arsenito por tratamiento con yoduro de potasio. El hidruro de arsénico se genera por la adición de  $NaBH_4$  y es arrastrado hacia el horno por medio de nitrógeno e hidrógeno. Los límites de detección son de 5 ppb en una muestra de 10g.

## CADMIO

El Analytical Methods Subcommittee recomienda la digestión húmeda de la muestra usando ácido sulfúrico y peróxido de hidrógeno. La incineración puede resultar en bajas recuperaciones, debido a que el  $Cd$  es volátil a temperaturas mayores de  $500^\circ C$  (60).

Como el metal se encuentra en la leche en pequeñas cantidades, normalmente es necesario efectuar una preconcentración del elemento antes de determinarlo. Para ello se puede formar el ión yodocadmatato, extrayendo el digerido con yoduro de potasio y una resina intercambiadora de iones. También puede concentrarse mediante el uso de un sistema complejo-solvente, usando para ello tetrametilenditiocarbamato de amonio y MIBC.

Baetz (62) también usa una resina de intercambio iónico para determinar bajas concentraciones de  $Cd$ . Para digerir utiliza el método de la Association of Official Agricultural Chemists, digestión húmeda catalizada por  $V_2O_5$ . La resina es Chelex - 100 (Dowex A-1), un iminodiacetato que tiene una alta afinidad por el  $Cd$ ; esta propiedad la hace inigualablemente apropiada para análisis de trazas, puesto que el  $Cd$  forma un quelato con el iminodiacetato, mientras que los iones monovalentes no lo forman y se retienen en la resina. El método tiene un límite de detección de 10 ppb.

En la determinación de  $Cd$  se usa la EAA tanto de flama como de horno de grafito. Cuando se usa la primera, el empleo de una flama aire-acetileno conduce a resultados muy exactos, pero las condiciones de trabajo deben ser cuidadosamente controladas. La EAA con horno de grafito permite determinar concentraciones de  $Cd$  de hasta 5 mcg/kg, pero las interferencias químicas, especialmente de sales de sodio, pueden provocar imprecisiones. No obstante, el uso de horno de grafito como atomizador es varias veces más sensible que los métodos de flama convencionales.

Barlow (5) realiza la determinación de  $Cd$  en leches mediante el horno de grafito. Utiliza digestión básica con Soluene 350, hidróxido de amonio cuaternario que se comporta como una base orgánica fuerte y es capaz de solubilizar muestras húmedas, convirtiéndolas en soluciones homogéneas. Es un método rápido y, debido a la mínima cantidad de manipulación involucrada, existe poco riesgo de

contaminar la muestra, que siempre es un problema serio en la medición de cantidades traza. Además, al no ser necesario calentar la muestra, la pérdida por volatilización es mínima. Los límites de detección son de 0 - 25 microgramos/l (mcg/l), usando muestras de 25 microlitros (mcl).

Los valores reportados internacionalmente para este elemento son 0.1 - 30.0 mcg/l leche.

## MERCURIO

El Hg es el único elemento metálico que se encuentra como líquido a temperatura ambiente. Tiene una presión de vapor de 0.0016 mbar a 20°C, correspondiendo a una concentración de aproximadamente 14 mg/m<sup>3</sup> en aire (29). Debido a estas propiedades únicas, el Hg puede ser determinado por EAA sin atomizador, simplemente reduciéndolo a la forma metálica y transfiriéndolo a la fase de vapor.

En vista de su alta volatilidad, la incineración en seco no es un método adecuado para la digestión de las muestras en donde se va a determinar este elemento. La digestión en vasos de teflón a alta presión puede conducir a variaciones erróneas en los valores del blanco, debido a pérdidas de trazas diminutas de Hg, las cuales están presentes algunas veces en la materia prima usada en la manufactura de los vasos.

Todos los autores coinciden en usar la digestión por vía húmeda como el método más seguro en la determinación de Hg. Deitz (59) sugiere para ello utilizar mezcla de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y HNO<sub>3</sub> en presencia de pentóxido de vanadio como catalizador y a temperatura no mayor de 140°C, con objeto de eliminar las pérdidas por volatilización.

Narasaki (16) describe una bomba de oxígeno adecuada para la digestión rápida de la leche en la determinación de Hg. En ella, 1g de muestra se enciende por medio de un alambre de níquel, después de que la bomba ha sido cargada con solución ácida de peroxodisulfato. La posterior determinación del Hg por EAA, permite detectar concentraciones del nivel ng/g.

La EAA, utilizando la técnica de "vapor frío" es la forma más conveniente para la cuantificación de Hg en muestras de alimentos (12). El procedimiento básico fue descrito por Hatch y Ott (64) y, aunque ha sido modificado, sigue siendo un método con muy alta sensibilidad y adecuada reproducibilidad; además pueden hacerse adaptaciones para cuantificar por separado los compuestos de Hg inorgánicos y

orgánicos en la misma muestra (51, 57). Con esta técnica, Dumarey obtiene límites de detección de 5 ppb por 20 mg de muestra.

Existe una gran controversia en cuanto a la cantidad de Hg que puede encontrarse en la leche y los productos lácteos. Tölg efectuó estudios en leches en polvo y reportó valores que oscilan entre 0.5 y 136 mcg/kg, con un valor real presumible de 0.5 mcg/kg. En vista de estos bajos valores esperados, Koops (28), describe el uso de un aparato adaptable a un espectrofotómetro de absorción atómica convencional, que permite la determinación de Hg abajo del nivel de picogramos. El método está basado en la combustión o incineración de la muestra de leche; el Hg volátil es condensado en una cámara fría, desalojado con  $\text{HNO}_3$  caliente, reducido a Hg elemental y amalgamado con oro. Posteriormente, el Hg es liberado y medida su absorbancia.

Con el mismo fin de concentrar la muestra, se ha reportado en la literatura el uso de microcolumnas de cobre o de telas metálicas con aleaciones de oro y platino (2, 29 y 65). Los límites de detección que se alcanzan en estos casos se encuentran en el rango de 1 ng/l.

El método de EAA por vapor frío involucra la reducción del Hg iónico al estado elemental por medio de reactivos químicos. Para tal efecto son usados  $\text{SnCl}_2$ ,  $\text{NaBH}_4$  y  $\text{NaH}_2\text{PO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (29, 43, 50 y 63).

Magos (51) determina Hg total, tanto orgánico como inorgánico. El método se basa en la rápida conversión de los compuestos organomercuriales primero en Hg inorgánico y después en Hg atómico por la acción del reactivo combinado cloruro de estaño II-cloruro de cadmio. Se estima que si sólo se añade  $\text{SnCl}_2$  únicamente se libera el Hg inorgánico, de tal forma que éste puede determinarse en forma selectiva aún en presencia de metil mercurio. Al añadir la mezcla  $\text{SnCl}_2 - \text{CdCl}_2$  y re-acidificar la muestra, puede determinarse el Hg total. La diferencia entre Hg total y Hg inorgánico proporciona el contenido de metil mercurio de la muestra.

Fillippelli (42) cuantifica Hg por medio de EAA con horno de grafito, especialmente para conocer la concentración de la especie metil mercurio. Obtiene límites de detección en el rango de 0.04 ng de Hg en muestras de 20 ml.

## PLOMO

Para la digestión de las muestras, cuando se va a usar la EAA, en el análisis de este elemento, se recomiendan tanto la vía seca como la vía húmeda. En esta última debe tenerse cuidado con el uso del  $H_2SO_4$ , pues puede conducir a bajas recuperaciones debido a la formación de sulfatos insolubles.

La recuperación usando la vía seca es buena si se mantiene la temperatura alrededor de  $500^\circ C$ . A  $550^\circ C$  existen posibles pérdidas del elemento.

Debido a la amplia distribución del Pb, deben extremarse las precauciones con todos los utensilios de vidrio empleados, limpiándolos con  $HNO_3$  (1:1) (58), y usar solamente reactivos libres de plomo.

Pueden ocurrir efectos de matriz, pero estos son superados si se realiza una separación preliminar del Pb en el digerido o la ceniza, por medio de una extracción. En (1), se sugiere una destrucción de la materia orgánica por oxidación húmeda en presencia de  $H_2SO_4$ ; el Pb es acomplejado con un reactivo orgánico (APDC o ditizona), y extraído el complejo con un solvente también orgánico (MIBC), que puede ser aspirado en la flama. De esta forma se determinan cantidades del orden de ppm.

Sulek (7) realiza también el procedimiento de complejación - extracción con solvente, pero utiliza la incineración de la muestra, al igual que Fiorino.

Walker (10) realizó estudios en varios tipos de leches, incluyendo la materna y fórmulas para infantes. Determinó valores medios mínimos de 0.05 mcg/ml.

Koops (11) determina Pb en leche evaporada mediante EAA sin flama. Las muestras de 300 ml se diluyen con una solución de nitrato de amonio y se inyectan, por medio de un sistema de automuestreo, a un tubo de grafito recubierto de zirconio. Este método es rápido y además evita el pretratamiento de la muestra.

Dabeka (21, 30) reporta los resultados obtenidos en la cuantificación de Pb mediante EAA en su modalidad de horno de grafito. Ensayó un método rápido, aplicable especialmente en leches enlatadas y fórmulas infantiles. Un ml de leche concentrada o 2 ml de leche normal se digieren a  $60^\circ C$  con 1 ml de  $HNO_3$  concentrado en tubos de ensayo de poliestireno, se diluye a 10 ml y se analiza. El límite de detección con este método se establece en 29 ppb. También emplea el método de complejación - extracción con el sistema MIBC - APDC, en leche descremada, con un límite de detección de 2 ppb (37).

Barnett (26) efectuó estudios en leche humana. Realiza una digestión ácida de la muestra, seguida de una extracción con ditizona. El Pb es posteriormente cuantificado por EAA con atomización electro térmica.

Los valores de Pb en leche, reportados internacionalmente, son de 1.0 - 97.0 mcg/l.

### CAPITULO III

## ***RECOMENDACIONES***

Los procedimientos analíticos realizados sin separaciones previas sólo pueden ser útiles cuando las señales debidas a los elementos a determinar no son interferidas por otros elementos o por la matriz, o cuando pueden efectuarse correcciones apropiadas para dar cuenta de las interferencias.

Los problemas metodológicos y experimentales significativos y las dificultades planteadas en el análisis de trazas provienen primordialmente del hecho de que los niveles de metales pesados en alimentos son bajos, típicamente entre 1.000 y 0.001 ppb. Debido a lo anterior es imprescindible la interpretación acertada de los resultados obtenidos.

Para que la investigación sea digna de confianza, lo más apropiado es tratar de eliminar definitivamente los errores sistemáticos que se presentan durante la etapa de preparación de la muestra y particularmente en el pretratamiento químico de ésta. La etapa de medida puede también en alguna extensión ser afectada. Deben asimismo adoptarse precauciones especiales durante el almacenamiento de la muestra. En otras palabras, la exactitud constituye el principal problema, mientras que los notables desarrollos instrumentales en química analítica han conducido a variados métodos que satisfacen los requisitos exigidos de sensibilidad y precisión.

En procedimientos combinados de múltiples etapas, consistentes en descomposición de la muestra, separaciones y pasos de determinación, las fuentes de errores sistemáticos más importantes en estos sofisticados procedimientos son:

- a) Muestreo y almacenamiento de la muestra, incorrectos.
- b) Contaminación por vasijas, reactivos y partículas atmosféricas.
- c) Efectos de adsorción y desorción sobre la superficie de las vasijas.
- d) Volatilización de elementos, por ejemplo Hg, As y Cd.
- e) Efectos de matriz durante la excitación de señales analíticas en la etapa de determinación.
- f) Interferencias debidas a las señales de fondo y de otros componentes.
- g) Errores en calibración originados por el uso incorrecto de patrones, soluciones, patrones inestables y blancos.

No existe un medio fácil de reconocer y reducir los errores sistemáticos cuando no se dispone de patrones de referencia.

Los materiales de referencia en los cuales se conocen perfectamente los niveles de concentración de un elemento traza en particular, han probado ser extremadamente útiles para verificar la precisión del método analítico usado, ejerciendo de esta forma un adecuado control de calidad.

## TOMA DE LA MUESTRA

El requisito fundamental de esta operación es que la proporción del elemento de interés en la porción muestreada sea, dentro de los límites del error, la misma que en la muestra total. En lo que a la leche líquida se refiere, no se encuentran dificultades especiales en la obtención de muestras representativas. En leches en polvo debe prestarse una gran atención a la posible segregación de los componentes. La muestra, en general, debe ser homogénea.

## CONTAMINACION DE LAS MUESTRAS

En la determinación de componentes mayoritarios de la leche, el problema del blanco puede generalmente despreciarse. En análisis de trazas es generalmente fácil mantener el valor del blanco pequeño en relación con el contenido de la muestra. En análisis de ultratrazas, sin embargo, el valor del blanco es a menudo comparable con la cantidad total presente en la muestra, y una incertidumbre en el valor del blanco se refleja directamente en el resultado analítico.

La contaminación se debe principalmente a los reactivos, material analítico empleado y polvo atmosférico, que por ejemplo, puede contener Zn, Fe, Pb o Hg. entre otros elementos.

Las impurezas de los reactivos capaces de interferir en la medida analítica final deben ser tan bajas que den valores de blancos inferiores al 10% del nivel del analito en la muestra tomada. Con este fin, las casas comerciales actualmente suministran reactivos de elevada pureza.

Para evitar valores elevados en los blancos, es necesario utilizar materiales muy puros tales como cuarzo o polipropileno en los recipientes, y se debe evitar en lo posible el vidrio, un material muy impuro con unos cuantos componentes principales y un gran número de elementos como impurezas en el rango de mcg/g. Las superficies de las vasijas deben limpiarse muy cuidadosamente usando técnicas especiales tales como lavados con ácidos muy puros durante varias horas. El enjuague con ácidos o con agua destilada no es suficiente.

Una de las principales fuentes de variabilidad interlaboratorial en el análisis de elementos traza son los diferentes métodos de tratamiento de la muestra. Las discrepancias son atribuidas a la diferente naturaleza de las impurezas interferentes introducidas, las diferencias en pérdidas de los elementos más volátiles en los varios procesos de mineralización, y a las muy diferentes concentraciones del elemento bajo prueba en la solución final para análisis. Para minimizar la variabilidad de estas diferencias, es necesario controlar estrictamente el paso de mineralización.

Los métodos sensibles para la determinación exacta de bajas concentraciones de metales tóxicos en alimentos son importantes por dos razones:

Primera.- Si los niveles de absorción no específica de los elementos son desconocidas, es difícil identificar exactamente y cuantificar fuentes de contaminación.

Segunda.- Para leches que contienen concentraciones del elemento menores al límite de detección del método, el límite de detección, en vez de cero, es frecuentemente usado para los cálculos de ingesta diaria por razones de seguridad.

Consecuentemente, el uso de métodos insuficientemente sensibles pueden resultar en sobreestimaciones de la ingesta diaria.

La Espectrofotometría de Absorción Atómica es una técnica muy específica con pocas interferencias; no obstante, las que se presentan pueden caer dentro de alguna de las siguientes categorías:

- a) químicas,
- b) de ionización,
- c) de matriz,
- d) de emisión,
- e) espectrales y
- f) absorción no específica.

La leche posee una composición compleja, por ello es muy importante conocer el problema que puede presentarse en su análisis.

Las interferencias de matriz pueden provocar tanto la supresión como el aumento de las señales del analito. Ocurren cuando las características físicas (viscosidad, tensión superficial, etc.) de la muestra y el estándar difieren considerablemente. Esto puede pasar cuando la solución de muestra (como es el caso de la leche) contiene una alta concentración de sales disueltas o ácidas, cuando se utilizan diferentes solventes para preparar las soluciones de muestra y estándar, o cuando la muestra y las soluciones estándar se encuentran a temperaturas completamente diferentes.

Existen varias formas de compensar el efecto de interferencias por matriz y son las siguientes:

- a) Tratar de igualar la composición de la matriz de la muestra y el estándar, tanto como sea posible. Cualquier reactivo añadido a la muestra durante su preparación, debe también añadirse a los estándares.
- b) Diluir la solución de muestra hasta que el efecto de las sales disueltas o ácidos sea insignificante.
- c) Cuando se usen solventes orgánicos, las soluciones estándar y de muestra deben ser preparadas con el mismo solvente. Todas las soluciones deben estar a la misma temperatura antes de comenzar la determinación.
- d) Usar el método de adición estándar. Cuando las formas anteriores no han dado resultados positivos en el control de las interferencias por matriz, el uso de este método está perfectamente garantizado.

El método de adición estándar es una técnica muy usada que frecuentemente hace posible trabajar en presencia de un interferente, y, aún así, permite una determinación exacta de la concentración del analito.

Para emplear este método, se usa la siguiente metodología: se preparan tres alícuotas de la muestra. Se diluye la primera a un volumen conocido con solvente. Llevar las segunda y tercera alícuotas al mismo volumen con cantidades adecuadas de estándares conocidos, añadidas de tal forma que las soluciones finales contengan diferentes cantidades, conocidas, del metal que va a determinarse. Se lee la absorbancia para cada solución, regulando la escala si es necesario para mejorar la calidad de la lectura. Graficar las lecturas de absorbancia obtenidas contra las concentraciones añadidas. Extrapolar la línea recta resultante, continuando hasta la absorbancia cero. La intersección con el eje de la concentración proporciona la concentración del metal en la solución de muestra diluida.

Para una determinación exacta por el método de adiciones estándar, la curva de trabajo debe ser lineal por sobre el rango de concentraciones cubierto por la muestra más las adiciones. Las adiciones deberán ser de aproximadamente la misma concentración esperada en la solución de muestra diluida.

En los siguientes cuadros se reúnen los parámetros instrumentales en la determinación analítica de los diferentes elementos minerales presentes en la leche.

Elemento	Peso Atómico	Método de Mineralización más apropiado	Interferencias	Forma de eliminar Interferencias
Ca	40.08	Vía seca - a menos de 500 °C Vía húmeda - con ácido tricloroacético	-Aniones fosfato -Na, K, Mg.	-Añadiendo La (III) -Usando flama óxido-nitroso/acetileno. -Preparando patrones que contengan Na, K y Mg.
Cu	63.54	Vía seca - a menos de 500°C		
Fe	55.85	Vía seca - a menos de 500°C		
Mg	24.32	Vía seca - 430°C - 620°C	-aluminio -sílica	-Añadiendo LaCl <sub>3</sub> , La <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ó Sr.
K	39.1	Vía seca		-Añadiendo La (III)
Na	22.99	Vía seca		-Añadiendo La <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , La(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ó LaCl <sub>3</sub>
Zn	65.38	Vía seca - a menos de 500°C Vía húmeda - H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> / HNO <sub>3</sub> - Acido tricloroacético		

Elemento	Longitud de Onda (nm)	Abertura de rendija (nm)	Mezcla de Gases (*)	Altura de Mechero (cm)	Lámpara (**)	Flama (***)	Límite de Detección (mg/kg)	Bibliografía
Ca	422.7	0.7 - 2.0	A/Ac ON/Ac	1	HCL	R	100	17, 39, 40, 41, 49 y 61
Cu	324.7	0.7	A/Ac		HCL	O	10	19, 23, 24 y 61
Fe	248.3	0.2	A/Ac		HCL	O (azul)	10 - 200	23, 24 y 40
Mg	285.2	0.7	A/Ac	0.6	HCL	O (azul)	100	17, 24, 39, 40, 49 y 61
K	766	2	A/Ac	0.8	HCL	O (azul)	1000	17, 39, 40, 49 y 61
Na	539.6	0.7	A/Ac	0.8	HCL	O (azul)	1000	17, 39, 40, 49 y 61
Zn	213.8	0.7	A/Ac		HCL	O (azul)	10	13, 23, 24, 40, 61 y 79

(\*) A= aire; Ac= acetileno; ON= óxido nítrico.  
(\*\*) HCL= lámpara de cátodo hueco.  
(\*\*\*) R= reductora; O= oxidante.

<b>Elemento</b>	<b>Peso Atómico</b>	<b>Método de Mineralización más apropiado</b>	<b>Interferencias</b>	<b>Método de EAA Más Utilizado</b>	<b>Bibliografía</b>
As	74.92	Vía seca Vía húmeda	-De naturaleza química (*) -Por iones sulfato, Na y K	Generación de hidruro	4, 13, 37, 44, 52 y 56
Cd	112.4	Vía húmeda - H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> / H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-Sales de Na	Horno de grafito	5, 13, 19, 37, 60 y 62
Hg	200.59	Vía húmeda - H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> - HNO <sub>3</sub> / H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> A temperatura no mayor de 140°C	-Na, K, Ca y P	Vapor frío	12, 16, 28, 29, 42, 43, 50, 51, 57, 59, 63, 64, 65 y 66
Pb	207.19	Vía seca - 500° - 550°C Vía húmeda - usando poco H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-De matriz	Horno de grafito	1, 7, 10, 11, 21, 26, 30, 33, 37 y 58
(*) cuando se usan flamas más frías.					

<i>Elemento</i>	<i>Longitud de Onda (nm)</i>	<i>Abertura de rendija (nm)</i>	<i>Lámpara (*)</i>	<i>Mezcla de Gases (**)</i>	<i>Límite de Detección Según el Método Usado</i>
As	193.7	0.7	HCL EDL	ON/Ac Ar/H A/Ac	-Horno de grafito 10 ng -Generación de hidruro 5 ppb
Cd	228.8	0.7	HCL EDL	A/Ac	-De flama 10 ppb -Horno de grafito 5 mcg/kg
Hg	253.7	0.7	HCL	A/Ac	-Vapor frío 2 ppb -Horno de grafito 0.04 ng/20 mcl
Pb	283	0.7	HCL EDL	A/Ac	-De flama 0.05 mcg/ml -Horno de grafito 2 ppb
<p>(*) HCL= lámpara de cátodo hueco. EDL= lámpara de electrodo de descarga. (**) A= aire; Ac= acetileno; Ar= argón; H=hidrógeno; ON= óxido nitroso.</p>					

**BIBLIOGRAFIA**

- 1) Analytical Methods Committee; *Analyst*; 100, 899 - 902 (1975).
- 2) Dogan, S.; *Anal. Chim. Acta*; 84, 89 - 96 (1976).
- 3) Juárez; *M. Alimentaria*; 138, 15 - 23 (1982).
- 4) Tam and Lacroix; *J. Assoc. Off. Anal. Chem*; 65 (3), 647 - 650 (1982).
- 5) Barlow; P. J.; *J. Dairy Research*; 44, 377 - 381 (1977).
- 6) Bermejo Barrera, P.; *Anal. Bromatol*; 33, 41 - 46 (1980).
- 7) Sulek et al.; *J. Assoc. Off. Anal. Chem*; 61 (4), 931 - 936 (1978).
- 8) Juárez, M.; *Anal. Bromatol*; 30, 13 - 20 (1978).
- 9) Jiménez, A. M.; *Alimentaria*; 152, 107 - 110 (1984).
- 10) Bailus Walker; *J. Food Protection*; 43, 178 - 179 (1980).
- 11) Koops, J.; *Neth. Milk Dairy J.*; 34, 31 - 41 (1980).
- 12) Dumarey, R.; *Anal. Chim. Acta*; 118, 381 - 383 (1980).
- 13) Holak Walter; *J. Assoc. Off. Anal. Chem*; 63 (3), 485 - 495 (1980).
- 14) Coles, L. E.; *Euro Food Chem*; 1, 225 - 230 (1986).
- 15) Skurikhin, Igor M.; *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*; 72 (2), 294 - 297 (1989).
- 16) Hisatake Nasaraki; *Anal. Chim. Acta*; 125, 187 - 191 (1981).
- 17) García Olmedo, R.; *Anal. Bromatol*; 33, 1 - 9 (1981).
- 18) Biddle, G.; *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*; 65 (4), 947 - 951 (1982).
- 19) Saito et al.; *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*; 71 (4), 829 - 831 (1986).
- 20) Dehairs, G.; *Analisis*; 10 (8), 373 - 376 (1982).
- 21) Dabeka, Robert W.; *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*; 65 (4), 1005 - 1009 (1982).
- 22) Greenburg, Robert R.; *Anal. Chem.*; 58 (12), 2511 - 2515 (1986).
- 23) García Olmedo, R.; *Anal. Bromatol*; 33, 77 - 83 (1981).
- 24) García Olmedo, R.; *Anal. Bromatol*; 37, 43 - 52 (1986).
- 25) Skurikhin, Igor M.; *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*; 72 (2), 286 - 289 (1989).
- 26) Barnett, N. W.; *Anal. Chim. Acta*; 149, 115 - 121 (1983).
- 27) Navas, M. J.; *Alimentaria*; 153, 31 - 39 (1984).
- 28) Koops, J.; *Neth. Milk Dairy J.*; 38, 223 - 239 (1984).
- 29) Welz, Bernhard; *Atomic Spectroscopy*; 5 (2), 37 - 42 (1984).
- 30) Dabeka, Robert W.; *Analyst*; 109, 1259 - 1263 (1984).
- 31) Basadre, I.; *Anal. Bromatol*; 37, 287 - 293 (1984).
- 32) Analytical Methods Committee; *Analyst*; 85, 643 - 656 (1960).

- 33) Andersen, Jan.; *Analyst*; 110, 108 - 109 (1985).
- 34) Louie et al.; *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*; 68 (3), 891 - 892 (1985).
- 35) Skurikhin, Igor M.; *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*; 72 (2), 290 - 293 (1989).
- 36) Herrador, M. A.; *Alimentaria*; 154, 21 - 26 (1984).
- 37) Dabeka, Robert W.; *Canadian Journal of Spectroscopy*; 31 (2), 44 - 52 (1982).
- 38) Fernández, M. R.; *Alimentaria*; 175, 33 - 34 (1986).
- 39) De la Guardia, Miguel; *Analyst*; III, 1375 - 1377 (1986).
- 40) Alvarez Marante, R.; *Alimentaria*; 176, 59 - 62 (1986).
- 41) García, E.; *Alimentaria*; 178, 31 - 33 (1986).
- 42) Fillipelli, Marco; *Anal. Chem.*; 59, 116 - 118 (1987).
- 43) Wigfield, Donald C.; *J. of Analytical Toxicology*; II, 137 - 139 (1987).
- 44) Dabeka, Robert W.; *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*; 70 (5), 866 - 870 (1987).
- 45) Mohite, Baburao S.; *Analyst*; 11, 191 - 194 (1987).
- 46) De Goeij, J. J. M.; *Anal. Chim. Acta*; 146, 161 - 169 (1983).
- 47) Tuinstra - Lauwaars et al.; *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*; 68 (6), 1235 - 1257 (1986).
- 48) De la Fuente Ramírez; *L. Alimentaria*; 186, 67 - 70 (1987).
- 49) Sherman, Jeffrey H.; *J. Agric. Food Chem.*; 36, 966 - 969 (1988).
- 50) El - Ahraf, Amer.; *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*; 64 (1), 9 - 13 (1981).
- 51) Magos, L.; *Analyst*; 96, 847 - 853 (1971).
- 52) Kamada, Toshihiko; *Talanta*; 23, 835 - 839 (1976).
- 53) Masami, Suzuki; *Talanta*; 28, 177 - 181 (1981).
- 54) Smets, Bruno; *Analyst*; 105, 482 - 490 (1980).
- 55) Mallol, Margarita; *Anal. Bromatol.*; 37 (2), 41 - 44 (1983).
- 56) Chakraborti, D.; *Anal. Chim. Acta*; 119, 331 - 340 (1980).
- 57) Wigfield, Donald C.; *Anal. Chim. Acta*; 167, 419 - 424 (1985).
- 58) Fiorino et al.; *J. of the AOAC*; 56 (5), 1246 - 1251 (1973).
- 59) Deitz et al.; *J. of the AOAC*; 56 (2), 378 - 382 (1973).
- 60) Cabanis et al.; *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*; 71 (3), 1033 - 1036 (1988).
- 61) De Ruig, Willem G.; *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*; 69 (6), 1009 - 1012 (1986).
- 62) Baetz, Richard A. and Kenner, Charles T.; *J. of the AOAC*; 57 (1), 14 - 17 (1974).
- 63) Hoggins, Frank E. and Brooks, Robert R.; *J. of the AOAC*; 56 (6), 1306 - 1312 (1973).
- 64) Hatch, W. R. and Ott, W. L.; *Anal. Chem.*; 40, 2085 - 2091 (1968).
- 65) Dogan, S. and Haerdi, W.; *Anal. Chim. Acta*; 76, 345 - 350 (1975).
- 66) Wimberley, J. W.; *Anal. Chim. Acta*; 76, 337 - 340 (1975).
- 67) Suddendorf, Ronald F.; *J. of the AOAC*; 64 (5), 1018 - 1025 (1981).
- 68) Crosby, N. T.; *Analyst*; 102, 961 - 964 (1977).

- 69) David, D. J.; Analyst; 85, 510 - 515 (1960).
- 70) Bajo, S. and Suter, V.; Anal. Chim. Acta; 149, 208 - 210 (1983).
- 71) Juárez, M. y Martínez, I.; Alimentaria; 19, 33 - 39 (1979).
- 72) Roshnick, R. K.; Analyst; 98, 405 - 411 (1973).
- 73) Komarek, J.; Talanta; 29, 110 - 121 (1982).
- 74) Farré Rovira, R.; Alimentaria; 146, 48 - 53 (1983).
- 75) Crosby, M. T.; Analyst; 102, 355 - 361 (1977).
- 76) Middleton, G. and Stuckey, R. E.; Analyst; 78, 608 - 619 (1953).
- 77) Mitchell, J. W.; Talanta; 29, 201 - 204 (1982).
- 78) Moody, J. R. and Beary, E. S.; Talanta; 29, 108 - 111 (1982).
- 79) Herrador, M. A.; Alimentaria; 169, 105 - 109 (1986).
- 80) Carmean, A. M.; Alimentaria; 169, 35 - 41 (1986).
- 81) Jiménez, A. M.; Alimentaria; 165, 63 - 67 (1985).
- 82) Navas, M. J.; Alimentaria; 158, 97 - 101 (1984).
- 83) Navas, M. J.; Jiménez, J. L.; Alimentaria; 159, 81 - 84 (1985).
- 84) Casarett and Doull's  
Toxicology  
The Basic Science of Poisons  
Second Edition  
Macmillan Publishing Co., Inc.  
New York 1980.
- 85) Casarett and Doull's  
Toxicology  
The Basic Science of Poisons  
Third Edition  
Macmillan Publishing Co., Inc.  
New York, 1986.
- 86) Alais Charles  
Ciencia de la Leche  
Segunda Edición  
Editorial Continental S. A.  
México, 1980.
- 87) Veissegre Roger  
Lactología Técnica  
Tercera Edición  
La Maison Rustique  
París, 1980.
- 88) Fairhall Lawrence T.  
Industrial Toxicology  
Second Edition  
The Williams and Wilkins Company  
Baltimore, 1957.