



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



378

EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA

# ELEMENTOS NUTRIENTES EN FORRAJES GANADEROS

## MONOGRAFIA MANCOMUNADA

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
INGENIERO QUIMICO  
P R E S E N T A N

FERNANDO ROLDAN MUÑOZ  
ALBERTO NORIEGA RODRIGUEZ  
LEOPOLDO DIAZ TOLEDO

MEXICO, D. F. 1982



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 esta 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.

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA**

**ELEMENTOS NUTRIENTES EN  
FORRAJES GANADEROS**

**MONOGRAFIA MANCOMUNADA**

**FERNANDO ROLDAN MUÑOZ**

**ALBERTO NORIEGA RODRIGUEZ**

**LEOPOLDO DIAZ TOLEDO**

**INGENIERO QUIMICO**

**1 9 8 1**

Jurado asignado originalmente  
según el tema

PRESIDENTE CARLOS ROMO MEDRANO

VOCAL JORGE ARTURO CAMPOS ROBLES

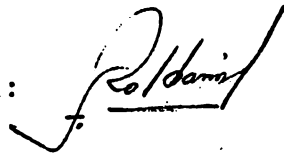
SECRETARIO PEDRO VILLANUEVA G.

1er. SUPLENTE ROBERTO CONTRERAS R.

2o. SUPLENTE BENIAMIN ORTIZ M.

Sitio donde se desarrolló el tema: BIBLIOTECA DE LA FACULTAD DE  
QUIMICA Y CENTRAL. CHAFINGO.

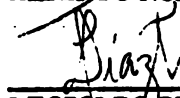
Nombre completo y firma de los sustentantes :



FERNANDO ROLDAN MUÑOZ



ALBERTO NORIEGA RODRIGUEZ



LEOPOLDO DIAZ TOLEDO

Nombre completo y firma del asesor del tema:



CARLOS ROMO MEDRANO

**A MIS PADRES**

**FERNANDO Y BEATRIZ**

**A MIS HERMANOS**

**ANTONIO, BETY, RAUL, ROBERTO,**

**LULU, ABUELITA TONA Y TIA LULU**

**A TODOS ELLOS, POR SU APOYO INCONDICIONAL**

**MI MAS SINCERA Y PROFUNDA GRATITUD.**

POR SU ORIENTACION, CONSEJOS Y AMISTAD DURANTE  
MIS ESTUDIOS,

QUIERO EXPRESAR MI ESPECIAL AGRADECIMIENTO A:

SRA. ANITA GARCIA ALVAREZ

C.P. JORGE DE GIVES

SR. LUIS GOMEZ GARCIA

SR. RAFAEL PEREZ ELIZALDE

ING. CARLOS ROMO MEDRANO

ING. GERARDO RODRIGUEZ ALONSO

A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.

A MIS MAESTROS, A MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS.

A MIS MAESTROS POR SU DIRECCION  
A MIS COMPAÑEROS POR SU APOYO

GRACIAS A TODOS.

A MI TIA ISABEL  
POR EL IMPULSO,  
Y LA COMPRESION  
QUE ME HA BRINDADO.

A MIS HERMANOS  
OSCAR E ISABEL  
CON CARINO.

A MI MADRE CON RESPETO Y CARINO

A HUMBERTO FRANCO  
JUAN MANUEL ARJONA  
ELBA ORTIZ  
CARLOS ROMO  
JAVIER TINOCO

A TODOS MIS AMIGOS  
Y HERMANOS:  
VICKY, JORGE, ADOLFO,  
GUILLERMO, OSCAR,  
FAFIS, MAYO, CARLOS,  
PEDRO, JAIMÉ,  
FERNANDO, MARGARITA  
Y TODOS AQUELLOS QUE AUNQUE  
NO ESTAN ESCRITOS  
SIEMPRE OCURREN A  
MI MENTE.

PARA TI: BEATRIZ

Y POR NUESTRA

HIJA NAYELLI.

POR TODO EL AMOR AL MUNDO.



# I N D I C E

<b>CAPITULO I</b>	
<b>INTRODUCCION.....</b>	<b>1</b>
<b>CAPITULO II</b>	
<b>GENERALIDADES.....</b>	<b>5</b>
<b>CAPITULO III</b>	
<b>ANALISIS DE LOS COMPONENTES</b>	
<b>ORGANICOS DE LOS FORRAJES.....</b>	<b>20</b>
<b>CAPITULO IV</b>	
<b>ANALISIS ESPECIALES DE LOS</b>	
<b>MACROELEMENTOS (Ca,Mg,P,K,Na,Cl,S).....</b>	<b>83</b>
<b>CAPITULO V</b>	
<b>ANALISIS ESPECIALES DE LOS</b>	
<b>METALES PESADOS.....</b>	<b>105</b>
<b>CAPITULO VI</b>	
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>126</b>
<b>CAPITULO VII</b>	
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>132</b>

## **I.) INTRODUCCION**

**El análisis de forrajes se puede realizar con distintas finalidades :**

**El fin primordial radica en lograr datos para una caracterización y valoración de los materiales nutritivos con fines prácticos. El análisis de los elementos nutrientes en los forrajes puede tener otro enfoque con el desarrollo de investigación científica, - por ejemplo, elaboración de nuevos métodos para componentes ya conocidos, el estudio de problemas de química bromatológica, o la realización de estudios especiales para trabajos científicos- en el campo de la Fisiología de la nutrición como en el descubrimiento de la materia orgánica de origen animal y vegetal, obligan a tener estos hechos en cuenta cuando se trate de realizar y valorar las sustancias nutritivas. Además de lo anterior hay que tener presente que el mayor rendimiento de los animales domésticos en la actualidad lleva consigo un aumento considerable en las exigencias alimenticias tanto cuantitativas como cualitativas.**

**Naturalmente que es imposible recoger todos los métodos químicos analíticos referentes a los forrajes que en todo el mundo se -**

elaboran o experimentan

En este trabajo están los métodos que se consideran buenos, -  
suficientes para fines prácticos

Los países industrializados son los que cuentan con centros de -  
investigación química, no obstante las compañías más importan-  
tes del orbe en alimentos balanceados cuentan con laboratorios-  
químicos modernos que van a la vanguardia en investigación, --  
asimismo lo son las Universidades que juegan un papel importan-  
te en investigación química como las de Europa y los Estados -  
Unidos.

La preparación y el estudio analítico de los forrajes se divide de  
acuerdo con el carácter de los alimentos y ajustándose a la cla-  
sificación de éstos, en dos grandes grupos: Los productos de -  
la propia empresa agropecuaria y los cultivados en la superficie  
de la tierra, en la cual se debe actuar de forma diferente que cuan-  
do se trata de análisis y valoración de forrajes comerciales. Es-  
tos últimos son aquellos que el ganadero compra y que en deter-  
minados casos proceden del mercado mundial a través del tráfico  
comercial. Como ambas clases de alimentos son igualmente ne-  
cesarias para la mayoría de las ramas de la industria agropecua-

ria, ambas serán tomadas en cuenta en las descripciones metodológicas que a continuación figuran.

Al observar el cuadro I, destaca la complejidad de las sustancias biológicamente importantes que se hallan en la materia orgánica. Se realiza una distribución por grupos de los componentes químicos de los alimentos del hombre y animales. Muchos de los componentes de forrajes entran regularmente en consideración para su valoración analítica y otros solamente en casos especiales.

**Sustancias con significación biológica.**

**Componentes de los alimentos y del cuerpo**

**Sustancias estructurales y energéticas del organismo vivo**

**A) Portadores de energía.**

Carbohidratos ( almidón, azúcar, celulosa, hemicelulosa, etc. ) , grasas, proteína en exceso.

**B) Sustancias estructurales**

**a ) Elementos plásticos.**

**1) Orgánicos: Proteína, aminoácidos esenciales, ácidos grasos esenciales.**

2) **Inorgánicos: Agua, compuestos de calcio, magnesio, fósforo, potasio, sodio, cloro, hierro y azufre**

b) **Biocatalizadores :**

1) **Biocatalizadores del organismo: fermentos y hormonas.**

2) **Biocatalizadores de la alimentación: Vitaminas, compuestos inorgánicos de los oligoelementos**

## II.) GENERALIDADES.

### 1) TOMA DE MUESTRA.

Todos los análisis que se llevan a cabo con un interés para la alimentación animal persiguen la finalidad de averiguar todo lo más exactamente posible los componentes determinantes del valor nutritivo de un alimento unico o de una mezcla. El análisis, como tal se lleva a cabo sobre una muestra relativamente pequeña, por consiguiente está claro que esta muestra debe representar una medida exacta de la masa total. La formación de dicha muestra media es la parte primera y más importante de todo el análisis. Errores en la toma de la muestra dan lugar a un cuadro falso sobre el contenido de principios nutritivos, a pesar de un análisis exacto y cuidadoso y sólo más tarde (caso de que tales errores sean descubiertos, lo que no siempre es seguro) pueden ser corregidos mediante una nueva toma de muestra y un nuevo análisis. Pero en muchos casos, no es posible la repetición de la toma de muestra y por lo tanto el error no puede ser reparado. Existen, por lo tanto, prescripciones exactas que han de ser llevadas a cabo en los almacenes y depósitos de

forrajes a los cuales hay que atenerse cuidadosamente incluso en sus detalles más mínimos. En el caso de los alimentos de la propia empresa agropecuaria (hierva, heno, ensilado, remolachas y similares) la consecuencia inmediata de una inadecuada toma de muestra es la obtención de un cuadro falso en cuanto al valor nutritivo de las disponibilidades de alimentos; en el caso de alimentos comerciales entran en juego, por otra parte, intereses económicos considerables. En este último caso, por lo tanto, son exigibles una buena preparación y un celo extraordinario del encargado de tomar muestras y atenerse siempre a las normas establecidas. Esto tiene especial interés cuando se trata de análisis de forrajes que hayan de servir como prueba ante las autoridades.

- 2) La toma de muestra en los alimentos de la propia explotación agrícola.

Para la toma de muestras de forrajes verdes directamente, del terreno y especialmente en el caso de hierba de prado, se recomiendan las siguientes medidas:

Tomar por escrito todos los datos importantes para la

caracterización de la muestra (día y hora de la toma - e indicación exacta de la superficie en cuestión o de - la parcela experimental en su caso). Deben anotarse los datos meteorológicos referentes al día de recogida la muestra, en caso de ser necesario incluso los del día anterior (o de la noche), por ejemplo, soleamiento, movimiento del aire, lluvia (datos de ella sobre si fué débil o copiosa y a ser posible la intensidad de la precipitación), la recogida de la muestra será de tal - manera que se arranquen con la mano pequeños mano - jos aislados en muchos puntos, distintos de la superfi - cie total. Todas estas pequeñas muestras se mezcla - rán y juntarán sinningún orden y tomando inmediatamen - te plantas aisladas de muchos puntos, se reunirán una o varias muestras medias para el análisis. Estas se lle - varán a analizar tan pronto sea posible a fin de que - pueda ser tratadas el mismo día. En caso de que el laboratorio esté situado tan lejos que las hayan de ser enviadas, se pesan inmediatamente después de la reco - gida varias porciones aisladas, un kilogramo de cada una, de tal modo que representen una media del mate



rial a analizar, se introducen en botes metálicos de cierre hermético, añadiéndose un poco de cloroformo, se cierra y se envían por la vía más rápida al laboratorio. Estas muestras, una vez pesadas, se someterán a una desecación previa para el análisis de los principios nutritivos brutos. Este método no es utilizable para la determinación de componentes lábilés de la hierba verde ( contenido vitamínico ).

En este caso no queda otro remedio que trasladar al campo el material de laboratorio e inmediatamente de la toma de muestra comenzar el proceso analítico llevándolo hasta una fase tal que no pueda tener ya lugar a ninguna variación en el contenido.

### 3) TOMA DE MUESTRAS EN FORRAJES COMERCIALES.

Consideramos como forrajes comerciales, en primer lugar, el heno y la paja, forrajera en bolsas prensadas. Una vez que se han recogido de diversas partes del depósito o almacén algunas bolsas en número de pendiente del tamaño del mismo, se abren y se toman muestras medias del interior. Estas a su vez se reúnen y se tratan del modo siguiente :

Al igual que al heno, no es fácil ya que en un almiar grande, incluso en productos cultivados uniformemente, pueden aparecer diferencias, si bien estas mucho menores el caso de las gramíneas que cuando se tratan de plantas forrajeras con mucha hoja (alfalfa, variedades de trébol y otras leguminosas y hortalizas) El desprendimiento de las finas hojitas hace variar fuertemente el contenido en principios nutritivos brutos de las capas superficiales del depósito de heno en contraposición de las capas inferiores. Se debe, portanto, tomar abundante muestra de toda la zona y capa del almacén de heno, muestras que por otra parte no deben ser ----- muy pequeñas, las cuales se mezclan cuidadosamente reduciéndose progresivamente la masa total resultante en capas sucesivas mediante nueva toma de muestra hasta que lleguen a obtener una muestra media final para el análisis. La masa de ésta muestra debe oscilar alrededor de los tres kilos.

#### 4) PREPARACION DE LAS MUESTRAS PARA EL ANALISIS.

La muestra media, que ha sido tomada según las normas anteriores, no es adecuada en la mayoría de los casos para el

análisis directo. Deben llevarse a cabo numerosas determinaciones independientes y cada una de ellas con dos o más análisis paralelos. Cada pesada tomada para determinación única debe ser totalmente homogénea y a su vez representar con la mayor exactitud una media de la muestra total. Esto es solamente posible cuando la muestra ha sido finamente molido y cuidadosamente mezclada.

La necesaria homogeneidad de la muestra analítica se logra del modo más sencillo y mejor desecándola con mayor cuidado, esto es, a la temperatura más baja posible y se le muele finamente en un molino de laboratorio, adecuado, de forma que todo el material atraviese en cedazo fino de 1 mm de malla.

Todas las determinaciones, por ejemplo, el análisis de los principios nutritivos brutos se pueden llevar a cabo con una sustancia así preparada. Para muchos forrajes que se presentan en forma compacta, remolachas enteras o partidas a la mitad heno largo y paja, gránulos, es frecuentemente imposible llevar a cabo una preparación directa para el análisis. Debe efectuarse un cierto troceado pre-

vio. Conviene, sin embargo, limitarlo tanto como sea posible y llevarlo a cabo solamente en los casos realmente imprescindibles, dado que siempre lleva en sí el peligro de transformaciones o modificaciones en los productos. Tal ~~tr~~oceado se consigue, por ejemplo, seccionando heno y paja en una pequeña picadora de laboratorio y cortando las remolachas y similares con el cuchillo. Esto se debe realizar en todos los casos sin pérdida de sustancia y evitando elevaciones de temperatura. La molienda de los cereales ocasiona en la mayoría de los casos una cierta deshidratación como consecuencia de la inevitable elevación térmica por rozamientos, no es por lo tanto recomendable y solo debe efectuarse -- después de un desecado previo de la muestra.

El desecado previo del material analítico, con el fin de molerlo finamente, se consigue del mejor modo en una estufa de desecación a una temperatura 60-70<sup>o</sup>. La aspiración lenta de aire fresco favorece la desecación rápida. En la mayoría de los casos en el análisis de forrajes interesa solamente la composición del residuo seco, pero también el contenido de la sustancia seca como tal. Para ello se debe pesar en fresco la muestra analítica en un recipiente apropiado, se

co y tarado con anterioridad a la desecación. La muestra permanece, según su contenido acuoso inicial, de 1 a 3 días en la estufa de desecación. Se deja a continuación todo el día al aire en una habitación seca y se pesa de nuevo. La pérdida de peso así hayada debe ser tenida en cuenta al calcular las cifras analíticas referentes al estado original del forraje. Seguidamente se muele la muestra. En la mayoría de los casos, para un producto bien desecado previamente, basta un molino de cuchillas relativamente barato y de trabajo rápido.

Para sustancias que son difíciles de triturar, materiales ricos en azúcar y grasa, entre otros, es necesario frecuentemente emplear molinos que trabajan con arreglo a sistemas esencialmente más caros, por ejemplo, el molino de martillos. Es muy difícil moler la totalidad de la muestra final hasta el grado necesario de finura, pero puede evitarse este inconveniente moliendo constantemente la totalidad de la muestra previamente desecada, mezclando luego cuidadosamente y formando, con especial cuidado, una nueva muestra más pequeña que se muele con un pequeño molino de análisis a fin de obtener la cantidad precisa para las pesadas, para las

cuales sea necesario efectuar. Tales molinos especiales para pequeñas cantidades son por ejemplo : el molino coloidal.

5) DETERMINACION DE LOS PRINCIPIO NUTRITIVOS BRUTOS.

La determinación del contenido en principios nutritivos brutos se basa en métodos que han sido elaborados en los Centros de Investigación de Europa y las Universidades Estatales de los Estados Unidos como ya se mencionó en la Introducción, son métodos modernos con pequeñas modificaciones, de los que en años atrás se han utilizado. Los métodos que aquí se mencionan han sido elaborados en las mejores Universidades de los Estados Unidos en análisis químicos agropecuarios que cuentan con modernos laboratorios y equipo de investigación, éstos centros son : University of Illinois, California Institute of Technology, University of Texas, Texas Agriculture y Mechanical, - University of Arizona, Institute of Investigación Cattle of Portland Oregon etc. por solo mencionar algunas.

El método de los principio nutritivos brutos determina los siguientes compuestos :

- 1 ) Residuo seco ( sustancia seca )
- 2 ) Proteína bruta ( materia nitrogenada total )

- 3 ) Ceniza bruta ( residuo de incineración )
- 4 ) Grasa bruta ( extracto etéreo )
- 5 ) Fibra bruta.

Un análisis completo proporciona todavía un componente posterior, las llamadas " Materias extractivas libres de nitrógeno ". Estas comprenden esencialmente los carbohidratos solubles y se calculan por diferencia al sustraer de la sustancia seca la suma de los componentes comprendidos entre B) y C). En las consideraciones que siguen se caracterizan de modo general y breve los principios nutritivos brutos que proporciona este método.

#### 6) SUSTANCIA SECA.

La determinación del residuo seco en el material analítico sirve únicamente para la determinación de la cantidad de sustancia seca presente en un forraje.

Por el contrario no es apropiado como medida exacta del contenido acuoso. Esto se debe a que durante la desecación, además del agua también se pierden otras sustancias volátiles, y además porque ciertas reacciones químicas que ocurren durante la desecación ocasionan variaciones de peso en parte con carácter positivo y otras con carácter negativo. La determinación totalmente exacta y precisa del contenido acuoso es frecuentemente un problema difícil que para ciertos productos todavía no está solucionado.

## 7) PROTEINA BRUTA.

Puesto que el nitrógeno representa en la mayoría de las sustancias proteicas un porcentaje relativamente constante, alrededor del 16%, la determinación del nitrógeno en forma orgánica sirve como medida del contenido protéico de forrajes; - pero como además se encuentran presentes en pequeñas cantidades otros compuestos nitrogenados de naturaleza no protéica, sólo puede designarse como proteína bruta el valor -- protéico calculado a partir del contenido total de nitrógeno. - para el análisis se utiliza, sin excepción, el método de ----- Kjeldahl. Se suponen ya conocidos tanto el fundamento del - análisis según Kjeldahl como los aparatos en el utilizados.

El valor de proteína bruta se obtiene multiplicando la cantidad de nitrógeno por ciento por 6.25. En casos especiales cuando existen tipos de proteína con contenidos de nitrógeno más bajos o más altos, o en presencia de grandes cantidades de materia nitrogenada no protéica (que contiene siempre una cantidad de nitrógeno mucho mayor que la proteína de tipo medio), se cometen ciertos errores por la utilización de ese simple cálculo y se deberían utilizar otros factores, sin-



sin embargo éste no es el caso en los análisis de forrajes. Aquí se utiliza siempre el factor de 6.25.

#### 8) CENIZAS BRUTAS.

Para la determinación de cenizas brutas se incinera el forraje. La determinación de cenizas brutas carece de significación para la apreciación de la sustancia mineral y permite como máximo una orientación sobre cantidades aproximadas. La combustión sirve más bien para la determinación del contenido en sustancia mineral y permite como máximo una orientación sobre cantidades aproximadas. La combustión sirve ~~más~~ bien para la determinación del contenido en sustancia orgánica y encierra desgraciadamente muchas posibilidades de error. Tiene que ser lenta y cuidadosa de acuerdo con muchas normas. Frecuentemente permanecen en la muestra -- restos de material sin incinerar completamente. Además, -- después de la combustión, el exceso básico se encuentra en gran parte en forma de carbonatos, por ejemplo como carbonato de sodio, carbonato de potasio y carbonato de calcio. El ácido carbónico de tales carbonatos no permanece, sin embargo, ~~propriadamente~~ a las cenizas sino a la sustancia orgánica --

puesto que tales carbonatos se originan durante la combustión. Cuando se incinera a temperatura más alta, lo cual facilita y acelera el proceso, se volatiliza la mayor parte del ácido carbónico; Pero como también muchas sales alcalinas (KCl, NaCl,  $K_2CO_3$ ,) son ya algo volátiles a  $700^\circ C$  el contenido en cenizas que se obtiene es demasiado bajo y por tanto erróneo. Otra fuente de error se presenta en los forrajes verdes a causa de la contaminación, suciedades, arena, arcilla en su mayor parte. Hace algunos años se determinaba junto al contenido en ceniza bruta, la ceniza pura, determinado por medio de análisis especiales el contenido en arena y  $CO_2$ . Sin embargo este procedimiento largo y costoso no se utiliza en el análisis ordinario de forrajes.

#### 9) GRASA BRUTA.

Para la determinación del contenido en grasa y lípidos se lleva a cabo solamente mediante la extracción con éter de petróleo de muestra previa y cuidadosamente desecada. Este procedimiento proporciona valores verdaderos sólo hasta cierto punto; únicamente es válido en el caso de sustancias relativamente ricas en grasa.

## 10) FIBRA BRUTA

Mediante un procedimiento analítico sencillo no puede determinarse el gran grupo de los carbohidratos puesto que está integrado por un conjunto de entidades químicas que carecen de una característica analítica común.

Dividieron por tanto, toda esta fracción en dos grupos, una parte in soluble en ácidos y bases, llamadas fibra bruta y una fracción soluble; las materias extractivas libres de nitrógeno. Pronto se vió sin embargo, que de algunos carbohidratos una parte se encontraba en la fracción fibra bruta y otra en las materias extractivas libres de nitrógeno.

### FRACCIONES HIDROCARBONADAS DEL ANALISIS DE WEENDE.

a )	Fibra bruta	b )	M. E. libres de N.
	Celulosa		Celulosa
	Pentosanas Fracción		Pentosanas Fracción
	Lignina insoluble		Lignina insoluble
	Suberina		Hemicelulosa, almidón toda clase de azúcares, <u>ma</u> terias <u>pécticas</u> , <u>ácidos orgánicos</u> y otras materias solubles de N.

Los múltiples esfuerzos realizados por generaciones enteras de científicos para encontrar mejores métodos analíticos han demostrado que esto no es posible mediante un sólo procedimiento. En el momento presente esto solamente puede lograrse mediante una serie de análisis especiales de los carbohidratos más importantes, tales análisis serán descritos posteriormente.

### III.) ANALISIS DE LOS COMPONENTES ORGANICOS DE LOS FORRAJES.

#### 1) ANALISIS DE DETERMINADAS SUSTANCIAS NITROGENADAS.

La determinación de los componentes nitrogenados totales, así como algunos análisis complementarios permiten ya una cierta caracterización de las proteínas en forrajes. Además de esto se pueden determinar otras fracciones nitrogenadas que tienen interés en casos especiales. Algo distinto sucede tal vez con el análisis de cada uno de -- los aminoácidos en particular, algunos de los cuales, especialmente-- los más importantes entre los aminoácidos imprescindibles o esenciales, han adquirido importancia creciente incluso para la alimentación animal práctica. En el futuro se llevarán a cabo también determina-- ciones de aminoácidos en forrajes. En el momento presente, sin embargo, los problemas que plantea tal determinación se salen de las posibilidades que ofrece un laboratorio normal de análisis y hasta ahora tales determinaciones son únicamente necesarias y se llevan a cabo - en trabajos de investigación. En el momento presente no es posible - realizar todavía análisis en serie de los aminoácidos. Esta es, sin - embargo, una de las condiciones previas para su utilización en el anásis ordinario. A pesar de que existen ya para una serie de aminoáci-

dos métodos analíticos no los incluimos. Respecto a las posibles determinaciones de otros grupos de sustancias nitrogenadas se incluyen las que figuran a continuación.

a) Proteína insoluble en agua.

Se pasan en un tubo grande de centrífuga (350 ml ) 10 g de la sustancia a analizar finamente dividida y en estado original y se agitan mecánicamente durante una hora con 200 ml de agua que contenga por litro 0,01 g de cloruro de mercurio . Se deja reposar durante una noche en la nevera y se centrifuga durante 30 minutos a una velocidad de 5,000 r.p.m. como mínimo. Si la solución sobrenadante es clara se decanta, en caso contrario se filtra. El residuo en el vaso de centrifuga se agitará con 100 ml de agua durante algún tiempo y se centrifuga de nuevo repitiendo este proceso tres veces, a continuación se lleva el residuo a un matráz Kjeldahl, se trata con un poco de ácido sulfúrico, se evapora cuidadosamente el agua en exceso y se dirige del modo anteriormente descrito en la determinación del nitrógeno por el método de Kjeldahl. Las determinaciones que figuran a continuación se refieren todas a la caracterización de fracciones del nitrógeno en la materia nitrogenada de naturaleza no proteica.

b) Nitrógeno oc-amínico.

La determinación del nitrógeno oc-amínico sirve para la determinación de los aminoácidos libres de la fracción nitrogenada-no protéica.

Esto es de interés porque la fracción de aminoácidos tiene va--lor protéico total en todas las especies animales. El método - que se describe a continuación se basa en la reacción de los oc-aminoácidos con la ninhidrina, en la cual se desprende  $\text{CO}_2$  en cantidad equivalente al nitrógeno oc-amínico.

Descripción del método.

Para la realización este método es conveniente disponer de una serie de aparatos (tres como mínimo), puesto que por cada serie de análisis paralelos es preciso realizar una prueba en blanco. En un matraz redondo de 50 ml se pesa - una cantidad tal de la sustancia a analizar, en la forma original, que como máximo contenga 2 mg de nitrógeno oc-amínico libre. Se añaden 10 ml de agua, algunas gotas de indicador universal y unos trocitos de porcelana para regular la ebullición. Con ayuda de un tapón de citrato se lleva la mezcla a un pH 2,5-3. Se añaden unas gotas de un antiespumoso activo que contenga sili

cona, se agita bien y se calienta hasta ebullición durante algunos minutos. Seguidamente se tapa el matraz y se enfría hasta 15°C. Se prepara de la misma manera una prueba en blanco sin la sustancia a analizar. En este momento se prepara la solución de recogida destinada a fijar el CO<sub>2</sub>.

En un matraz de fondo plano y cuello alto de 100 ml se deposita una gota de fenoltaleína, se expulsa el aire por medio de una corriente de nitrógeno puro, se pipetea rápidamente 2 ml de agua y se llena el matraz escasamente hasta la mitad con agua destilada libre de carbónico. El matraz colector se unirá entonces al aparato pero de manera que este sumergido completamente en un baño de agua de hielo. En el matraz de análisis se añade, según la cantidad que se suponga de nitrógeno oc-amínico, de 50 a 100 mg de ninhidrina; se une también el matraz al aparato y se calienta hasta 150°C al baño de glicerina calentado previamente, con lo cual el contenido del matraz analítico pasa por destilación a la solución colectora de la prueba en blanco como en la del problema. La diferencia de los valores de las titulaciones ( prueba en blanco muestra ), de la cantidad de nitrógeno oc-amínico en miligramos.



c) Nitrógeno amoniacal.

La determinación del amoníaco tal como en los forrajes es de interés muchas veces para comprobar el estado de conservación, esto es, la ausencia de putrefacción de los materiales ricos en proteína. Un contenido en amoníaco por encima de lo normal indica la descomposición bacteriana de la proteína. También en el estudio de los ensilados se puede comprobar mediante la cifra de amoníaco una cantidad excesiva de microorganismos fermentativos perjudiciales (proteolíticos). El análisis se basa en la destilación al vacío del amoníaco mediante calentamiento moderado en medio muy débilmente alcalinizado con óxido de magnesio.

Descripción del método:

Al inicio de el método pesan en un matraz de destilación al vacío (1,000 ml ) 2 g de la sustancia a analizar desecada al aire y finamente triturada y se tratan con 150 ml de agua, algunas gotas de alcohol octílico y fenolftaleina como indicador. El aire que penetra a través del capilar de destilación al vacío debe atravesar previamente un pequeño frasco lavado con ácido sulfúrico diluido para librarle de vestigios de

amoníaco. Para recoger el destilado se utiliza un matr az redondo de 250 ml con dispositivo de succión que contenga una cantidad medida exactamente de ácido sulfúrico valorado; en el caso de cantidades muy reducidas de amoníaco 10 ml de ácido sulfúrico, y 5 ml de agua por ejemplo. Para mayor seguridad se instala a continuación un pequeño matr az Kitasato que contenga una cantidad determinada de solución valorada de ácido sulfúrico. El análisis comienza al introducir por el embudo correspondiente una cantidad tal de suspensión de 10 g de óxido de magnesio en 100 ml de agua suficiente para la reacción del contenido del matr az sea debilmente alcalina. A continuación se calienta el baño de agua hasta 50-60 grados y se destila al vacío (20-30 mm. de mercurio); regulado por medio de una pinza de rosca colocada tras el segundo matr az colector) lentamente durante 30 minutos a contar desde el comienzo de la ebullición. Terminada la destilación se desmonta el aparato, se enjuaga el tubo refrigerante con una pequeña cantidad de agua, sobre el primer matr az colector y se titula el contenido de ambos matraces colectores. Como indicador debe utilizarse uno que sea suficientemente sensible con las soluciones muy diluidas que se suelen usar en este caso, por ejemplo rojo de metilo o un indicador com

plejo preparado con rojo de metilo.

d) Nitrógeno amídico.

El nitrógeno amídico presente en los componentes no protéicos se determina de la siguiente manera: se coloca en un vaso de precipitados de 250 ml, 5 g de la sustancia a analizar y se agitan durante algún tiempo con 50 ml. de la solución de cloruro mercúrico citada en el apartado a). Se deja reposar en la nevera durante una noche, se añaden 50 ml de agua destilada, se calienta hasta ebullición y se precipita con la cantidad necesaria de solución recién preparada y caliente de ácido tricloroacético al 20%, evitando añadir un exceso de la misma (son necesarios aproximadamente de 10 a 20 ml ) Se deja reposar durante unas horas, se centrifuga intensamente la solución y se decanta a través de un filtro endurecido a un matríz aforado de 250 ml ; el residuo se lava varias veces con ácido tricloroacético al 2,5% y seguidamente se afora al matríz 50 ml de la solución así obtenida se pipetea a un matríz Erlenmeyer de porcelana y 10 ml de ácido sulfúrico al 30%, se somete a ebullición durante siete horas con refrigerante de reflujo. Seguidamente se pasa al matríz de destilación al vacío utilizado en el método c) (determinación de amo-

niaco), se neutraliza el ácido cuidadosamente con NaOH concentrado hasta que la reacción sea ligeramente ácida y se determina el amoníaco del modo descrito en c) con óxido de magnesio y destilación al vacío.

e) **Determinación de la urea en forrajes.**

En la alimentación de los rumiantes se utilizan en determinadas circunstancias alimentos adicionados de urea como sucedáneo proteico. Para la determinación del contenido de urea se precisa de un método analítico específico que se basa en la reacción de la urea con el xanthidrol.

1 g. del problema se agita fuertemente durante una hora, con 20 ml de agua en un matríz aforado de 100 ml. A continuación se añora con alcohol, se agita nuevamente, se deja reposar durante algunas horas y se filtra. 50 ml del filtrado (25 ml solamente caso de tratarse de un producto muy rico en urea) se concentran al baño de agua en una capsula de cristalización hasta un volumen de 10 ml. A continuación se arrastran a un matríz Erlenmeyer con 35 ml de ácido acético glacial. Después se trata con 2 ml de una solución recientemente preparada de xanthidrol al 10% en metanol (el xanthidrol a utilizar debe

ser puro) y se repite la adición a intervalos de 5-10 minutos - otras cuatro veces. A continuación se deja reposar como mínimo durante una hora y el precipitado se filtra con succión sobre un crisol filtro de vidrio tarado, se lava tres veces, cada una de ellas con 5 ml de alcohol de 96° saturado con dizantil-urea se - deseca en la estufa a 105° hasta peso constante y se pesa 1 g de dixantil-urea contiene 0,143 g de urea.

## 2) ANALISIS SISTEMATICO DE GRASAS EN FORRAJES.

La determinación de grasa bruta en un producto preparado para análisis del modo ordinario proporciona valores muy exactos cuando se trata de grasas con componentes sensibles a la oxidación; estos son principalmente los ácidos grasos, principalmente poliinsaturados; linoleico, linolénico, etc., que se encuentran especialmente en el forraje -- verde y también en muchas semillas oleaginosas, por ejemplo las semillas de lino y los concentrados de ellas derivados.

En los alimentos llamados de producción propia existe otra dificultad -- más y es que contienen cantidades considerables de sustancias de naturaleza no grasa pero solubles en los disolventes de las grasas, conocidas con el nombre de "insaponificables", formadas principalmente por fitoesterinas y que no tienen ningún valor nutritivo. Para estos casos-

en los cuales es de interés la determinación del contenido real en grasa verdadera se emplea el método siguiente.

Descripción del método :

Se pesa una cantidad tal de material dividido en el estado fresco original ( forraje verde, heno, etc ) que pueda ser introducida en el extractor Soxhlet de 1,000 ml de capacidad. Se extrae inicialmente con un disolvente hidrófilo tal como la acetona durante el tiempo necesario para que el material analítico se deshidrate. En determinadas circunstancias es necesario en este punto sustituir una o varias veces el matraz de extracción por otro conteniendo solvente exento de agua. Después de terminada esta primera extracción que puede durar desde uno hasta dos días, se desecará el material analítico al aire ( con aspiración de gases ) o mejor en la estufa de desecación al vacío y se muele en el molino de laboratorio evitando la elevación de la temperatura. A continuación se extrae totalmente el material durante un día con éter. Durante la extracción se debe mantener el aparato de extracción libre de aire haciendo pasar una corriente débil de  $\text{CO}_2$ .

Los extractos se separarán del solvente mediante destilación de nuevo en atmósfera de  $\text{CO}_2$  con lo cual queda el agua y la grasa bruta. El

residuo se toma en cantidades suficientes de éter y se separa del agua. La solución etérea se lava cuidadosamente varias veces con agua en el embudo de separación y después de la separación se deseca con sulfato sódico anhidro (preparado por calcinación).

Se filtra, se lava cuidadosamente el residuo con éter puro y se evapora el extracto en atmósfera de  $\text{CO}_2$ . Se pesa la grasa bruta obtenida, a continuación se saponifica inmediatamente y se libera de las sustancias insaponificables. Esta operación se realiza en atmósfera de  $\text{N}_2$  gaseoso para evitar toda oxidación debida al oxígeno del aire. Para ello se añaden por cada grama de grasa bruta unos 5-10 ml. de solución normal de  $\text{KOH}$  en alcohol metílico y se calienta 1-2 horas al baño de agua hasta ebullición con refrigerante de reflujo. Seguidamente se destilará al residuo del matrás disolviendo mediante agitación suave. Se pasa a un embudo separador, se agita hasta agotamiento con éter de petróleo se lava dos veces más con pequeñas cantidades de agua destilada, la cual se añade después a la solución jabonosa primeramente aislada.

El "insaponificable" se puede aislar y pesar pasando la solución de éter de petróleo a un matrás tarado, evaporando el solvente y sometiendo el residuo a desecación. Los ácidos grasos superiores se liberan de la solución jabonosa acuosa mediante acidificación cuidadosa -

con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  diluido hasta reacción ácida empleando rojo Congo como indicador. Se agita hasta agotamiento con éter de petróleo en el embudo de separación, se recogen las sucesivas capas de éter de petróleo en un matrás tarado, se destila totalmente el éter de petróleo (al final al vacío) y se pasan los ácidos grasos. El contenido en grasa pura (triglicéridos) se puede calcular con exactitud suficientemente dando a los ácidos grasos un peso molecular medio de 282.

Este ácido permite una subdivisión y caracterización posterior de estos ácidos grasos, en ciertos casos después de obtener cantidades de grasa bruta un poco mayores en un aparato de extracción especialmente grande. Tales determinaciones son, por ejemplo, índice del yodo, e índice de sulfocianuro de los ácidos grasos totales, determinación analítica de los ácidos saturados, cálculo de los ácidos grasos poliinsaturados esenciales, aislamiento de las especies químicas mediante destilación fraccionada al alto vacío de los ésteres metílicos, determinación casi-cuantitativa de los distintos ácidos grasos mediante análisis espectrofotométrico con la luz ultravioleta y fraccionamiento mediante cromatografía en papel de la mezcla de ácidos grasos para demostración de cada uno de los componentes de la mezcla. Los métodos para tales determinaciones salen fuera del alcance de esta tesis y pueden consultarse en la bibliografía de la especialidad.



## Determinación del índice de peróxidos en las grasas.

El contenido de peróxidos, formados por auto-oxidación de los enlaces no saturados de los ácidos grasos durante un almacenamiento demasiado prolongado o inadecuado, es una característica cualitativa -- importante de los forrajes ricos en grasa. Este contenido se mide -- por el índice de peróxidos, el cual numéricamente corresponde al valor de titulación del yodo, que se libera del yoduro de potasio por acción de los peróxidos contenidos en un gramo de grasa, cuando se titula con tiosulfato.

En almacenamientos muy prolongados el contenido de peróxidos disminuye de nuevo, de tal modo que el índice de peróxidos alto tiene valor demostrativo, pero por el contrario valores bajos no indican necesariamente que el producto sea fresco (reciente). Hay que tomar en cuenta también que los aceites de oliva sin excepción ya en estado original tienen índice de peróxidos altos, de 8-12.

Los productos frescos no alterados tienen un índice de peróxidos de tres como máximo; valores de cinco o superiores suponen una alteración que va de incipiente a fuerte:

Descripción del método:

Se toma un gramo de grasa del material objeto de estudio en un matraz de fondo plano de 100 ml provisto de un refrigerante de aire - de ajuste esmerilado y de 40 cm de longitud, se añade 0,1 g. de yoduro potásico puro finamente pulverizado disolviendo en 20 ml de una mezcla a partes iguales de cloroformo y ácido acético glacial.

Una vez acoplado el refrigerante de aire se hace pasar durante dos - minutos una corriente de  $\text{CO}_2$  mediante un tubo fino de vidrio colocado verticalmente para expulsar totalmente el aire del matraz. Se calienta después al baño de agua agitando suave pero frecuentemente hasta que el cloroformo comience a hervir, se enfría rápidamente al chorro de agua, se trata con 40 ml de una solución recientemente preparada de yoduro de potasio al 0,2% y 10 gotas de una solución de almidón al 1% y se titula el yoduro liberado con solución de tiosulfato sódico -

Todo el análisis hay que llevarlo a cabo en la obscuridad. Se controla la pureza de los reactivos llevando a cabo una prueba en blanco sin grasa la cual no puede dar ningún índice de peróxidos apreciable. En caso contrario se debe substrair el valor de la titulación inicial. El índice de peróxidos se obtiene multiplicando por 5 el número de ml. de tiosulfato gastados.

### 3) ANALISIS SISTEMATICO DE CARBOHIDRATOS Y COMPUESTOS ANALOGOS.

a) Celulosa.

Existen un gran número de métodos analíticos para la celulosa; en forrajes el que mejores resultados da es el método sencillo

Descripción del método:

En un matríz provisto de un refrigerante de aire de junta esmerilada se calienta hasta ebullición durante 20 minutos 1 g de la sustancia a analizar, desecada al aire y finamente triturada con una mezcla de 15 ml de ácido acético al 80% y 1.5 ml de ácido nítrico concentrado ( $D= 1,42$ ). Después de enfriar se filtra en un crisol de porcelana o un crisol filtrante de cuarzo del mismo diámetro de poro, succionado fuertemente el líquido. Seguidamente con varias porciones, cada una de 20 ml de alcohol se arrastran al crisol cuantitativamente los adheridos al matríz y se lava seguidamente dos veces con benzol caliente, otros dos con alcohol caliente y finalmente con éter. El residuo de la filtración así obtenida constituido por celulosa en la mayoría de los casos de color blanco se deseca en el filtro durante corto tiempo a  $105^{\circ}\text{C}$  Después de dejar enfriar se pasa el crisol y se encierra en la mufla. La diferencia de peso, que se deduce de

la nueva pesada de la celulosa.

b) Determinación de las pentosas.

Digamos de antemano que con este método se determina la totalidad de las pentosas presentes en el material a investigar, cuya mayor parte procede de las pentosas aunque -- en pequeñas cantidades también puede tener otros orígenes.

El fundamento que a continuación se describe (transformación de las pentosas en furfurool) se mantiene en la nueva modificación de la técnica propuesta por JAYME y SARTEN, aunque el método como tal ha sido muy perfeccionado, sobre todo en lo que se refiere al dispositivo y a la elección del ácido bromhídrico para el ataque, con lo cual se obtienen valores absolutamente seguros.

Descripción del método :

Consiste esencialmente en un dispositivo de destilación el cual va unido mediante una junta esmerilada normal con un matraz de ebullición de 500 ml de capacidad y que lleva -- soldado un embudo de gotas de una capacidad superior -- a 100 ml . Todas las demás partes del - - - -

aparato, como el refrigerante, embudo colector y matr az colec-  
tor (matr az aforado de 500 ml ), se acoplan también por medio  
de juntas esmeriladas. La cantidad óptima de furfurool para ca-  
da determinación es de 0,15 a 0,20 g , lo cual viene a suponer  
según el contenido en pentosas de 0,5 a 2 g de material vege-  
tal desecado al aire.

Se deposita la sustancia problema en un matr az de ebullición se  
le añade unos trocitos de porcelana porosa y 75 ml de agua. -  
El tubo en U lateral, que sirve para equilibrar las presiones en  
tre el embudo colector y el matr az colector, se llena con una -  
cantidad tal de HCl al 13% (unos 5-10 ml ) que se asegure la po-  
sibilidad de paso de aire. Una vez el aparato totalmente cerra-  
do se dejan deslizar 75 ml de ácido bromhídrico al 40% -----  
(D=1,37) y seguidamente se llena el embudo de gotas de agua  
destilada. La destilación debe transcurrir muy rápidamente -  
y regularmente con ayuda de fuerte calentamiento. Para ello -  
sirve de indicación la señal del tubo colector. Cada 15 minu--  
tos deben destilar 50 ml que se dejaran pasar del embudo co-  
lector al matr az aforado. Al mismo tiempo se añaden 50 ml de  
agua al matr az de ataque. La velocidad de descomposición al--  
canza su máximo para la xilosa, que normalmente es la unica-

en forrajes y como máximo termina después de ocho destilaciones correspondientes a 400 ml de destilado total.

En este momento se cambia el matraz colector y se comprueba tras otras destilaciones la presencia de furfurool en el destilado. Sin embargo, esto es necesario solamente cuando se sospecha la presencia de otras pentosas. Terminado el ataque y la destilación se desconecta la unión entre el refrigerante y el dispositivo de destilación, se lava el refrigerante con un poco de agua, se añaden al destilado en matraz aforado el líquido de cierre del tubo en U y se lava varias veces con agua destilada. Tras de agitar y mezclar cuidadosamente se determinará en el destilado el contenido en furfurool, lo que se realiza de modo rápido mediante titulación. La determinación gravimétrica, corriente en tiempos pasados, es casi siempre innecesaria (precipitación con ácido barbitúrico) en el procedimiento que estamos describiendo.

En un matraz Erlenmeyer con tapón esmerilado (matraces de índice de yodo) se tratarán 50 ml del destilado con 2 ml de HCl al 13%, después se añaden 10 ml de solución de molbdate amónico (25 g en un litro) y 20 ml de solución bromato-bromuro (1,392 g de KBr - 10 g de KBr en un litro). Se esperan 4 minutos a partir de la aparición de la coloración amarilla, lo --

que tiene lugar rápidamente, se añaden después soluciones de KI al 10% y se titula, pasados 10 minutos escasos, el exceso de bromato con solución de tiosulfato sódico. En caso de que para la retitulación se gasten menos de 5 o más de 10 ml de tiosulfato se debe realizar una nueva determinación en un matrón que contenga 15 o 25 ml de bromato-bromuro. El valor así obtenido para la cantidad de bromuro gastada en la fijación del furfurool se utiliza para la titulación final que sigue. En ella se tratan 50 ml de destilado con 4Cl y molibdato amónico de la forma anteriormente descrita. Se enfría a 14°C añade la cantidad gastada de solución de bromato-bromuro en la primera titulación y se agita bien. Cuatro minutos después de la aparición de la coloración amarilla se añade solución de yoduro de potasio y finalmente se titula, pasados 5 o 10 minutos, el bromato restante (en exceso) con tiosulfato. El cálculo de las pentosas presentes se realiza según la siguiente fórmula:

$$\frac{a \cdot 330}{e} - \% \text{ de pentosanas}; \frac{a \cdot 375}{e} - \% \text{ de pentosas}$$

a - ml. de solución de bromato gastados; e - gr. que han sido tomados de la sustancia a analizar.

En caso de que la sustancia a analizar contenga cantidades apre

ciables de sustancias pectínicas se debe realizar una corrección en el cálculo de pentosanas y pentosas, puesto que la pectina o su principal componente el ácido galacturónico puede también dar furfurool al ser tratado con ácidos concentrados según el método de Tollens o según el de Jayme y Sarten. En este caso se determina primeramente del modo anteriormente descrito. Las pentosas totales, seguidamente las materias pectínicas como ácido galacturónico y para la reacción se sustrae por cada % de ácido galacturónico un 0,36 % de pentosas.

c) **Lignina**

A causa de su complicada estructura química es muy difícil una determinación exacta y segura del grupo de sustancias componentes de los vegetales conocidas como ligninas. Se obtienen al parecer valores relativamente buenos y reproducibles con el método descrito Springer que figura a continuación el el apartado siguiente.

Método de Springer ( University Of Arizona ).

Se pasan 5 g de material desecado al aire y finamente molido en un cartucho de extracción que se encierra con algodón



tras haberle cubierto con una lámina de papel de filtro. Se extrae con éter durante 8 horas (o hasta desaparición del color) con el aparato Soxhlet, seguidamente 8 horas con alcohol y despues 16 horas con agua. En el intervalo entre las extracciones se deseca cada vez a 95°C A continuación de la extracción acuosa y con ayuda de 250 ml HCl al 2% se pasa cuantitativamente la sustancia, todavía humeda, de 1 cartucho de extracción a un matráz redondo de 500 ml , de boca esmerilada. Seguidamente se hierve 5 horas con refrigerante de reflujo. El producto se arrastra con agua a un vaso de precipitados de 500 ml y se deja sedimentar hasta el día siguiente. Se filtra a través de un crisol filtrante de cristal previamente tarado, se lava con agua caliente, se deseca como mínimo 6 horas a 95°C se pesa. Seguidamente se pasa la sustancia a un vaso de precipitados de 100 ml o a una cápsula-mortero de 10 cm. Como esta operación no se puede hacer cuantitativamente se vuelve a pesar el crisol filtrante. Se añade exactamente a la sustancia, 1 ml de solución de ácido sulfúrico al 78% por cada 0,1 g. de peso y el conjunto se mantiene durante dos horas agitándolo frecuentemente, pasadas las cuales se lleva a un matráz redondo de boca esmerilada de 500 ml con 225 ml de agua y se hierve 5 horas con refrigerante de reflujo. A continuación se pasa otra vez --

con ayuda de agua a un vaso de precipitados de 600 ml. Después de sedimentar se filtra a través de un crisol filtrante de cuarzo, se lava con agua caliente, se deseca durante 3-5 horas a 105,° se pesa y finalmente se incinera y se vuelve a pesar.

El cálculo de la lignina se realiza de la siguiente manera:

Conocida la tara de crisol filtrante y el valor de las dos pesadas del mismo, tras la hidrólisis clorhídrica (vease anteriormente) se puede deducir tanto el residuo tras la hidrólisis clorhídrica (a) como el material que se utilizo para la hidrólisis sulfúrica (b).

A partir del peso del crisol de cuarzo filtrante con el residuo de la hidrólisis sulfúrica y el peso tras la incineración se calcula la cantidad de sustancia orgánica que quedó después de la hidrólisis sulfúrica y que se considera como lignina (c).

a. c . 100 - lignina en la sustancia analítica original

b . 5

d) Pectinas.

Las pectinas se encuentran de modo regular aunque en pequeñas proporciones en todos los órganos vegetales. Solamente son

abundantes en algunos casos, por ejemplo en las remolachas y productos derivados así como también en los frutos carnosos. A continuación se describirá el método para la determinación de las pectinas.

El método más aplicable al caso de materiales ricos en pectinas, es el de Mc Cready y colaboradores. Puesto que todavía no se conoce perfectamente la composición exacta de pectinas, se expresan los resultados analíticos como ácipoligalactourónico.

Método de Mac Cready y colaboradores. Dispositivo basado en la descarboxilación. ( Institute Cattle Portland Oregon ).

En el método de la descarboxilación, como su nombre indica, se libera dióxido de carbono del componente principal de las pectinas, el ácido poligalactourónico, mediante ataque con haluros de hidrógeno concentrados y en caliente el cual puede ser determinado cuantitativamente. Esta finalidad cumple el dispositivo analítico. La descomposición se realiza en el matríz de ataque.

El  $\text{CO}_2$ allí formado es arrastrado mediante una corriente lenta -

de aire a la solución de captación. Para liberar previamente el aire de CO se le hace atravesar dos matraces de absorción con potas concertada, después de un tercer matraz con solución de hidróxido bórico y finalmente un tubo con cal sodada. Después a través de una válvula de seguridad conteniendo mercurio. El aire y los gases producidos en el matraz de ataque pasan primero a través de un buen refrigerante - - - - después a través de un pequeño recipiente con una solución al 3% de nitrato de plata, que tiene la misión de retener las pequeñas cantidades de ácido bromhídrico que hayan podido ser arrastradas. En el recipiente colector se encuentra una cantidad exactamente medida de solución de hidróxido bórico. Para asegurar una absorción total de CO<sub>2</sub> el recipiente colector lleva acoplado otro dispositivo de absorción lleno de pequeños anillos de cristal, cuyo extremo inferior va sumergido en la solución de hidróxido bórico. El volumen de este tubo deberá ser tal que en caso necesario pueda contener toda la solución de hidróxido bórico.

#### Determinación.

Se pesan, según el contenido de pectinas, de 0,5 a 2 g del ma -

terial analítico desecado y finamente molido y se depositan en el matraz de ataque rigurosamente limpio y seco. Se añaden 40 ml de ácido bromhídrico al 40% (D=1.38) libre de  $\text{CO}_2$  y se ajusta el matraz al dispositivo. Se hace pasar durante unos 10 minutos aire libre de  $\text{CO}_2$  a través del aparato, regulando la corriente de manera que pasen burbujas tres por segundo. A continuación se depositan, por medio del embudo de que va provisto el tubo de absorción, exactamente 30 ml de solución de hidróxido bórico, lavado con unos 5 ml de agua destilada libre de  $\text{CO}_2$ . Seguidamente se introduce con precaución el matraz de ataque en un baño de aceite calentado a algo más de  $100^\circ\text{C}$ , hasta que el nivel de aceite alcance unos 2 ml por debajo del nivel del líquido en el interior del matraz. En este momento se calienta rápidamente el baño hasta  $145^\circ\text{C}$ , al mismo tiempo que se deja pasar una corriente lenta de aire de aproximadamente 1 a 2 burbujas por segundo. La determinación se da por terminada después de unas horas; se retira el dispositivo de absorción y se lava cuidadosamente este tubo con agua libre de carbónico sobre el matraz de recogida. El hidróxido no gastado se titula seguidamente con HCl, empleando fenolftaleína como indicador, Se lleva a cabo de la misma manera una prueba en -

blanco con todos los reactivos pero sin la muestra con pectina. El contenido en ácido poligactourónico del material analítico se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{(a-b) \cdot 999.31}{c} = \% \text{ pectina}$$

donde a = ml. de Ba (OH)<sub>2</sub> fijados por el CO<sub>2</sub>

b = lo mismo en la prueba en blanco, y

c = peso de la muestra en gramos.

#### 4) Determinación de vitaminas.

Sólo describiremos aquellos métodos de determinación de vitaminas que se basan en análisis químicos ordinarios. Con frecuencia una determinación clara y segura del contenido de muchas vitaminas sólo es posible mediante test biológicos. Las de terminaciones de este tipo no encajan dentro del plan de este trabajo. En la determinación de vitaminas lo más frecuente e importante es el análisis de los carotenos o de la vitamina A. Fundamentalmente se debe hacer notar de antemano que a causa de la sensibilidad de tales sustancias a las influencias perniciosas, sobre todo del oxígeno del aire, solamente se pueden obtener re sultados seguros e incuestionables cuando se han tomado cons-- tantemente todas las medidas tendientes a una conservación cui-

dadosa del contenido de la vitamina y provitamina desde el --- principio hasta el final de la conservación.

Es imprescindible el manejo cuidadoso de la muestra, el comienzo inmediato del análisis y su realización hasta el final sin interrupciones. Cada operación innecesaria y toda pérdida de tiempo acarrea pérdidas de vitaminas y proporciona por lo tanto valores demasiado bajos. Sin embargo un trabajo rápido y continuo, evitando toda interrupción y toda manipulación innecesaria, es posible solamente cuando se analizan pequeñas cantidades de material. Con frecuencia en los forrajes esto está en contradicción con la necesidad acuciante de obtener una muestra representativa auténtica. Por lo tanto se exige en este caso una habilidad y cuidado en la toma de muestra y en su preparación para el análisis mayor que en casos ordinarios. Las normas que a continuación figuran son resultados de múltiples experiencias realizadas por científicos especializados en largos años de trabajo.

a) Determinación de caroteno.

Para la determinación del caroteno conviene indicar en primer lugar un método de aplicación general y seguidamente otros mé

todos peculiares para el análisis de aquellas sustancias que necesitan una preparación especial.

#### Descripción del método.

Antes de comenzar el análisis debemos tener a mano y listo para ser usados todos los materiales y aparatos necesarios. Inmediatamente después de la pesada de la muestra debe comenzarse la extracción del caroteno (justamente con las demás materias colorantes liposolubles).

El peligro de pérdida es especialmente grande en el caso del forraje verde fresco, ya que al destruirse la estructura de las plantas -- tiene lugar en considerables proporciones la degradación enzimática y química del caroteno.

No se permite por ello una trituración previa de las hojas verdes y demás partes de las plantas para la obtención de una muestra media. El mejor modo de efectuar la extracción es triturar una muestra analítica lo más pequeña posible en un vaso de precipitados de paredes gruesas y 50 ml de capacidad. En el vaso vacío se corta rápidamente en trocitos, con una tijera afilada, una pequeña parte de la muestra del alimento verde hecha un rollo y se repite la operación las ve



ces necesarias hasta tener seguridad de haber conseguido una buena-media del material, pero sin que exceda la pequeña cantidad recomendada, 1-2 g..

Si por causas insuperables relacionadas con la toma de muestras y especialmente en el caso de un contenido en caroteno muy escaso, fuese necesario extraer cantidades grandes de la sustancia, se puede utilizar un triturador mecánico para salir del paso. En este caso son sin embargo mucho mejor aquellos dispositivos cuyas cuchillas trabajan de arriba hacia abajo, puesto que en los dispositivos ordinarios, en los cuales las cuchillas están sujetas al fondo, se originan con frecuencia pérdidas. No obstante debe tenerse presente que la mezcla íntima con el aire que se origina en estos aparatos lleva consigo el peligro de una destrucción del caroteno, incluso para trituraciones breves de una duración máxima de dos minutos. El paso de una corriente de gas inerte ( $\text{CO}_2$  o  $\text{N}_2$ ) evita este peligro pero complica el método.

Siempre que sea posible es preferible, por lo tanto, el método de trituración en vasos de precipitados. Para la trituración de la muestra sirve una mano de mortero de vidrio resistente a la fusión, cuya forma y medidas pueden ser variables. Cuando las sustancias a investigar estén a punto para la extracción se añade polvo de cuarzo

de finura media, aproximadamente la misma cantidad en peso que la muestra y alrededor de 10 ml de la mezcla solvente, formada a partes iguales por éter de petróleo (punto de ebullición 80-100) y acetona conteniendo 0,1% de hidroquinona.

(Los materiales secos se humedecen con un poco de agua y se dejan reposar una hora antes de comenzar la extracción. En el caso de muchas sustancias se hace necesaria una preparación especial para el análisis, que expondremos a continuación del método general que estamos describiendo. Esta se refiere sobre todo, como ya dijimos, a los forrajes verdes desecados artificialmente, a los granos y semillas, raíces tiernas, tubérculos y frutos carnosos, así como a los alimentos de origen animal).

Se tritura, girando la mano del mortero, la sustancia a analizar con cuarzo y el disolvente. Se dejan sedimentar las partículas y se decanta el disolvente en un embudo de gotas cebado con agua. Los más -- apropiados son los tipos alargados que terminan en punta, de forma puramente cónica, de cristal topacio y con una capacidad total de --- unos 300 ml.

El residuo húmedo se seguirá triturando fuerte y cuidadosamente, para lo cual lo mejor es operar la mano de mortero sin golpear sino ha

ciéndolo girar y deslizar. Después se añade más disolvente, se continúa la trituración, se decanta y se repite el proceso varias veces - precisas hasta extraer todo el caroteno.

En caso de que el residuo este seco tras 3 o 4 extracciones, esto es, deshidratado, se añaden unas gotas de agua. Después de 4 o 5 extracciones se observa que a pesar del humedecimiento algunas partículas del residuo no se sedimentaron bien.

Carece de importancia en esta fase del análisis el hecho de que al decantar pasen algunas pequeñas partículas. Solamente se debe filtrar, en caso necesario, a través de un papel muy poroso y de filtración rápida. Si los pigmentos extraídos, debido a la desecación del solvente, se fijan al borde superior del papel filtro, con el consiguiente peligro de oxidación, se corta rápidamente el borde del filtro con una tijera y se le extrae con nuevo solvente. En la mayoría de los productos a analizar son suficientes cinco extracciones para la extracción completa del caroteno. En los casos difíciles son necesarias casi -- siempre ocho. Para comprobar los casos dudosos se decanta la última extracción a un embudo separador pequeño con agua hasta la mitad y se agita ligeramente y suavemente, al mirar a través es fácilmente reconocible la presencia ocasional de pigmentos en la delgada capa de éter de petróleo.

En general un extracto de color ligeramente verde claro procedente de hojas verdes frescas indica que no tiene más caroteno.

Lavado de la acetona :

Para separar la acetona del extracto, pues interferiría más tarde la separación cromatográfica, se utiliza un aparato automático y de -- marcha continua para su eliminación. La salida del embudo cónico- de separación está provista de un tubo de vidrio curvado en forma de S, que alcanza justamente hasta media altura del embudo de separación.

Al comienzo del lavado, durante poco tiempo, se llenará este tubo -- con agua abriendo, totalmente la llave de paso con ligero balanceo. De un segundo embudo de separación fijado encima se deja gotear agua sobre la solución a una velocidad de 100-200 gotas por minuto. Una cantidad correspondiente de agua fluye del tubo en S, con lo cual se -- arrastran las sustancias hidrosolubles del extracto. El lavado se nota por la formación de ondas de refrigerancia y la terminación del -- proceso se reconoce porque la capa de agua permanece totalmente clara, sin alteraciones, al caer las gotas de agua. Con algunas expe -- riencias no es necesario comprobar la presencia de acetona o sustancias similares en el agua de salida. Para cantidades de extracto nor-

mal, de alrededor de 50 ml son suficientes 1-2 litros de agua para un lavado completo, pudiéndose utilizar simplemente agua corriente no clorada. Los extractos ricos en grasa, por ejemplo de vísceras animales o semillas oleaginosas, fijan la acetona con más intensidad, la bencina de punto de ebullición alto necesita un lavado mayor que el éter de petróleo.

Los extractos de muchas sustancias forman en determinadas circunstancias, emulsiones que pueden ser arrastradas parcialmente por el agua, con lo cual en ciertos casos pierde caroteno. Para evitar esto se recurre primeramente a la utilización de un embudo de separación más grande, con mayor espesor en la capa de agua, en la cual puede separarse la emulsión antes de que alcance la salida. En casos especiales se debe lavar más lentamente que de ordinario. La adición al extracto de cantidades algo mayores de éter de petróleo también puede actuar bien. En caso de que se formen emulsiones persistentes -- se pueden remediar, frecuentemente, con la adición de una solución saturada de sulfato amónico en cantidad de aproximadamente 1/5 del contenido total de agua.

También se pueden intentar recuperar el pigmento arrastrado con gotitas de emulsión dejando pasar el agua de salida a través de una capa

de éter de petróleo en un segundo embudo de separación, el cual va -  
provisto de un tubo de salida en forma de S. Si todas estas medidas -  
fracasan, caso raro en los forrajes, no queda otro remedio que libe-  
rar el extracto de la acetona por evaporación, lo cual dicho sea de pa-  
so sólo debe realizarse en caso de necesidad puesto que pueden tener  
lugar pérdidas de caroteno.

Después de lavar completamente se cierra el embudo de separación -  
con el tapón, se cierra la llave de paso, se retira el tubo en S, se --  
quita de nuevo el tapón y se separa la capa de éter de petróleo del --  
agua dejando salir ésta cuidadosamente.

Aislamiento del caroteno de la solución de éter de petróleo.

El extracto de éter de petróleo obtenido del modo descrito anterior-  
mente se pasa por una columna de absorción, de una mezcla de  
óxido de aluminio sulfato sódico, vertiendo por la boca del embudo -  
de separación y no por la llave de paso. La solución debe verterse -  
cuidadosamente, succionándola lentamente a través de la columna.  
El embudo de separación se lavará dos veces consecutivas con éter -  
de petróleo que se hace pasar a través de la columna.

El absorbente debe permanecer siempre cubierto y saturado con la -  
solución, en ningún caso se succionará aire porque entonces puede -

oxidarse el caroteno en cantidad apreciable.

Todos los pigmentos contenidos en el extracto son absorbidos en las capas superiores de la columna. Cuando ha pasado la mayor parte del disolvente se utilizara para recoger el caroteno a eludir un recipiente aforado preparado al efecto. Para la emulsión se pasan a través de la columna de absorción 10-25 ml de éter de petróleo con 2% de acetona. La cantidad que de hecho se utiliza será naturalmente - aquella que sea necesaria para un lavado completo del caroteno, lo - que con alguna práctica se deduce de las correspondientes zonas de - la columna. Si el paso del disolvente se realiza con mucha dificultad generalmente es debido a que la capa superior se ha tornado compacta por la acción de la humedad. En este caso se remueve con una pequeña espátula en una profundidad de aproximadamente medio centímetro.

La columna debe ser lo más corta posible, pero naturalmente de suficiente longitud para retener con seguridad los pigmentos no carotenoides. Si al principio no se fija suficientemente el caroteno, es debido a la mayoría de los casos (cuando se usan los absorbentes apropiados) a un lavado incompleto de la acetona. La misma dificultad se presenta en materias ricas en grasas.

Se determina exactamente el volumen de la solución recogida en una probeta de precisión. Se agita poco tiempo y cuidadosamente y se mide la intensidad del color amarillo en un colorímetro o fotómetro. Los valores más exactos se obtienen cuando la solución contiene entre 5,0 y 2 mg de caroteno por litro. Las medidas deben realizarse lo más rápidamente posible. Lo mejor es llenar las cubetas utilizadas en los aparatos anteriormente mencionados por medio de una pequeña pipeta provista de una pera de goma. Por lo regular se mide la extinción y a partir de ella se calcula el contenido en caroteno (siendo conveniente expresarlo en mg /kg ) Para el cálculo se utiliza o bien el producto de la extinción medida y un factor standard o se lee en una curva patrón preparada a tal fin. Diremos finalmente que las causas de los resultados poco satisfactorios radican casi siempre en desviaciones pequeñas o grandes de las normas establecidas y comprobadas.

Otras peculiaridades del método:

Los aparatos de la adsorción cromatográfica del caroteno y los pigmentos que le acompañan deben ser precisos.

Para llenar el tubo de adsorción se comienza por colocar en el estrangulamiento del tubo, apretando al máximo con ayuda de una varilla -



de vidrio, un tapón de algodón o tapón de vidrio. Después se introduce el adsorbente (óxido de aluminio y sulfato sódico) con arreglo a las instrucciones hasta la altura deseada (normalmente 5 cm, pero en casos especiales la longitud de la columna es mayor) y no necesita ninguna otra manipulación. La columna cromatográfica se puede llenar rápidamente introduciéndola en el frasco que contiene el adsorbente y tomando aproximadamente la cantidad de sustancia que se precisa.

El adsorbente. Para el analista lo más cómodo es adquirir en el comercio un óxido de aluminio de marca garantizada, de buena calidad, especial para cromatografía y mezclarle con un peso igual de sulfato sódico anhidro de grano fino, conservándolo herméticamente cerrado. El recipiente que contiene el adsorbente solo debe abrirse para tomar la cantidad necesaria para llenar los tubos, puesto que el contacto con el aire libre influye sobre la actividad del óxido de aluminio.

También puede prepararse un adsorbente del modo siguiente: Se separan por medio de un cedazo fino limpio, las partículas más grandes de un lote de hidróxido de aluminio, de grano fino y se calienta durante 7 horas a 800°. Después de dejarlo enfriar -

se valora una muestra del óxido de aluminio obtenido, con una -- mezcla de caroteno y licopeno. Si la actividad es demasiado grande, es decir, el caroteno es fijado con demasiada intensidad se -- puede inactivar dejando el polvo al aire durante un cierto período y realizando una nueva prueba. Puede obtenerse un preparado menos activo, calentando adecuadamente a una temperatura algo más baja. El sulfato sódico anhidro se obtiene desecando a 150° durante 12 horas el producto corriente del comercio.

La mezcla del adsorbente, ambos preparados a partes iguales, puede ser contrastada como más pronto al día siguiente de la preparación. Para esta comprobación lo más adecuado es un extracto de cáscara de tomate para cuya preparación desecada al vacío. En caso necesario puede usarse como material de partida puré de tomate comercial. Para realizar la prueba de calidad se tritura un poco del material problema con ayuda de cuarzo etc., con éter de petróleo y sin adición de acetona, como indicamos anteriormente en la descripción del método general. Todos los pigmentos contenidos en la solución de éter de petróleo deben ser retenidos, inicialmente, en una banda rojiza de un cm. de anchura, próxima al borde superior de la columna. Se vierte después el eluyente conteniendo 2% de acetona y se arrastra ligeramente el caroteno en -

forma de una banda de aproximadamente 2 cm de ancho de color naranja claro, mientras que la masa de pigmentos, especialmente el licopeno, permanece prácticamente en su sitio. Si el caroteno es arrastrado muy rápidamente y al mismo tiempo el licopeno, se desplaza ligeramente hacia abajo, indica que el adsorbente está demasiado húmedo, mientras que si la elución del caroteno tiene lugar con más lentitud y dificultad significa que el adsorbente está demasiado seco y por ello demasiado activo. En este último caso puede corregirse dejando la mezcla adsorbente extendida en capa fina 1 o 2 horas sometida a la acción de la humedad atmosférica. En caso de que la actividad sea tan sólo un poco más intensa, basta con frecuencia elevar la concentración de acetona en la solución eluyente al 2,5 o 3%.

Fundamento de la determinación óptica del caroteno.

Los aparatos ópticos de manejo visual, por ejemplo el colorímetro de inmersión de tipo Dubosq, ampliamente difundido, necesitan una solución de comparación. Se usó frecuentemente una solución de 0,0158 g. de dicromato sódico en 100 ml. de agua. Esta solución tiene aproximadamente la misma intensidad de color que 1,0 mg. de B-caroteno en un litro de éter de petróleo. No

se puede recomendar para determinaciones exactas todos los aparatos ópticos visuales.

El ojo humano es, por principio, poco sensible en el campo de los tonos del color amarillo. Además, las soluciones de dos sustancias de naturaleza distinta no son absolutamente iguales ópticamente, cuando se utiliza luz con otra distribución espectral. Incluso las variaciones de la luz natural en el transcurso del día originan oscilaciones en la cifra de los carotenos. Prescindimos, además de las diferencias individuales que tienen origen en el ojo del observador. Es por lo tanto muchísimo mejor utilizar aparatos fotoeléctricos, particularmente el espectrofotómetro, los cuales pueden operar con la luz estrictamente monocromática. Estos deben ser considerados como instrumentos absolutos de medida.

Una vez determinada la extinción de la solución de caroteno y conocida la extinción específica para el caroteno se calcula la concentración problema a partir del valor obtenido. Los carotenoides naturales con acción vitamínica A no son completamente unitarios, pero regularmente constan, aproximadamente, del 90% de B-caroteno, especialmente en aquellas sustancias que como forrajes son para nosotros de gran interés. La extinción teórica del B-caroteno, puro es 2,550, medida en espesor de capa de 1 cm y concentra----

ción de g: en 1,000 ml de éter de petróleo, con luz de longitud de onda de 400 milimicras. A pesar de que los otros componentes de la mezcla natural de carotenos ( $\alpha$ -carotenos,  $\beta$ -caroteno, etc.), tienen extinciones que concuerdan exactamente con esta se recomienda tomar como base el valor dado para  $\beta$ -caroteno. - En otro caso debe determinar el analista las constantes para el espectrofotómetro por él utilizado, usando la solución de carotenopuro. Para ello existen en el comercio preparados cristalizados puros, mezcla de  $\beta$ -caroteno (90-95%) con  $\alpha$ -caroteno, que deben haber sido adquiridos recientemente, caso de que se hayan de utilizar como standard en la solución correspondiente. La concentración máxima es de 8 mg de caroteno en un litro de éter de petróleo, puesto que para la determinación de la extinción específica o para la preparación de una curva de patrón, lo mismo que el análisis, todo radica en una extrema velocidad. Se opera de la siguiente manera: se pesan 8 mg de caroteno con la máxima exactitud en una microbalanza; se disuelven en una pequeña cantidad de benzol (mucho mejor y más de prisa que en el éter de petróleo); se lleva la solución a un matrás aforado de 1 litro con ayuda de éter de petróleo de punto de ebullición de 80-100° y se afora con éter de petróleo. Para mayor seguridad se prepara al mismo ---

tiempo y de la misma manera una segunda solución standard. Se preparan una serie de diluciones de esta solución standard que -- contenga 4; 2; 1; 0,4 y 0,2 mg. de caroteno por litro. Para --- ello se miden cada vez en un matr az aforado seco y cuidadosamente contrastado (este procedimiento es mucho más exacto que la utilización de una pipeta), 25 ml y se llevan a otros tantos matracas aforados de distintas capacidades (50, 100, 200, 500 y 1,000 - ml.)

Inmediatamente despues de preparadas las diluciones se llevan a - cabo las correspondientes mediciones en serie con el instrumento cuidadosamente preparado de antemano. En caso de que se utilice un espectrof metro, es fácil, fijar exactamente la longitud de - onda correspondiente a la máxima extinción del caroteno utilizado, que se encuentra hacia 450 milimicras y hacer despues las mediciones con esta longitud de onda.

#### Determinación de la vitamina A.

La vitamina A se encuentra en estado natural solamente en los -- productos animales, sobre todo en los órganos internos. Por ello muchos alimentos de origen animal (por ejemplo harinas de pescado, harinas de hígado y similares) contienen cantidades muy varia-

bles de vitamina A. En la actualidad es importante el contenido, - la mayoría de las veces garantizado, en vitamina A de forrajes es pecialmente ricos en vitamina o vitaminados, en los cuales, a veces, se debe controlar la concentración de vitaminas así como su - estabilidad.

Puesto que la vitamina A es más sensible a la oxidación que el caroteno se debe tratar el material analítico muy cuidadosamente y - sin ninguna pérdida de tiempo. Los mejores resultados se obtie-- nen en los casos en que el contenido en vitamina A del material - a investigar no es demasiado reducido. En los productos muy pobres en vitamina A los resultados obtenidos son menso exactos.

El principio del método se basa en la conocida reacción de CARR-PRICE (una). En los últimos estudios del análisis es necesario incluir cuidadosamente la influencia de la humedad y del oxígeno. En todo caso es recomendable llevar a cabo determinaciones de control con una sustancia cuyo contenido en vitamina A sea conocido. Como tal sirve el acetato puro de vitamina A, que se expende en el mercado en cápsulas de gelatina (con 2,500 U.I. de vitamina A cada una), preparadas por firma HOFFMANN-LA ROCHE, En la de terminación de control se colocan una o dos de estas cápsulas en -

un pequeño vaso de precipitados con 25 ml de bencina - - - - -  
- - aproximadamente (punto de ebullición alrededor de 100°), se  
cortan con una tijera de acero inoxidable y se pasa la solución --  
cuantitativamente a un matríz aforado de 50 ml.

#### 1) Oxido de aluminio (muy activo )

El producto comercial se calcina algunas horas a 500° y se le deja  
enfriar sobre pentóxido de fósforo en un desecador de vacío.

#### 2) Eter.

Absolutamente exento de peróxidos y conservado en frascos ambar.

#### 3) Cloroformo.

El cloroformo puro comercial se agita varias veces con agua, se  
desecha a continuación sobre sulfato sódico recientemente calcinado  
y se filtra y destila con la mayor rapidez. Se conserva en pre--  
sencia de un poco de óxido de aluminio muy activo en frascos de -  
color ambar.

#### 4) Solución de tricloruro de antimonio.

El tricloruro de antimonio puro comercial se purifica de nuevo --  
mediante destilación en ausencia absoluta de aire y humedad. Se pe



san rápidamente 23 g. de producto purificado y se disuelve en 100 ml de cloroformo, en caso necesario se calientan con precaución. El reactivo así preparado se conserva en frasco ambar-muy oscuro, en presencia de óxido de aluminio. Antes de usarlo se agitará bien filtrado la cantidad necesaria por un triple filtro de papel absolutamente seco.

#### Descripción del método:

De acuerdo con el contenido de vitamina se pesan 10-50 g. del producto a valorar, los cuales deberán contener de 100-300 U. I. de vitamina. Paralelamente se efectúa un análisis control en el cual se añadirá el material analítico una cantidad conocida y exactamente medida de vitamina A standard (aproximadamente la cantidad que se supone contenida en la sustancia problema). Todas las operaciones deben llevarse a cabo en un cuarto oscuro, o por lo menos con luz natural muy amortiguada. Se coloca el producto-problema en un frasco de cierre absolutamente hermético y se agita con éter varias veces y enérgicamente para extraer completamente la vitamina, que es muy liposoluble. La solución etérea -- de un volumen total de unos 150 ml , se centrifuga brevemente y se vierte en un cristizador de tamaño apropiado. Si se analizan materiales pobres en grasas se añaden en este momento de 2-2,5-

gr de aceite puro de cacahuet exento de vitaminas. Los concentrados vitamínicos puros en forma oleosa se añaden en la cantidad correspondiente en el cristalizador.

A continuación se añaden 0,5 ml de una solución alcohólica al 10% de hidroquinona y 15 ml de solución alcohólica de NaOH recientemente preparada. Se coloca en un baño de agua, calentando a temperatura ligeramente superior a 80° y se burbujea a través de la solución nitrógeno puro, agitando suavemente de vez en cuando. Pasados 1-15 minutos, cuando se ha evaporado la mayor parte del alcohol, se añade óxido de aluminio humedecido (humedad 12%), y se miden 8 ml. en una probeta de 10 ml, se da vueltas con una espátula de vidrio y se deja hasta un máximo de 20 minutos en el baño de agua hasta evaporación total de alcohol.

El residuo pasa cuantitativamente a un tubo de centrifuga que se puede cerrar cuidadosamente con un tapón esmerilado y se agita vigorosamente durante un minuto con 25 ml. de éter. Se vierte la solución etérea en otro tubo de centrífuga análogo, sobre 5 ml de agua saturada con éter, se agita otra vez vigorosamente y se centrifuga para arrastrar los últimos restos jabonosos de la solución etérea. Este tubo de centrífuga va provisto de divisiones exacta-

mente calibradas para poder controlar los volúmenes. Después de que se ha medido el volumen de la solución etérea se toman 15 ml. y se llevan a un matrás de destilación pequeño de cuello largo. (100 ml ), se expulsa el aire y se evapora el éter al vacío. Mientras tanto se prepara, para la partición cromatográfica, una columna de óxido de aluminio (dispositivo del inciso a) caroteno). Esta columna se llena hasta una altura de 10 cm con óxido de aluminio y se recubre con bencina. El residuo de la evaporación, que contiene la vitamina A, se disuelve en 10 ml de bencina y se vierte sobre la columna.

Bajo succión lenta, se lava el matrás cuantitativamente con un total de 30 ml de bencina. La solución recogida en un matrás apropiado se libera del solvente del modo anteriormente descrito. Se disuelve cuidadosamente en cloroformo, se pasa la solución cuantitativamente a un matraz de 10 ml., se afora , etc., y se utilizan 2 ml para la determinación clororimétrica. Para ello se ponen 2 ml en la cubeta del colorímetro y se mezclan rápidamente con 10 ml de reactivo de tricloruro de antimonio

La determinación colorimétrica o fotométrica de la extinción se debe efectuar en el intervalo de cinco segundos después de la adición del reactivo. Si se utiliza un espectrofotómetro o aparato --

similar se emplea luz de longitud de onda de 610 m $\mu$ .

El cálculo de los resultados se puede realizar mediante la siguiente fórmula.

$$\frac{b \cdot c}{(a - b) \cdot d} = \text{U. I. de vitamina A en 100 gr. del producto problema}$$

Donde a representa la cantidad hallada en la prueba de adición (problema vitamina A standard), expresada en unidades internacionales.

b es la cifra correspondiente al problema sin adición. c es la cantidad añadida de vitamina A standard, expresada en U. I. y d representa el peso en gramos.

La exactitud del análisis puede deducirse de la pérdida de vitamina A que tiene lugar durante la realización del análisis. Esta pérdida debe ser inferior al 7%.

Trabajando cuidadosamente la magnitud del error es siempre del orden de 5%. Puede considerarse que un contenido de U. I. por gramo de sustancia problema es el límite mínimo que permite una determinación segura.

Para preparar la curva patrón se miden exactamente cantidades crecientes de la solución standard de vitamina A que contengan de 0 a 50 U. I. de vitamina A, se evapora el solvente al vacío (en caso de ser posible en la cubeta utilizada para la determinación colorimétrica o fotométrica) y se disuelve el residuo en 2 ml de cloroformo puro. Tras la adición de 10 ml de solución de tricloruro de antimonio se mide la extinción en los cinco primeros segundos. La solución de comparación (el blanco) es una mezcla de 2 ml de cloroformo con 10 ml de solución de tricloruro de antimonio. Todas las determinaciones de la extinción deben repetirse varias veces.

#### Determinación de la vitamina D.

Generalmente el contenido de vitamina D de los forrajes y raciones se determina biológicamente, por ejemplo mediante test con con pollos, puesto que todos los métodos fisicoquímicos carecen de la sensibilidad suficiente.

Con este procedimiento colorimétrico (fotométrico), que vamos a describir, puede determinarse la vitamina D, cuando no esta presente al mismo tiempo en cantidades apreciables de vitamina A y

cuando el material a investigar no contenga cantidades excesivamente pequeñas de vitamina D. Pueden emplearse hasta 5g. de la sustancia a analizar en los cuales vayan, por lo menos, 2,000 U. I. de vitamina D. Tras la pesada se trata el material con 20 ml de solución alcohólica de potasa al 10% en un matraz de 100 ml se expulsa el aire mediante el paso corriente de N, seguidamente se calienta durante 15 minutos con refrigerante de reflujo en un baño de agua hirviente. Se diluye el contenido del matraz con 50 ml de agua. La mezcla se agita por tres veces con éter de petróleo puro (punto de bullición 30-40°), empleando la primera vez 60 ml y la segunda y tercera solo 20 ml de cada una. Las soluciones de éter de petróleo se reúnen y se lavan con agua del modo siguiente: la primera vez con 100 ml de agua -- agitando cuidadosamente por balanceo sin llegar a sacudir y después otras dos veces, cada una con otros 100 ml de agua, agitando por sacudida inicialmente suave y al final intensamente. Después de desecarla se deposita la solución de éter de petróleo en un matraz aforado de 100 ml. Se agita finalmente durante cinco minutos con 2 g de sulfato sódico anhidro, calentando al rojo -- previamente. Se filtra inmediatamente y se evapora al vacío a 40 hasta desecación una cantidad tal de la solución que en ella estén contenidas unas 1,000 U.I. de vitamina D.

En caso que además de vitamina D estén presentes cantidades con siderables de impurezas resulta mejor disolver el extracto, tras la evaporación, en bencina pura de punto de ebullición 90-100°C, purificando mediante separación cromatográfica exactamente de la misma manera que se ha descrito para la vitamina A. La solución pura de vitamina D se evapora otra vez al vacío hasta desecación.

Para medir con colorímetro se disuelve el residuo de la evaporación en una cantidad tal de cloroformo que 2 ml de la solución -- contenga unas 400 U.I. de vitamina D. Se pipetea cuidadosamente 2 ml de la solución cloroformica en la cubeta de medida, añadiendo rápidamente 10 ml de reactivo tricloruro de antimonio-cloruro de acetileno y se mide la extinción 30 segundos después con la luz de 500 milimicras de longitud de onda, contra la solución de comparación de 2ml de cloroformo y 10 ml del reactivo. El contenido de vitamina D se calculará a partir de la extinción medida sirviéndose de una curva patrón.

Trazado de la curva patrón:

Soluciones standard: se disuelven en bencina pura 100 mg. de vitamina D pura cristalizada (correspondiente a 4,000.000 U.I), y se afora en un matríz aforado de 100 ml. Tal solución debe emplearse siempre recién preparada. 1 ml de esta solución madre contie

ne 40,000 U.I. Se diluye progresivamente con bencina utilizando matraces aforados de capacidad adecuada hasta que la dilución sea tal que 1 ml. de la solución contenga de 40 a 200 U.I. de vitamina D.

Las determinaciones se llevan a cabo de la siguiente manera: se depositan cinco y diez ml., según la concentración de la dilución final de vitamina D, directamente en la cubeta de medida calentada a unos 30° y cuidadosamente se evaporan al vacío hasta desecación. El residuo se disuelve después en 2 ml de cloroformo y se mide la extinción de la solución 30 segundos después de la adición rápida de 10 ml de reactivo tricloruro de antimonio-cloruro de acetilo (igual que se describió anteriormente), con luz de longitud de onda de 500 milimicras. Estas mediciones se llevan a cabo con concentraciones crecientes de manera que se trabaje en cada una de las determinaciones con 200 U.I más que en la anterior. El método tiene un margen de error de aproximadamente 10%.

Para un mejor control de la exactitud puede realizarse, de la misma manera que para la vitamina A, una prueba con adición a la sustancia problema de cantidades conocidas de vitamina D.



## Vitamina E.

Se puede determinar la vitamina E basándose en su capacidad reductora, caso de que no esté presente en cantidades excesivamente pequeñas. Esta capacidad reductora es propia de todo el grupo de los tocoferoles, de todos los cuales, sin embargo, en lo esencial solamente tiene actividad vitamínica el  $\alpha$ -tocoferol, en tanto que la actividad biológica de los  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ , tocoferoles y otros es solamente exigua. Por ello en el método que se describe a continuación se aísla el  $\alpha$ -tocoferol para su determinación. Sin embargo, si existe interés en la determinación de los tocoferoles totales, por ejemplo para señalar el poder antioxidante, se pueden determinar a continuación los restantes tocoferoles.

No se puede operar a la luz natural. El principio del método radica en la reducción por el tocoferol del cloruro férrico a cloruro ferroso,

Este último produce con el  $\alpha$ -dipiridilo una intensa coloración roja que puede medirse colorímetrica o fotométricamente.

Descripción del método:

Se pesa una cantidad tal de la sustancia a analizar, que la pesada contenga por lo menos 1 mg de tocoferol. En el ejemplo que damos a continuación se han hecho los cálculos para una pesada de 10 g. Si se utilizan cantidades mayores o menores hay que modificar de modo proporcional las de líquido a utilizar. El material problema se trata en un frasco ambar con 100 mg de ascorbinato sódico, 100 mg de lipasa, 100 mg de clara de huevo, 100 ml de pancreatic substance HOG. Se agitan con 35 ml de agua destilada caliente (70°) y a continuación se deja reposar durante 45 minutos a unos 45° en la obscuridad. Seguidamente se añaden 6,5 ml de una solución de amoníaco al 10% y 35 ml de alcohol étilico puro y se agitan bien. Seguidamente se deja enfriar hasta la temperatura ambiente y se agita, sacudiendo vigorosamente, un 70 ml. de éter puro libre de peróxidos, se trata con 70 ml de éter de petróleo, se agita brevemente y se deja reposar unos 10 minutos hasta separación completa de las capas. Se toman en este momento 100 ml de la solución éter-éter de petróleo y se lava por dos veces consecutivas en un pequeño embudo separador con 10 ml de agua cada una, la cual previamente ha sido saturada con una mezcla a partes iguales de éter puro y éter de petróleo puro. A continuación se preparan dos matraces-

redondos y en cada uno se depositan exactamente 30 ml del extracto lavado. A una de las dos soluciones se añade una cantidad exactamente conocida de tocoferol, que a groso modo sea igual a la que se espera este presente en la sustancia a analizar (prueba de adición).

Se evapora al vacío hasta desecación el contenido del matrás y el residuo se trata con 3 ml de reactivo de tricloruro de antimonio. Se deja cinco minutos en reposo y se añaden 10 ml de alcohol, y 10 ml de ácido clorhídrico concentrado puro. Se trata cuidadosamente con 50 mg de cinc puro en polvo, refrigerando para evitar un calentamiento excesivo y se repite por tres veces la adición, siempre tras la dilución del cinc. A continuación se vierte la mezcla a un embudo separador de 250 ml, lavando el matrás con 30 ml de alcohol puro y después se agita con 50 ml de éter puro libre de peróxidos. Después se añaden 50 ml de éter de petróleo, se agita y se trata con 50 ml de agua destilada, después de lo cual se vuelve a agitar vigorosamente. Se deja separar las capas, se toman, midiendo exactamente de 25 a 75 ml de la solución de éter-éter de petróleo, según el contenido en tocoferol que se espere y se vierten sobre una columna cromatográfica, el óxido de aluminio de 5 cm. de altura-

empapada en la mezcla de solventes. El óxido de aluminio debe ser recién humedecido con agua, como en el caso de la determinación de la vitamina A. A continuación se dejan pasar a través de la columna 80 ml. de la mezcla de éter-éter de petróleo y se recogen en el filtrado junto con las grasas de tocoferoles - libres de impurezas

#### Separación de la fracción saponificable.

El extracto obtenido se evapora al vacío. El residuo se trata -- con 150 mg. de ascorbato de sodio y 15 ml de una solución de hidróxido potásico en metanol recién preparada, después de lo -- cual se calienta a 60-70° durante 15 minutos sobre el baño de -- agua, agitando de vez en cuando. Después de dejar de enfriar - corto tiempo se trasvasa la solución cuantitativamente a un embudo separador de 250 ml sirviéndose de 50 ml de alcohol metílico, purificado de la misma manera que el alcohol etílico por destilación con permanganato potásico e hidróxido potásico. Se deja enfriar totalmente y se agita vigorosamente con 100 ml de éter de petróleo puro. Tras corto reposo se añaden 10 ml de agua destilada y se agita otra vez fuertemente. Se separa la capa acuosa, se vierte la solución de éter de petróleo en un segundo embudo separador, se lava una vez con 10 ml de agua destilada y, --

tras separar ésta, otra vez con 10 ml de ácido clorhídrico normal.

#### Determinación del $\alpha$ -tocoferol.

Se determina exactamente el volumen de la solución de éter de petróleo obtenida y la mitad se deposita en un matríz redondo y se evapora al vacío. La separación del  $\alpha$ -tocoferol se realiza en una columna cromatográfica de óxido de aluminio humedecido y de 12 cm de altura. Se hace pasar en primer lugar ciclohexano puro recién destilado hasta que la columna este totalmente empapada, se disuelve el residuo de la evaporación en 200 ml de ciclohexano y se vierte la solución sobre la columna. Se la succiona a través de la columna del modo ordinario. Seguidamente se lava con 60 ml de ciclohexano. Después se hacen pasar 130 ml de una mezcla de 99 partes en volumen de ciclohexano y una de éter con lo cual se eluye el  $\alpha$ -tocoferol. Esta solución se recoge en un matríz frío y se evapora al vacío. El residuo se disuelve en 4 ml de alcohol puro, se añaden por este orden, 0,5 ml de solución de dipiridilo (0,5 g de  $\alpha$ -dipiridilo en 100 ml de alcohol etílico) y 0,5 ml de una solución alcohólica de cloruro férrico recién preparado y conservado en la obscuridad. La solu

ción se vierte inmediatamente en la cubeta destinada a la medición. Después de transcurridos exactamente dos minutos ( a contar a partir de la adición del cloruro férrico), se mide la extinción con la luz de longitud de onda de 515 m $\mu$

El cálculo de la concentración se realiza con ayuda de una curva patrón, que es de la siguiente manera: Se prepara una solución standard de vitamina E, depositando 100 ml de DL- $\alpha$ -tocoferol puro en un matraz aforado de 100 ml. Se disuelve inmediatamente en alcohol puro y se afora.. Esta solución se conserva guardándola en el congelador unos 10 días. Inmediatamente antes de la utilización se realizan en alcohol puro las diluciones adecuadas. Para la curva patrón se pipetea cantidades conocidas (de 10 a 200 g ) en un tubo de ensayo, completando hasta un volumen de 4 ml de alcohol puro. Después se añaden de la manera anteriormente descrita 0,5 ml de solución de dipiridilo y 0,5 ml de solución de cloruro férrico y se mide la extinción en el fotómetro.

Las cantidades de vitamina E leídas en la curva patrón se expresan provisionalmente (teniendo en cuenta la marcha analítica) como  $\mu$ g. de vitamina E en un g . de sustancia problema. El cálculo final se realiza según la siguiente fórmula.

100. c. a

$\frac{b - a}{100}$  - mg  $\alpha$ -tocoferol en 100 g. de la sustancia problema.

siendo a = cantidad encontrada de  $\alpha$ -tocoferol por g. de sustancia sin adición.

b = lo mismo en la prueba de adición

c = cantidad añadida de  $\alpha$ -tocoferol por g. de sustancia.

#### Determinación de los restantes tocoferoles

Tras separación del  $\alpha$ -tocoferol se vierten sobre la columna 80 ml de una mezcla de 85 ml de éter de petróleo y 15 ml de éter etílico y se recoge el eluido en un recipiente frío. La solución así obtenida se evapora al vacío, se resuspende en 4 ml de alcohol puro y se determina fotométricamente de la manera ya descrita, teniendo en cuenta únicamente que la lectura de las extinciones se realiza esta vez diez minutos después de la adición de la solución de cloruro férrico.

Vitamina B<sub>1</sub> (Tiamina).

Esta determinación exige, así como la siguiente de vitamina B<sub>2</sub> (riboflavina) la utilización de un fotómetro de fluorescencia.



### Descripción del método.

El material a analizar debe ser dividido muy finamente y con cuidado. Se realizan dos pesadas iguales de, como máximo, 25 g que no deben contener más de 0,3 mg de vitamina B<sub>1</sub>, se depositan en dos vasos de precipitados de 400 ml, y se tratan con 125 ml. de ácido sulfúrico. A una de las muestras se añade una cantidad conocida, lo mejor 0,2 mg de vitamina B<sub>1</sub> pura que ha sido desecada al vacío hasta peso constante durante dos horas a 65° en 1,000 ml de ácido sulfúrico, guardándose la solución en un frasco ambar en el refrigerador. Se conserva bien durante un mes. Se agitan los vasos para que se empape bien todo el material, se añade 1 ml de buen aceite de parafina fluido (D=0,85), para evitar la formación de espuma y se calienta durante 15 minutos en el autoclave o en una olla exprés a 105 o 110°. La mezcla se arrastra con agua destilada a un matraz aforado de 250 ml y se deja enfriar con cuidado hasta 45°. Se añaden ahora 20 ml de una solución al 20% de acetato sódico anhidro y después, tras agitar bien, 0,5 g de clarasa dejando reposar el matraz otros 20 minutos en la obscuridad a 45°. Se deja enfriar hasta la temperatura ambiente. Se trata otra vez con 20 ml de la solución de acetato sódico, se afora con agua destilada y se filtra. Se desechan los primeros 15 ml del filtrado.



Prueba en blanco para comprobación de impurezas fluorescentes.

Se toman 10 ml de la solución acuosa obtenida en la prueba con adición en un vaso de centrífuga y se añaden unos 25 a 50 mg de piro-sulfito sódico pulverizado. Mediante calentamiento durante 15 minutos en el baño de agua hirviendo se destruyen totalmente la vitamina- $B_1$ .

Se enfría a la temperatura ambiente y se trata con 3 ml de una solución de 3 g de bromuro de cianogeno en 100 ml de agua destilada. Esta solución debe ser manejada con mucho cuidado debido a su gran toxicidad; debe prepararse nueva cada semana, conservándola bajo cierre hermético en la obscuridad del frigorífico. A continuación se trata con 2 ml de hidróxido sódico al 30% y 15 ml de alcohol isobutilico recién destilado, desprovisto de fluorescencia, se agita durante un minuto y se centrifuga a continuación durante tres minutos. Después se llevan 10 ml de la solución alcohólica a un matraz aforado de 25 ml, se afora con alcohol de 96 libre de fluorescencia y se mezcla bien (solución A).

Se tratan 10 ml de cada una de las soluciones problemas con bromuro de cianogeno obteniéndose así soluciones alcohólicas para la medición en el fotómetro de fluorescencia de la vitamina  $B_1$  (tiocromo). En esta medición se determina la fluorescencia de las soluciones obtenidas ajustando el cero del aparato con la solución A (prueba en -

blanco ), para ver la influencia de las posibles impurezas fluorescentes. A partir de la intensidad de fluorescencia medida en las dos pruebas analíticas propiamente dichas se calcula el contenido en vitamina B<sub>1</sub> según la fórmula siguiente :

$\frac{100.d.b}{(a-b).c}$  = microgramos de vitamina B<sub>1</sub> en 100 g de la sustancia-problema.

siendo :

a = lectura en la escala del fotómetro de fluorescencia para la muestra con adición de vitamina B<sub>1</sub>.

b = lo mismo para la muestra sin adición.

c = la pesada de la sustancia a analizar en g .

d = la cantidad de vitamina B<sub>1</sub> añadida en g.

f. Vitamina B<sub>2</sub> ( riboflavina ).

Se pesa la sustancia a analizar finamente dividida, una cantidad tal ( como máximo 25 g ) que contenga 0,3 mg. de vitamina B<sub>2</sub>. Como en la determinación de vitamina B<sub>1</sub> se utilizan dos vasos de precipitados de 400 ml y se mezcla bien la sustancia con 125 ml de ácido sulfúrico. A una de las muestras se le añaden 0,2 mg de riboflavina pura ( prueba de adición ). Tras adición de 1 ml de aceite de parafina puro ( D=0,85 ), se calienta durante 15 minutos en el autoclave a 105-110°, se lleva el contenido de los vasos de precipitados, lavando con agua destilada, a dos matraces afora

dos de 250 ml. Se enfría cuidadosamente hasta 45° y se trata con solución de acetato sódico y clara de modo descrito para la vitamina B<sub>1</sub>. Tras enfriar a la temperatura ambiente se añaden otros 20 ml de acetato sódico, se afora con agua destilada y se filtra.

Se toman 50 ml de cada uno de los filtrados, se depositan en botellas para agitación de 100 ml., añadiendo en cada una 1 ml de ácido sulfúrico al 30% y 2 ml de solución de permanganato de potasio al 3% y se agita durante un minuto.

Inmediatamente a continuación se trata con peróxido de hidrógeno, - añadiendo gota a gota, hasta decoloración. Después se agita bien la solución con 50 ml de cloroformo y se separa la emulsión por centrifugación. Se depositan 20 ml de cada una de las soluciones acuosas en vasos de centrifuga de tamaño adecuado, se añade 1 g. de franco\_nita para la absorción de la riboflavina, se agitan bien, y se centrifuga cuidadosamente decantando el líquido que sobrenada. Si se supone que el contenido en riboflavina es muy bajo, se puede depositar otra vez la misma cantidad ( 20 ml ) de la solución acuosa sobre la franco\_nita utilizada, se agita de nuevo, se centrifuga y se decanta. La franco\_nita sedimentada se agita durante corto tiempo con 20 ml. de ácido sulfúrico y se centrifuga de nuevo. Esta solución de lavado se decanta y se desprecia. A continuación se agita bien el sedi -

mento con 15 ml en cada caso de hidróxido sódico con la finalidad de eluir la riboflavina. Se centrifuga bien hasta que la solución que sobrenada sea clara. Se depositan 10 ml de cada una de las soluciones claras en los cristalizadores y se irradian durante 6 minutos con lámpara de luz blanca ( Philips 160 watos ), a una distancia de 25 cm. Después se acidifica con 2 ml. de ácido acético glacial puro y se vierte la solución en vasos de centrifuga. Se añaden a cada uno de los paralelos 15 ml. de cloroformo puro recién destilado, ( libre de fluorescencia ), se agita durante 20 segundos y se centrifuga 2-3 minutos. Se toman 10 ml de la solución clorofórmica con una pipeta exactamente calibrada, se depositan, en un matraz aforado de 25 ml aforado con alcohol de 96 puro y libre de fluorescencia. A continuación se mide la fluorescencia ajustando el cero del instrumento mediante una mezcla de 10 ml del cloroformo utilizado y 15 ml de alcohol. El cálculo se realiza aplicando la misma fórmula que en el caso de la vitamina B<sub>1</sub>.

$$\frac{100.d.b.}{(a-b) .c} = \text{g de riboflavina en 100 g de la sustancia problema.}$$

#### IV. - ANALISIS ESPECIALES DE LOS MACROELEMENTOS ( Ca, Mg, P, K, Na, Cl, S )

La extraordinaria importancia del apote mineral suficiente en la moderna cría animal hace necesario determinar analíticamente los componentes inorganicos que son de significación e interés. Nos referi-

mos especialmente a los siete macroelementos minerales, que representan una fracción importante del cuerpo animal, y de sus productos y participan al mismo tiempo en proporción considerable en el metabolismo propiamente dicho. La determinación de cenizas brutas por el método de WEENDE no es en sí ninguna medida del contenido en materia mineral. Se debe más bien determinar por separado los elementos importantes mediante análisis especiales. Para ello es frecuentemente imprescindible seguir una marcha analítica especial. Solo algunos macroelementos pueden ser determinados conjuntamente. Este hecho implica sensiblemente los análisis de las sustancias minerales.

#### 1. - Determinación del calcio.

En las cenizas de forrajes habrá que contar siempre, para la determinación del calcio, con la presencia de otros elementos que originen interferencias, como el ácido fosfórico, magnesio, hierro y aluminio. Sucede especialmente esto cuando, como es frecuente, se debe determinar el magnesio después del calcio. El material de partida es en ambos casos la solución de cenizas brutas en HCl. Señalamos otra vez que tales soluciones quedan, por ejemplo, tras la determinación de cenizas insolubles en ácido. También mediante disolución (solubilización) de las cenizas brutas obtenidas, se puede

ahorrar en muchos casos una calcinación especial de los productos con el fin de determinar el calcio o el magnesio. En caso de que se requiera una gran exactitud en los resultados hay que acomodar las pesadas al contenido de clacio esperando y efectuar la incineración solo con este fin. La determinación se puede realizar dentro de -- límites muy amplios en las concentraciones de calcio en la solución problema.

Sin embargo, los mejores resultados se obtienen cuando están presentes unos 40 mg de Ca en 50-100 ml de solución. Para ello se calcinan en la mufla de 3-10 g. del producto a analizar, según el contenido en calcio. Se arrastran con agua caliente las cenizas a un vaso de precipitados de 400 ml, se calienta el crisol de calcinación con 5 ml. aproximadamente, de solución de HCl al 2% y se arrastra esta solución, también cuantitativamente, al vaso de precipitados. Después se calienta, unos cinco minutos para que la disolución sea lo más completa posible y se diluye hasta 50-100 ml. A continua -- ción la solución se neutraliza exactamente con sosa pura concentrada en presencia de rojo de metilo y se añaden 2,4 ml de HCl diluido al 1 : 1 por cada 100 ml. A continuación se tratan con 50 ml. de solución saturada de oxalato amónico y 10 g de urea ( en forma sólida ), y se calienta sobre un hornillo eléctrico, hasta viraje del indicador, para lo cual son precisos unos 15 minutos. El precipitado de

oxalato cálcico se sedimenta muy bien. Cuando el líquido que sobrenada es completamente claro, se filtra y se lava cuidadosamente el precipitado con agua caliente.

En este momento se lavan repetidamente el filtro y el precipitado con ácido sulfúrico caliente y después, cuidadosamente, con agua caliente. Para recoger el filtrado lo mejor es usar el vaso utilizado para precipitación. La solución se calienta hasta 80° aproximadamente y se titula con permanganato de potasio caliente hasta aparición de coloración rosa duradera.

1 ml de  $\text{KMnO}_4$  corresponde a 0,002004 g. de Ca.

2. - Determinación del Mg a continuación del Ca.

a). Como pirofosfato de magnesio

Una vez obtenida la solución clorhídrica de cenizas se trata con 10 ml de solución de cloruro férrico al 1% y 10 ml de una solución de acetato amónico al 10%. Seguidamente se calienta y se mantiene algunos minutos en ebullición. Inmediatamente, caliente aún la solución, se filtra y el precipitado se lava bien con agua caliente a la que se le han añadido algunas gotas de acetato amónico. Se calienta el filtrado hasta ebullición y se precipita con 50-100 ml., según el contenido en calcio, de una solución saturada y caliente de oxalato amónico. Después de dejarlo reposar un día se separa por filtración el precipitado de oxalato amónico. Después de dejarlo reposar un día se separa --

por filtración el precipitado de oxalato cálcico, se lava cuidadosamente con agua caliente y se determina el calcio, si se desea, se puede utilizar el procedimiento anteriormente descrito.

El filtrado y el agua de lavado del oxalato cálcico se concentran hasta 50 ml, se alcaliniza con amoníaco concentrado y se precipita en caliente, añadiendo gota a gota 25 ml de una solución al 10% de fosfato sódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ), se deja reposar un día, se filtra a través de un filtro libre de cenizas y se lava con una solución al 2,5% de amoníaco. El filtro y el precipitado se desecan y a continuación se calcina cuidadosamente, en un crisol tarado, con llama de gas débil. Después se calienta al rojo intenso durante varias horas por lo menos a  $1,000^\circ$ , para transformar completamente el precipitado en pirofosfato de magnesio.

1 g. de  $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$  contiene 0,2184 g. de Mg.

b). Determinación de calcio y magnesio mediante titulación colorimétrica.

Los procedimientos analíticos que figuran a continuación son métodos rápidos para determinaciones en serie del calcio y magnesio en las que no se requieran una extremada exactitud en los resultados. Sin embargo, se han utilizado satisfactoriamente para valorar el contenido mineral en forrajes.

Descripción del método :

Dos gramos de heno, o las cantidades correspondientes de cualquier



sustancia a analizar desecada al aire y finamente molida se incineran en la mufla del modo ya descrito. Las cenizas se disuelven en unos 10 ml de ácido clorhídrico diluido y la solución se pesa cuantitativamente a un matraz aforado de 50 ml y se afora .

En un tubo cónico de centrifuga se neutralizan 5 ml de la solución de cenizas con NaOH ( utilizando rojo de metilo como indicador ), se acidifica con algunas gotas de ácido acético glacial y se añaden 2 ml de solución saturada de oxalato sódico. Se deja reposar durante 6 horas, como mínimo , y se centrifuga durante 5 minutos a 3.000 rpm. decantando cuidadosamente la solución sobrenadante. Seguidamente se hace una suspensión del precipitado en agua destilada, se centrifuga y se decanta de nuevo el agua de lavado, añadiéndola a la primera decantación. Esta solución es la que se utiliza para la determinación de magnesio.

#### A). Determinación de calcio.

El precipitado de oxalato cálcico se disuelve en 5 ml de ácido clorhídrico , se lleva cuantitativamente a un matraz Erlenmeyer de --- 250 ml , se trata con 10 ml de solución amoniacal , y se añaden como indicador 2-3 gotas de solución de rojo metilo. Se titula inmediatamente en una bureta de precisión con una solución 0,01 M. de - títiplez hasta viraje total de rojo a verde. El reconocimiento del punto de viraje se facilita si se trata previamente la solución con algunos

mg de títtriplex magnésico en polvo. Hacia el final de la titulación - se debe proceder lentamente, puesto que las reacciones requieren -- algún tiempo. Un ml de títtriplex III 0,01 M corresponde a 0,4 mg de calcio ( 0,004 g ). En la determinación de la actividad hay que tener en cuenta el resultado de la prueba en blanco.

Reactivos necesarios :

1. Títtriplex III 0,01 M.

3,721 g de etilendiaminatetracetato-disódico ( merck 8,418 se disuelven en un matraz aforado hasta un volumen de un litro conserván dose en un frasco de vidrio resistente ( Pirex ), o mejor, en un fras co de polietileno. La actividad de la solución se prueba y determina mediante titulación con soluciones cuyo contenido en calcio sea cono cido, las cuales se preparan convenientemente con carbonato de -- calcio.

2. Indicadores ; a) Solución de 0,2 g de negro eriocromo T, en - 15 ml de trietanolamina, más 5 ml de etanol. Esta solución debe prepararse en el momento de usarla. b) Solución alcohólica satura da de rojo metilo.

B). Determinación de magnesio.

La solución obtenida en a ) después de precipitación del oxalato cálcico, más el agua de lavado, se pasa cuantitativamente a un matraz Erlenmeyer de 250 ml y se neutraliza exactamente con la solución-

de amoníaco , empleando rojo de metilo como indicador. Se añáde una punta de cuchillo de sulfuro sódico (  $\text{Na}_2\text{S}$  ) y cianuro potásico (  $\text{KCN}$  ) y se neutraliza de nuevo cuidadosamente con ácido clorhídrico n. A continuación, se lleva la solución a pH 10, mediante la adición de 10 ml de solución de amoníaco y 5 ml de ácido clorhídrico n. Se añaden de 2 a 3 mg de tríplex magnésico y 2 gotas de solución de negro de eriocromo más 7 gotas de solución de rojo de metilo y se titula inmediatamente con solución de tríplex 0,01 M. del mismo modo que en a ). 1 ml de tríplex III 0,01 M equivale a 0,243 de magnesio ( 0,000243 g ) .

### 3. Fósforo

El fósforo se encuentra en los organismos ( animales y vegetales ) en una serie de compuestos de naturaleza diversa, en parte como puro fosfato inorgánico y en gran parte como componente de la materia orgánica. A pesar de que casi todos los compuestos contienen como parte integrante ácido ortofosfórico, se requiere frecuentemente un ataque químico enérgico para transformarle en un compuesto analizable. Un método irrefutable consiste en la denominada combustión por vía húmeda basado en la destrucción de la materia orgánica con oxidantes líquidos fuertes ( ácido nítrico concentrado y ácido perclórico ), seguida de la determinación gravimétrica. En muchos casos, sobre todo en los forrajes, también se puede determinar el ácido fos

fórico total tras incineración por vía seca realizada bajo condiciones especiales. Por lo tanto, describiremos ambos métodos a continuación.

En caso de que no sea necesaria tanta exactitud analítica y cuando se trata de muy pequeñas cantidades del producto, la determinación del contenido en fósforo puede también llevarse a cabo colorimétricamente o fotométricamente. Este procedimiento es mucho más rápido y se puede realizar fácilmente en un gran número de muestras. Lo incluimos a continuación como micrométodo en el apartado C ).

a). Determinación gravimétrica del fósforo tras calcinación por vía húmeda.

La determinación gravimétrica del fósforo se lleva a cabo del modo más conveniente con una cantidad de 10-20 mg de fósforo por muestra. Teniendo esto presente se realizan las pesadas necesarias referidas a sustancia desecada al aire, que deberán ser: de 2g en el caso de forrajes de origen animal, tortas oleaginosas y subproductos de molinería ricos en fósforo; 5 g en las harinas de cereales y heno de buena calidad; 10 g en henos de mala calidad y patatas y 20 g en el caso de paja.

La muestra para analizar, desecada y finamente triturada, se pega en un matraz de fondo plano ( 100-150 ml ), de cuello muy largo y ancho. Se añaden por cada cinco gramos de sustancia, 10 ml de

agua destilada, 2-3 ml de ácido perclórico concentrado ( D=1,5 ), - 5 ml de ácido nítrico concentrado ( D=1,42 ) y 3-5 ml de ácido sulfúrico concentrado. Después de mezclar cuidadosamente se calienta con precaución en un hornillo eléctrico no demasiado fuerte y la mezcla se colorea de oscuro. Una vez consumido el oxidante se añade - ( en cada caso ) un poco de ácido nítrico concentrado y se continúa el ataque lentamente hasta que la solución se torne incolora y una vez fría permanezca totalmente incolora. Seguidamente se agregan - - 20 ml de agua y se calienta 10 minutos a ebullición, para destruir el ácido nitrosilsulfúrico.

Para determinaciones gravimétricas se emplea el contenido total del matraz, se pasa el contenido a otro matraz aforado de 50 ml y se afora, empleándose una parte alícuota de la solución de ataque si es para microdeterminaciones .

La cantidad de solución que se destina a la precipitación debe tener un volumen de 50 ml. Se completa la solución existente o la medida hasta que aquel volumen con ácido nítrico diluido ( D=1,20 ), que contenga 30 ml de ácido sulfúrico concentrado por litro. La solución se calienta, en un vaso de precipitados de 250 ml , justamente hasta ebullición y se le agita suavemente durante algunos minutos. Se vierten inmediatamente sobre la solución 50 ml ( medidos con probeta ) del reactivo sulfo-molídico, se esperan unos minutos, se a-

gita vigorosamente durante medio minuto y después de vez en cuando con una varilla de vidrio.

Se deja en reposo durante una noche, se filtra el precipitado a través de un crisol filtrante de vidrio, previamente tarado o de un crisol filtrante de porcelana y se lava, por lo menos cinco veces, con una solución al 2% de nitrato amónico. Después se elimina el líquido por succión lo más completamente posible, se cambia el Kitasato y se lava tres veces, succionando cuidadosamente en cada una de ellas, con acetona, absolutamente pura libre de agua, amoníaco, aldehídos. Se succiona de nuevo hasta que el precipitado quede completamente seco, en un desecador en el que se hace un fuerte vacío. A continuación se pesa inmediatamente.

Un gramo de precipitado contiene 0,01438 g de fósforo.

#### Preparación del reactivo sulfo-molibdico

( Las cantidades que figuran a continuación se refieren a un litro de reactivo ). Agitando enérgicamente se disuelven 50 g de sulfato amónico en 450 ml de ácido nítrico concentrado ( D=1.4 ). De la misma manera se disuelven 150 g de molibdato amónico en 400 ml de agua hirviendo. Después de dejar enfriar hasta temperatura ambiente, se vierte la segunda solución a chorro sobre la primera agitando suavemente, se completa hasta un litro y se mezcla bien, pasados dos días se filtra el reactivo y se conserva en un frasco ambar en lugar

fresco y obscuro.

b). Micrométodo con determinación colorimétrica o fotométrica del fósforo.

Los valores obtenidos son más exactos cuando se emplea, para la formación del color, una cantidad de 0,1 mg de fósforo en 25 ml del volumen final. Han de tomarse, por lo tanto, las cantidades alícuotas correspondientes de las soluciones de cenizas preparadas según a ).

Las pipetas utilizadas para las medidas deberán estar calibradas con la máxima exactitud. En el caso de materiales ricos en fósforo es con frecuencia conveniente realizar una nueva dilución. Además la solución utilizada para el análisis debe ser neutralizada exactamente en presencia de fenoltaleína ( dicha neutralización puede realizarse con mayor comodidad en la dilución intermedia señalada ).

Para el análisis fotométrico se pipetea a continuación en un matraz aforado de 25 ml ; 5, 10 o 20 ml , según el contenido en fósforo. Se añaden primeramente 1 ml de ácido molibdico y a continuación 1 ml de solución de hidroquinona y se deja durante cinco minutos agitando suavemente de vez en cuando . En este momento se añade a cada matraz 1 ml de solución carbonato-sulfito sódico y se afora con agua. Pasados unos 5-10 minutos se puede medir en el fotómetro. La cantidad de fósforo presente se calcula con ayuda de una curva patrón, que se obtiene tratando del modo descrito cantidades exactamente -

medidas de una solución standard.

Reactivos :

1. Solución de ácido molibdico; se disuelven 10 g. de molibdato - amónico en 200 ml de  $H_2SO_4$  , calentando ligeramente y filtrando en caso necesario.
2. Solución de hidroquinona : se disuelven 2 g. de hidroquinona en agua, se completa 100 ml y tras añadir 0,1 ml de  $H_2SO_4$  concentra\_ do se conserva en un frasco ambar.
3. Solución de carbonato sulfito-sódico :
  - a). Se disuelven 200 g de carbonato sódico con agua, en un volu - men de un litro.
  - b). Se disuelven 200 g de sulfito sódico con agua, en un volumen de un litro.

En el momento de usarlos se mezclan dos partes de la solución a ) -- con una parte de la solución b ). Debe conservarse la solución bien - cerrada y prepararla de nuevo cada dos semanas aproximadamente .

4. Solución standard de fósforo : Se disuelven 4,386 g de fosfato - monosódico seco en un matraz aforado de 1.000 ml. Esta solución - base contiene 1 mg de fósforo por ml. Para utilizarla se diluyen - 25 ml hasta 500 en un matraz aforado. Antes de aforar se añaden -- unos cuantos ml de ácido sulfúrico concentrado puro.



#### 4. Potasio

La exactitud del análisis no depende de una determinación exacta de " K " en la solución analítica, pero se obtienen los mejores resultados calcinando suficiente material para que en cada determinación se trabaje con 30-40 mg de K. Para cada mg de K se precisan alrededor de 0.5 ml del reactivo de precipitación. Se calcinan totalmente a  $550^{\circ}$  y con el mayor cuidado la cantidad correspondiente de sustancias a analizar, se lavan varias veces las cenizas con agua bidestilada hirviendo, se filtra en un vaso de precipitados de 250 ml y en caso necesario se diluye hasta un volumen de 100 ml. A continuación se acidula débilmente con ácido acético, se añaden dos gotas de una solución 0.2 N de  $AlCl_3$  se calienta hasta unos  $70^{\circ}C$  y se añaden, agitando continuamente 20 ml de una solución de " kalignost " preparado con arreglo a las prescripciones . Se deja enfriar, se filtra el precipitado a través de un filtro de porcelana porosa tarado, se lava con agua débilmente acidulada con ácido acético y se deseca en la estufa a  $120^{\circ}C$ . El peso constante se alcanza rápidamente (1/2-1 hora ).

1 g de precipitado contiene aproximadamente 0,1091 g de K.

Preparación del reactivo de precipitación : Se disuelven en un litro de agua bidestilada 34.2 g de "kalignost" ( tetrafenilborosodio ), se añaden a la solución cinco gotas de una solución 0.2 N de  $AlCl_3$  y alrededor de 1 ml de una solución al 1% de LiCl, se deja en reposo --

hasta el día siguiente. Se filtra a través de un filtro de pliegues y se conserva la solución en un frasco de polietileno. Se puede conservar durante algunas semanas.

#### 5. Determinación de Sodio.

El método que vamos a describir sólo es utilizable cuando la sustancia problema no contiene cantidades elevadas de potasio. Si existe un exceso de potasio los valores que se obtienen para el sodio son demasiados altos y por lo tanto erróneos. El nivel máximo de potasio tolerable corresponde a una concentración de 20 mg de potasio en 1 ml en la solución analítica obtenida con arreglo a las indicaciones que se describen seguidamente. Por lo tanto por este procedimiento se puede determinar el sodio en los productos de origen animal. En todas las demás sustancias debe conocerse de antemano el contenido en potasio, caso de que estén presentes cantidades altas de potasio y sin embargo sea necesario un análisis gravimétrico exacto del sodio hay que eliminar el potasio como perclorato según el método descrito.

Para cada determinación se necesita la presencia de 1-8 mg de Na -- por 1 ml de la solución. Esta concentración se obtiene al calcinar en una cápsula de platino a 550°C como máximo, 30 gramos de la sustancia problema desecada al aire. Las cenizas se hierven varias veces con agua destilada, el residuo se filtra y se lava con agua, el filtrado se concentra hasta alrededor de 5 ml y se afora en un matraz pequeño

de 10 ml.

" Nota importante " : En el caso de materiales ricos en fósforos y pobres en calcio, esto es, todas las sustancias con excepción de la hierba verde y el heno, la cantidad pesada de mezcla antes de la calcinación con 1-2 g de hidróxido de calcio finamente pulverizado - - - - (  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , p.a. ) .

De la solución obtenida se pipetea 1 ml en un vaso de precipitados de 50 ml. Se mezcla con 10 ml del reactivo, se succiona fuertemente cada vez y se lava todavía cinco veces más con solución alcohólica , por último, varias veces con éter puro. Después se pasa aire mediante succión el tiempo necesario para que desaparezca el éter totalmente. Seguidamente se guarda el crisol en el desecador durante algunas horas y se pesa.

1 g. del precipitado contiene 0.01495 g. de Na.

Reactivos.

Se tratan 10 g de acetato de uranilo con 6 g de ácido acético al 30% y calentando se disuelven en una cantidad tal de agua que resulten --- 65 g de solución. De igual modo se disuelven 30 g de acetato de -- cinc con 3 g de ácido acético al 30% y agua hasta 65 g. Se mezclan - a continuación ambas soluciones, se filtra después de 24 horas y se conserva en un frasco de polietileno.

Solución de lavado :

Alcohol al 96% saturado con acetato de uranilo cáncico-sódico.

Recuperación del acetato de uranilo : Se reunirán los precipitados de valorar el sodio ; a partir de los filtrados se precipitan las cantidades restantes del reactivo con exceso de solución de NaCl. Se disuelve el material así obtenido en HCl diluído, se evapora hasta desecación en una cápsula de porcelana y se elimina la mayor parte del cinc en forma de cloruro de cinc, por sublimación, a 600°C.

El residuo obscuro se disuelve en ácido nítrico y se precipita con amoníaco, este proceso se repite, se procede luego a una doble disolución y precipitación en ácido acético al 30% y amoníaco. El precipitado final obtenido se disuelve en la cantidad estrictamente necesaria de ácido acético y la solución se concentra fuertemente al vacío; de este modo cristaliza la mayor parte del acetato de uranilo. La solución madre que queda se emplea en las nuevas determinaciones. Se puede también evaporar hasta desecación total y emplear el residuo sin más como material de partida para la precipitación de nuevo reactivo de precipitación.

Determinación de potasio y sodio, por fotometría de llama.

a). Se incineran en la mufla del modo ya descrito, 2 g de heno o las cantidades correspondientes de otro material analítico; las cenizas se disuelven en un poco de agua, más de 5 ml de ácido clorhídrico concentrado y se afora en un matraz aforado de 100 ml. Esta solución se mide en un foto -

metro de llama, para lo cual se valora la medición del galvanómetro - con ayuda de una curva patrón.

#### Trazado de la curva patrón.

En un matraz de 100 ml se ponen 0.9534 g de cloruro de potasio ( para análisis ) más 5 ml de ácido clorhídrico concentrado y se afora con agua. Un mililitro de esta solución standard contiene 5 mg de potasio. Se prepara una serie de matraces de 100 ml con 1, 3, 5, 7, 10, 12 y 15 ml de la solución standard y en cada caso con 2 ml de ácido clorhídrico 6 N aforando con agua; se mezclan bien y se determina el giro - ( o desviación ) del galvanómetro en el fotómetro de llama, con una -- longitud de onda de 767 milimicras o empleando un filtro correspondiente.

#### b). Determinación de potasio y sodio.

Se incineran del modo descrito anteriormente en : a) 2 gr de heno o - la cantidad correspondiente de otro material analítico y las cenizas se disuelven en ácido clorhídrico. La solución se trata en un vaso de -- precipitados de 250 ml con 20 ml de agua y 5 ml de solución al 20% - de acetato de amonio, se calienta hasta ebullición y se deja reposar - dos horas a temperatura ambiente.

A continuación se filtra a través de un filtro duro libre de cenizas, en matraz aforado de 100 ml se lava cuidadosamente el vaso y el precipitado con 10 ml en total de solución diluída de oxalato de amonio.

( Dos partes de solución saturada en 100 partes de agua ), se añaden al matraz 5 ml de ácido clorhídrico 6N y se afora. Después de homogeneizar cuidadosamente se determina la desviación galvanométrica en el fotómetro de llama, para el potasio como en a ) y para el sodio con una longitud de onda de 598 milimicras o el filtro correspondiente.

El contenido en sodio se determina mediante comparación con curva patrón, que se prepara con soluciones de contenido conocido de potasio y sodio.

Además de la solución standard de potasio que figura en a ) se utiliza una solución standard de sodio de la siguiente composición :

0.5084 g de cloruro de sodio se disuelven en agua en un matraz aforado de 1.000 ml y se completa hasta aforar 1 ml de esta solución standard contiene 0.2 mg de sodio.

Las desviaciones galvanométricas obtenidas para el sodio son influenciadas por el contenido variable de potasio en la solución analítica -- ( por lo menos en las mediciones en el espectrofotómetro ) con una fuerte reducción de las longitudes de onda medidas. La influencia es todavía más fuerte utilizando fotómetros ordinarios que permiten el paso de una gama mayor de longitudes de onda.

Deben prepararse, por tanto, una serie de curvas patrones con soluciones de contenido variable de potasio y sodio. Para ello se necesitan ocho series de cada una de ellas en cuatro matraces aforados, --

de 100 ml ( en total, por tanto, 32 matraces ). Cada cuatro matraces sirven para la determinación de una curva patrón. A continuación a cada uno de los cuatro primeros matraces se añaden por el siguiente orden :

1 ml de solución standard de potasio, 5 ml de solución saturada de oxalato de amonio, 5 ml de solución de acetato de amonio al 20%, 10 ml de solución diluida de oxalato de amonio y 5 ml de ácido clorhídrico 6N. En el primero de los matraces se añaden después 0.5 ml en el 2 afora 3.0 ; en el 3 6.0 y en el 4 10.0 ml de solución standard de sodio. Se afora con agua, se mezcla bien y se determina la desviación galvanométrica ; para el sodio en el fotómetro de llama empleando una longitud de onda 589 milimicras o el filtro correspondiente.

Esta serie de mediciones proporciona la primera curva patrón. Se trazan otras curvas patrón para las cantidades anteriormente dadas de solución standard de sodio ( 0.5 ; 3.0 ; 6.0 y 10.0 ml ), con cuatro matraces cada vez, que contengan 2 ml; 3 ml; 4 ml; 5 ml; 6 ml; 7 ml y 8 ml de la solución standard de potasio.

Partiendo de 2 g de material analítico, las cantidades utilizadas de potasio corresponden a una concentración de 0.5%; 1%; 1.5%; 2%; 2.5%; 3%; 3.5% y 4% de potasio, en el alimento. Puede, por lo tanto,

decidirse tras las determinaciones del potasio, que curva patrón debe tomarse para la lectura del contenido en sodio.”

#### 7. Determinación del cloro en forrajes.

El contenido en cloro de forrajes puede oscilar entre 1 y 50 g en --- 1.000 g de sustancia seca.” La pesada del material analítico, desecado al aire y finamente triturado, oscila entre 20 y 30 g en sustancias pobres de cloro ( granos de cereales y pajas ), de 5-10 g en materiales de un contenido medio en cloro ( buen heno de prado, hierva verde, etc. ), y de 1-3 g para materiales ricos en cloro ( hojas de remolacha azucarera, hoja de remolacha forrajera, harinas de pescado saladas, leche desecada ).

La muestra pesada se mezcla en el mortero con un exceso de carbonato de sodio libre de agua, se pasa cuantitativamente a un crisol de platino o niquel y se recubre con una capa de carbonato de sodio puro. Se calcina completamente en la mufla a 550-660°C. El contenido del crisol se arrastra con agua a un vaso de precipitados, se añde tal cantidad de agua que todos los componentes solubles queden - bien disueltos y se neutraliza con ácido nítrico al 25% . En la solución así obtenida se determina a continuación el cloro mediante titulación con nitrato de plata. y sulfocianuro de amonio según el método de Volhard.



1 ml de la solución N corresponde a 0.003546 g de Cl.

## 8. Azufre.

El azufre se presenta en los forrajes en diversas formas; unas veces como sulfato inorgánico, otras veces en uniones orgánicas en cuyo caso podemos encontrar diferentes posibilidades. La mayor parte del azufre en forma orgánica se encuentra en la proteína. Esta forma predomina de tal manera que puede considerarse como azufre proteico la diferencia entre el azufre total y el azufre en forma de sulfato. La determinación del azufre en forma de sulfato es muy sencilla. Se realiza según la forma clásica en un extracto acuoso de dos forrajes tras precipitación de las proteínas por transformación de sulfato de bario. Por el contrario la determinación de azufre total es difícil por que se hace necesario un ataque muy intenso para transformar el azufre orgánico en una forma unitaria fácilmente analizada. Para ello se emplean tanto el ataque oxidante como el reductor. La determinación del azufre total por reducción a sulfuro es la mejor, es decir, la forma más rápida y exacta, siendo necesario mucho material por lo tanto resultando incosteable.

## V. ANALISIS ESPECIALES DE METALES PESADOS.

La significación de éstos elementos minerales, que se presentan en concentraciones relativamente escasas, es cada día más sobresaliente, habida cuenta de su significación biológica y de su modo de acción en el organismo vivo. Un análisis de los metales pesados en forrajes solo es de interés cuando se presentan enfermedades carenciales que pueden prevenirse o curarse mediante una alimentación adecuada. En los análisis ordinarios, generalmente, solo se determinan alguno de los numerosos elementos posibles dada su significación biológica específica. Los análisis más frecuentemente necesarios son los de hierro, manganeso, cobre, cobalto, en tanto que el problema de la determinación de zinc, yodo y molibdeno solo se presenta en casos aislados. La concentración de los citados elementos es muy variable y los métodos de su determinación de muy diversa sensibilidad. Para la determinación analítica exacta del cobalto, que se encuentra en muy pequeña concentración, es preciso tratar una cantidad relativamente grande de forraje, en tanto, que en el caso del hierro y del manganeso, por ejemplo, son suficientes cantidades mucho menores del producto a analizar.

Dado el interés que generalmente existe por la determinación conjunta de cobre y cobalto describiremos una marcha analítica con la que puedan analizarse todos ellos paralelamente.

La pesada total del producto problema se hace en relación con el Co, por que es el elemento que se presenta en la concentración más baja. Si se quiere determinar únicamente Fe o Mn se opera del mismo modo pero cantidades más pequeñas del producto. Este extremo se indicará en particular, para cada uno de los métodos que a continuación se describen. En cada caso concreto es conveniente conocer ( con ayuda de las tablas correspondientes ) las concentraciones de elementos que existen en un forraje, para que, en función de ello, podamos determinar la cantidad de producto a utilizar.

Todos los reactivos usados en la determinación de los elementos deben ser absolutamente puros. El agua ( y en caso necesario el ácido nítrico y el amoniaco ) será recientemente destilada . Todos los recipientes e instrumentos de porcelana y vidrio deben limpiarse con ácido nítrico caliente y agua.

#### Determinación de Fe, Mn, Cu y Co .

Incineración del producto y preparación de la solución de cenizas :

Una cantidad apropiada del producto finamente molido y desecado al aire ( para heno por ejemplo, 50 g ) se calcina en una cápsula de porcelana, cuarzo o platino a 500°C en la mufla. Las cenizas se humedecen con agua y con 15 ml de HCl al 20% y se calientan en baño de agua hasta disolución completa.

Cuando se forman grandes cantidades de residuo insoluble en ácido, lo más correcto es filtrar este residuo y lavarlo cuantitativamente.

El filtrado y el agua de lavado se deben concentrar al baño maría -- hasta que se pueda pasar la solución a un matraz aforado de 50 ml.

### 1. Determinación del Hierro.

a). Caso de que el producto tenga un contenido elevado en Fe.

Del matraz aforado de 50 ml que contiene la solución de cenizas preparadas por el método descrito, se toman 2 ml y se diluyen, aproximadamente con 10 ml de agua, en un matraz aforado de 25 ml. En caso de que en el producto se vaya a determinar solo Fe, se calcina del modo anteriormente descrito 2 g del producto a analizar, se diluyen las cenizas según las instrucciones y se arrastran, con -- 10 ml de agua en total, al matraz aforado de 25 ml. Se tratan con unas gotas de agua oxigenada al 30%, se hierve durante unos minutos, se deja enfriar a temperatura ambiente, se añaden 2.5 ml de HCl concentrado y 2.5 ml de solución de sulfocianuro de amonio al 10%, se afora y se agita cuidadosamente .

La coloración roja obtenida se mide en el fotómetro con luz de longitud de onda de 250 mili micras y se calcula la concentración con -- ayuda de una curva patrón. Para obtener los valores de la curva patrón se prepara, por pesada rigurosa, una solución de cloruro férrico HCl 2 N, que contenga 1 mg de Fe por ml, a partir de esta solución base se preparan las soluciones standard mediante dilución -- con HCl2N.

b). Caso de que el producto contenga muy poco Fe.

Hay que separar completamente de la solución de cenizas el ácido clorhídrico y el silícico. La solución clorhídrica de cenizas, procedente de 5 g del producto a analizar, se calienta cuidadosamente con 5 ml de ácido sulfúrico al 25% en baño de arena, en una cápsula de porcelana o cuarzo, hasta la aparición de vapores sulfúricos. Se recoge el residuo cuidadosamente, una vez que ha sido enfriado en agua, se pasa a un matraz aforado de 25 ml, se lava y se afora el filtrado con agua.

Se toma 1 ml de la solución obtenida ( que corresponde a 0.2 g de producto ), se pasa a un matraz aforado de 25 ml y se neutraliza con hidróxido de sodio 2N, empleando fenolftaleina como indicador. Se añaden 2 ml de una solución de ácido sulfuroso al 5-6% y a continuación 1 ml de otra solución de 1 g de dipiridil en 100 ml de HCl 10N; se agita, se afora con agua, se agita de nuevo y se deja reposar una hora. Después se mide la coloración roja en el espectrofotómetro con luz de longitud de onda de 490 milimicras. La valoración se realiza con ayuda de una curva patrón, que se traza con una solución standard, para lo cual se diluyen hasta g de sulfato ferroso de amonio para análisis en  $H_2SO_4$  1N, 1 ml de esta solución contiene 0.1 mg de Fe.

Se diluye sucesivamente y se construye la curva patrón con cantidades que oscilan entre 0.025 mg y 0.1 mg de Fe.

## 2. Determinación del Manganeso.

a). En alimentos de origen vegetal.

Según el contenido en Mn se precisan para una determinación 2-5 g de sustancia problema. De la solución de cenizas ya preparada para determinar minerales se toma con una pipeta la cantidad correspondiente, o bien, en casos especiales, se calcina de 2-3 g de sustancia en un crisol de porcelana o en una cápsula de calcinación. Se añaden a la solución o a las cenizas brutas 2 ml de ácido fosfórico concentrado y se calienta en baño de aire o en un hornillo eléctrico hasta eliminación total de HCl.

Si existen grandes cantidades de cenizas insolubles en ácido ( arena y arcilla ), es conveniente realizar otro tratamiento. Las cenizas brutas se calientan en baño maría con un poco de agua y 2 ml de ácido fosfórico concentrado, después se filtran cuantitativamente a través de un pequeño filtro libre de cenizas.

El filtrado y el agua de lavado se calientan al vapor en una cápsula de porcelana, hasta evaporación total del agua y seguido se calentará, como se ha descrito anteriormente, hasta eliminación total de HCl.

El residuo así obtenido se diluye en una pequeña cantidad de agua, - se arrastra a un matraz aforado de 25 ml y se añade 1 ml de solu - ción de nitrato de plata al 5% y 2 g de persulfato de potasio. A con - tinuación se calienta durante 30 minutos a baño maría y después de - dejar enfriar a temperatura ambiente, se afora y se mide la intensi - dad de color del permanganato formado. En caso de que la solución no esté del todo clara se centrifuga brevemente en un tubo limpio y seco, utilizando inmediatamente la solución clarificada para la de - terminación colorimétrica o fotométrica.

La medición se realiza a la longitud de onda de 530 milimicras.

La valoración de las mediciones se hace con ayuda de una curva pa - trón, que se obtiene tratando una cantidad exactamente medida de so - lución standard de sulfato de manganeso, de la misma manera que - se hizo para el análisis.

La utilización del permanganato potásico no es aconsejable.

Preparación de la solución standard.

Se deseca cuidadosamente a 200-250°C sulfato de manganeso puro - hasta peso constante. Después se disuelven en agua destilada, den - tro de un matraz aforado de 1.000 ml, 0.2749 g de la sal y se afora. 1 ml de esta solución standard contiene 0.1 mg de manganeso.

b). En alimentos de origen animal.

El manganeso se encuentra en el organismo animal en cantidades mu - cho más pequeñas que en los vegetales. Para análisis es necesario -

cantidades mucho mayores del producto a fin de obtener la cantidad de 0.05 mg de manganeso que es necesario para una determinación. Además la marcha analítica debe modificarse ligeramente. Es necesario limpiar cuidadosamente todo el instrumental con HCl diluido ( 1 : 4 ) caliente y después aclarar con agua pura destilada.

25 g de la sustancia a analizar desecada al aire y finamente triturada ( 50 g en caso de material muy pobre en manganeso ), se calcinan en una cápsula de porcelana a 550-600°C. Las cenizas se calientan 25 minutos a baño maría con 25 ml de ácido fosfórico concentrado ( D=1.70 ) analíticamente puro, y con 30 ml de agua destilada. Después de enfriar se filtra, a través de un filtro lo más pequeño posible exento de cenizas, se pasa a un matraz aforado de 50 ml y se lava cuantitativamente evitando emplear cantidades excesivas de agua. Seguidamente se añaden unos 0.3 g de peryodato de potasio y se calienta el matraz 30 minutos a baño maría hirviendo hasta aparición completa del color del permanganato.

Después de enfriar se afora y se mide la intensidad de color de la solución colorimétricamente, frente a muestras standard de contenido conocido en manganeso ( que fueron preparadas de la misma manera ), o fotométricamente con luz de longitud de onda de 530 milimicras.



En el caso de cantidades muy grandes de cenizas, que en determinadas circunstancias pueden dar lugar a precipitados salinos, al enfriar el extracto, se concentra la solución obtenida hasta aproximadamente 20 ml se deja enfriar, se decanta el precipitado obtenido, se lava con pequeñas cantidades de agua y se trata de la manera anteriormente descrita.

### 3. Determinación de cobre.

La solución de cenizas obtenidas a partir de 10 g del producto problema se mezcla bien, en un embudo de separación de 150 ml, con 10 ml de agua más 1 ml de una solución saturada de  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  más 4 ml de solución de citrato de sodio ( 500 g de citrato de sodio neutro en un litro de agua ) y algunas gotas de fenolftaleína. Se añaden además 4 ml de amoníaco concentrado, 1 ml de una solución de 1 g de dietilditiocarbamato sódico en 100 ml de una solución de NaOH 100N y 15 ml de toluol, agitando vigorosamente durante varios minutos. A continuación se añaden 10 ml de NaOH N, se agita otra vez enérgicamente durante 5 minutos, se deja reposar cuidadosamente, se separa la solución de toluol y se mide espectrofotométricamente a 430 milimicras. Los valores para comparación se obtienen con una solución estándar de sulfato de cobre. Se disolverá sulfato de cobre cristalizado en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  N. La concentración de cobre se valora electrolíticamente y se prepara la solución seguidamente de manera que contenga

0.1 mg de Cu por ml .

#### 4. Determinación de Cobalto.

Aproximadamente son necesarios para cada determinación de 10-20 microgramos de cobalto ( 30 microgramos como máximo ). Se incinera una cantidad adecuada del producto a analizar según descrita anteriormente, se diluye en HCl se lleva a un volumen de 50 ml. Se mide exactamente la cantidad de solución correspondiente al contenido en cobalto y se deposita en un matraz Erlenmeyer de 250 ml con tapón esmerilado, se añade 1 ml de ácido nítrico concentrado (  $D=1.4$  ) y la cantidad de agua necesaria para que el volumen total sea de 5-75 ml . Después se calienta hasta ebullición y se añaden inmediatamente al mismo tiempo que se agita suavemente, 10 ml de solución alcalina caliente de citrato de sodio ( 500 g de citrato de sodio neutro más 20 g de hidróxido de sodio disueltos en un litro ) y 30 ml de solución caliente de acetato de sodio ( 500 g de acetato de sodio cristalizado disueltos en un litro ). Después de mezclar cuidadosamente se trata con 1 ml de una solución de - nitroso - naftol - ( 1 g de sustancia disuelta en 100 ml de ácido acético gacial ) y se deja reposar 10 minutos. A continuación se añaden, agitando fuerte y constantemente, 20 ml de toluol y se deja enfriar. En este momento se pasa la solución cuantitativamente a un embudo de separación de 200 ml, se agita mecánicamente durante cinco minutos. Se dejan separar las capas y se elimina la capa acuosa. A continuación se lavan

el tapón y la pared del embudo separador con un poco de agua destilada. La solución de toluol se agita todavía dos veces más, una a continuación de otra y cada vez durante cinco minutos, con 15 ml de NaOH 2 N, eliminando después la solución de hidróxido de sodio. La solución de toluol de color rojo pálido a rojo rubí se mide en el espectrofotómetro en una longitud de onda de 530 milimicras y en capa de 5 cm de espesor.

Es posible efectuar la determinación tal como se ha descrito, cuando la preparación de la solución de cenizas se realiza de manera exactamente conocida, de tal modo que la concentración de ácido acético, tras la adición de acetato de sodio sea, por lo menos, del 5%. Si esto no es seguro, se añaden a la solución enfriada ligeramente después del calentamiento con ácido nítrico, 10 ml de solución de citrato de sodio alcalino y la cantidad necesaria de NaOH N, para enrojecer justamente la fenolftaleína ( algunas gotas ). A continuación se acidifica con 5 ml de ácido acético glacial, se calienta en baño de agua hasta ( 90°C ) se añade 1 ml de solución - nitroso - naftol y se procede seguidamente como se ha descrito anteriormente.

Las medidas fotométricas se valoran por medio de una curva patrón, que se prepara con una solución standard de cobalto. En primer lugar se prepara una solución madre de cobalto de concentración conocida, para ello se desecadurante una noche, o por lo menos durante 12 horas a 300°C sulfato de cobalto comercial que contiene agua-

de cristalización (  $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2$  ), para obtener sulfato de cobalto -- anhidro. Se deja enfriar en el desecador, sobre pentóxido de fósforo, se pesan 0.2629 g de sulfato de cobalto anhidro, los cuales se llevan a un matraz aforado de 1.000 ml, aforando con ácido sulfúrico 2N 1 ml de esta solución , medido con pipeta rigurosamente contrastada y se diluye a un litro en un matraz aforado 1 ml de esta solución contiene 1 g de cobalto.

#### 5. Determinación del Cinc.

En la actualidad el mejor procedimiento para determinar el Zn en forrajes se basa en la reacción con ditizona ( difeniltiocarbazona ). A causa de la extraordinaria sensibilidad de esta reacción la fase final del análisis se efectúa con cantidades de Zn muy pequeñas, generalmente del orden de 0-0.2 mg para cada determinación. Se hace por tanto necesario, un trabajo de gran precisión. Además, la ditizona no es un reactivo específico del Zn, sino que forma compuestos con muchos otros metales. En consecuencia es necesario eliminar los elementos que puedan interferir, mediante una separación analítica cuidadosamente preparada y realizada, o bien eliminarlos de alguna otra manera, por ejemplo enmascarándolas en forma de complejos que no reaccionen ya con la ditizona. Como en los casos anteriores, el análisis comenzará a partir de la solución clorhídrica de cenizas, una vez calcinando el producto problema a 500°C. Las can

tidades ha utilizar dependen del contenido en Zn de la muestra ( en caso de heno aproximadamente 0.5-1 g de sustancia desecada al aire, o la cantidad correspondiente de la solución de cenizas ), puesto que la ditizona y sus compuestos son sensibles a la luz, hay que evitar que entre la luz diurna donde se realice el análisis. Los reactivos que contienen ditizona se deben conservar en la oscuridad y ambiente frío.

#### Descripción del método.

Se deposita la solución de cenizas en un embudo de separación ( graduado de 0 a 100 ml ) y se acompleta con HCl 10N, hasta 20 ml se trata a continuación con 12 ml de una solución de acetato de sodio N y 5 ml de una solución al 10% de citrato de sodio. En este momento la solución será en general debilmente ácida ( pH 5-5.5 ). En el caso que la acidez sea mayor puede disminuirse acondicionando solución de acetato de sodio, utilizando como indicador verde de bromocresol. En este momento se añaden exactamente 2 ml de una solución al 25% de tiosulfato de sodio y 5 ml de una solución de 50 mg de ditizona en un litro de tetracloruro de carbono y se agita vigorosamente durante cinco minutos . Una vez sedimentada, se pasa la solución de ditizona a un segundo embudo de separación del mismo tipo, se agita otra vez durante dos minutos con solución de ditizona y se repite el proceso, ahora con solo 2 ml cada vez de solución de ditizona, y tantas veces como sea preciso hasta que la última solución de extracción --

tenga exclusivamente el color nítido de la ditizona. A continuación de cada separación se limpiará el tubo de salida con 1 ml de tetracloruro de carbono.

Las soluciones reunidas en el segundo embudo de separación se agitan fuertemente, con 20 ml cada vez de solución al 0.03% de sulfuro de sodio, preparado en el día; hasta que la solución de lavado permanezca incolora. Después de separar cuidadosamente, se filtra la solución roja de ditizonato de Cinc a través de un filtro pequeño libre de cenizas a un matraz aforado de 50 ml, se lava con una pequeña cantidad de tetracloruro de carbono y se afora. Después de mezclar se mide en el espectrofotómetro en una longitud de onda de 535 milimicras.

El cálculo se lleva a cabo con la ayuda de una curva patrón que se prepara de la siguiente manera : a partir de una solución de Zn que contiene 1 mg de Zn en un litro, se miden cantidades comprendidas entre 0 y 20 ml, que se completan hasta 20 ml con HCl 1N y se manipulan de la misma manera que cuando se realiza el análisis. Como base para preparar los standards se disolverán inicialmente, en un matraz aforado de un litro, 0.4398 g de  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  en ácido clorhídrico N . Esta solución contiene 100 mg de cinc. Se miden 10 ml de la solución base para la preparación de la solución standard y se afora con HCl 10N a un litro.

## 6. Determinación del Molibdeno.

El molibdeno es un micronutriente de las plantas forrajeras y tiene también cierta significación biológica en el metabolismo animal. La carencia de molibdeno debe, por tanto, ser reconocida y corregida. Por otra parte, un exceso de molibdeno en la ración resulta tóxico lo cual puede también ocurrir, en condiciones naturales, en suelos ricos en molibdeno.

### Descripción del método.

La cantidad de molibdeno necesaria para realizar una determinación debe oscilar entre 0 y 0.2 mg la cantidad correspondiente de sustancia a analizar desecada al aire ( por ejemplo, en el caso del heno de 10-20 g ), se calcina en una cápsula de porcelana a 500°C. Se llevan las cenizas a un vaso de precipitados de 250 ml se humedecen con un poco de agua y se añaden a continuación, cuidadosamente, 30 ml de HCl 5N y 20 ml de agua. Se cubre el vaso de precipitados con un vidrio de reloj, se hierve unos cinco minutos y se filtra inmediatamente a un matraz aforado de 100 ml, lavando con agua caliente; se deja enfriar, se afora y mezcla cuidadosamente.

En un embudo de separación de 150 ml, se depositan exactamente 50 ml de esta solución y se mezclan con 10 ml de una solución al 5% de sulfocianuro de potasio. Se trata además con 2 ml de una solución al 10% de cloruro estannoso (  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ) en HCl 2N y se

comprueba si adicionando más, gota a gota, no sobreviene ningún aclaramiento posterior. Se agita bien la mezcla durante un minuto y se añaden 25 ml de éter puro.

Se extrae ahora durante un minuto aproximadamente con éter, evitando una agitación intensa. En caso de formación de emulsiones que dificultan la separación se añaden unas gotas de alcohol etílico. Se separan las capas cuidadosamente, se recoge la solución etérea (de color rojo naranja a causa del sulfocianuro de molibdeno) en un tubo para colorimetría que está calibrado a 25 ml, se afora con éter y se mezcla. Se mide en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 470 milimicras, teniendo en cuenta que la lectura debe realizarse, 10 minutos después de la adición de la solución de cloruro estaneso. El cálculo se efectúa con la ayuda de una curva patrón, para cuya preparación se emplean cantidades que oscilan entre 0 y 20 ml de una solución que contenga 1 mg de molibdeno por litro. Se añaden 15 ml de HCl 5N y 1 ml de una solución de cloruro férrico 0.02 mg. Se afora con agua a 50 ml y se opera de la misma manera que para la muestra problema.

Para la obtención de los standards se diluyen 0.1490 g de  $M_2O_3$  con algunos mililitros de hidróxido de sodio (2N) se lleva la solución a un matraz aforado de un litro, se acidula con HCl diluido (2N) y se afora con agua. En esta solución se hallan contenidos 100 mg de mo





caciones hay que atenerse estrictamente, porque el yodo y los compuestos de yodo pueden ser muy volátiles.

El mejor método existente hasta ahora para la determinación de pequeñas cantidades de yodo en sustancias biológicas se basa en oxidación completa de la sustancia orgánica con ácido crómico-ácido sulfúrico ( por vía húmeda ), con lo cual el yodo pasa cuantitativamente a ácido yódico. Este último se reduce después a yodo elemental, por medio de una solución alcalina de ácido arsenioso, en un aparato especial y se arrastra de la mezcla original mediante destilación en corriente de vapor de agua. El yodo recogido de esta manera se determina después por titulación con tiosulfato.

Descripción del método.

Según el contenido en yodo, se pesan de 5 a 10 g del producto a analizar desecando al aire y finamente molido, en un matraz con cuello doble, provisto de un embudo de gotas de juntas esmeriladas y un refrigerante de reflujo esmerilado.

Como catalizador de la oxidación se deposita en el matraz 0.5 g de -- sulfato de cerio y una solución saturada en frío de trióxido de cromo en agua, inicialmente añadida gota a gota. Al comienzo del análisis y debido a la violencia de la reacción, se ha de operar con máximas precauciones; más tarde se puede añadir el oxidante más aprisa. En total se necesitan alrededor de 80 ml de solución de trióxido de -

cromo. La temperatura sólo debe alcanzar un grado tal que el vapor del agua producido pueda condensarse fácilmente en el refrigerante - del reflujo.

Se añaden en este momento por el embudo de gotas, 30 ml de  $H_2SO_4$  al 10% y seguidamente, agitando de vez en cuando, 250 ml de  $H_2SO_4$ , primeramente gota a gota y después, cuando la intensidad de la reacción disminuye, más de prisa. Debe existir un exceso de trióxido - de cromo que, a causa de su difícil solubilidad en el ácido sulfúrico concentrado, aparece el final en el depósito del fondo o en forma de espuma en la superficie. La duración total de la oxidación es de unas horas.

En este momento se quita el refrigerante y se coloca el matraz durante cinco horas en un baño de agua a ebullición intensa. Seguidamente se calienta sobre un embudo y a reflujo manteniendo la ebullición durante 30 minutos. El color de la solución se torna después verde -- limpio. Se retira nuevamente el refrigerante y, se observa atentamente, se calienta el contenido del matraz el tiempo necesario para que - aparezcan humos blancos de  $SO_3$ . Hay que evitar un calentamiento - demasiado largo para que no se libere óxido de cromo.

Se deja enfriar el contenido del matraz y se diluye con 100 ml de agua; después se fija el matraz al dispositivo de destilación, en el - cual el yodo se arrastra por medio de una corriente de vapor de a -

gua.

La disposición del aparato consta de las siguientes partes : 1. Un ma  
traz de fondo redonde de dos litros, para la producción de vapor de a  
gua, 2.º Un dispositivo de destilación, con embudo de gotas soldado  
y tubo de seguridad. 3. Pieza intermedia esmerilada para colocar --  
en el matraz de ataque con embudo de gotas soldado y aplique de des-  
tilación ajustado con tres bolas colectoras ordenadas verticalmente.  
4. Tubo de destilación con refrigerante para la condensación del des-  
tilado. 5. Tres matraces colectores como recipientes de absorción  
del yodo destilado. 6.º Regulador de vacío de mercurio para control  
de la trompa de agua. Las partes principales del aparato están uni-  
das entre sí mediante junstas esmeriladas con arreglo a las normas  
industriales.

Antes de colocar el matraz de ataque se calienta el agua hasta ebulli  
ción para el arrastre con vapor. En el primer matraz colector se  
deposita 1 ml de solución al 16% de carbonato de potasio - 20 ml de  
agua; en el segundo 0.3 ml de solución de carbonato de potasio - 10  
ml de agua y en el tercero 5 ml de agua. Una vez montado totalmen-  
te el aparato se hace funcionar la trompa de agua y se comienza el -  
arrastre al vapor. A consecuencia del descenso de presión y del ca  
lor que el vapor de agua le comunica, comienza a hervir el contenido  
del matraz de ataque. Inmediatamente después se dejan gotear lenta-  
mente 70 ml de solución reductora. En total se recogerán en los ma

traces colectores 150-200 ml aproximadamente. Se termina la destilación y se retiran los matraces colectores del aparato mientras está todavía funcionando la trompa de agua. En una cápsula de 50 ml se van evaporando hasta desecación las distintas porciones de los destilados de los matraces colectores. El residuo obtenido se humedece con dos gotas de agua y se mezcla durante algunos minutos con 15 ml de alcohol del 96% .

La extracción con alcohol se repite todavía dos veces más. Los extractos se evaporan hasta desecación en el baño de agua, el residuo se disuelve en unos cuantos ml de agua y se lleva cuantitativamente a un matraz Erlenmeyer de 25 ml.

Se añaden unas gotas de solución de anaranjado de metilo ( 0.1% ), -  $H_2SO_4 2N$ , primero gta a gta hasta neutralización, después dos gotas más y finalmente cinco gotas de agua saturada de bromo. El contenido del matraz bien mezclado se concentra hasta 1-1.5 ml por calentamiento cuidadoso a llama débil. Se deja enfriar, se añaden unos granitos de yoduro de potasio y 2 ml de una solución de almidón al 0.3%, se titula inmediatamente con una microbureta ( 1 ml de capacidad y divisiones de 0.001 ml ), con tiosulfato sódico 500N, hasta desaparición de la coloración azul. La solución de tiosulfato se preparará en el día, a partir de una solución 10N y su actividad se determina mediante titulación con una solución standard de yodo, que contenga exactamente 0.02 mg de yodo y que se tratará de la misma ma

nera que la solución del residuo de destilación del análisis propiamente dicho.

Preparación de la solución standard.

En un matraz aforado de un litro se colocan 0,1308 g de yoduro de potasio con 2 ml de la solución de carbonato de potasio al 16% y se afora con agua destilada a partir de agua alcalinizada. Para la valoración de la solución 500N de tiosulfato, se miden 10 ml de esta solución y se llevan a un volumen de 100 ml en un matraz aforado.

Un ml de esta solución standard contiene 0,01 mg de yodo.

## C O N C L U C I O N E S .

En este trabajo están expuestos los métodos más recientes - en investigación química agropecuaria, en su mayoría son - rápidos y altamente sensibles, sólo que para la realización - de éstos es necesario tener práctica, así como conocimientos de los instrumentos empleados, el manejo de sustancias y reactivos.

Cuantitativa y cualitativamente éstos métodos son los mejores seguros y exactos ya que por ejemplo el exceso de los metales inorgánicos en los forrajes podría ser fatal para cualquier ser viviente.

Los métodos presentados son los que se emplean rutinariamente en diversos países principalmente en Europa y Estados Unidos por laboratorios analíticos químicos.

Los países que aportan la mejor importación científica son Alemania, Holanda, Suiza, Noruega, Estados Unidos y Austria, éstos llevan el avance mundial agropecuario con razas de ganado vacuno productivo y finos como los son : CHAROLAIS - - - HOLSTEIN, MAVERICK, ROCKEFORD etc.

La importancia del desarrollo de técnicas nuevas para el análisis de forraje radica principalmente en el mejoramiento del -

desarrollo de animales de interés comerciales.

Aquí se describen dichos métodos con el fin de recopilar las --  
nuevas metodologías desarrolladas así como para despertar el  
interés del desarrollo de nuevas técnicas, y la incorporación -  
de dichas técnicas a los métodos rutinarios en el análisis de fo  
rrajes.



## VII BIBLIOGRAFIA

- 1.- PASTURE AND RANGE RESERCH TECHNIQUES.  
AMERICAN SOCIETY AGRONOMY.  
ITHACA, N. Y.  
COMSTOCK PUB. ASSOCIATES 1972.
  
- 2.- TROPICAL PASTURE AND FUDDEN  
PLANTS N. Y.  
LONG, MAIN 1977
  
- 3.- MEETING OF SOCIETY FOR RANGE MANAGEMENT.  
WYOMING, ANUALL 1976.
  
- 4.- PASTOS:  
ANTONIO SUAREZ Y SUAREZ  
ACRIBIA 1972.  
MEXICO, D. F.
  
- 5.- ORGANIZACION DE LAS NACIONES UNIDAS.  
PARA LA ALIMENTACION Y QUIMICA ORGANICA AGRICOLA  
INGLATERRA, 1972
  
- 6.- UNITED STATES BUREAU OF PLANT.  
INDUSTRY, DIVISION OF FORAGES.  
WASHINGTON, 1979.  
CONTINENTAL U. S. AND CANADA

7.- DAIRY CATTLE FEEDING AND MANAGEMENT.

RIVES PAUL, HENDERSON HORNGOROM.

WILEY 1967 N. Y.

8.- FORRAJES FERTILIZANTES Y VALOR NUTRITIVO.

JUSCA FRESSA BAUDILLO

AÉDOS BARCELONA 1974

9.- ALIMENTOS DEL GANADO.

MORRISON FRANCK B.

UTEHA 1975.

10.- TEXAS GANADO CATTLE FEEDERS HAND BOOK.

TEXAS A & M UNIVERSITY SYSTEMS.

TEXAS AGRICULTURA EXTENSION STATION COLLAGE.

11.- PRODUCTIVIDAD DE LA HIERBA.

CARLOS LUIS DE CUENCA.

TECNOS 1971, MEXICO

12.- ESTUDIO DE LOS SUELOS.

MANEJO DE PLANTAS FORRAJERAS, ALIMENTOS DE ORIGEN INDUSTRIAL.

CASTANÓN APATIGA ALEJANDRO

MEXICO, UTEHA 1971.

13.- THE FEEDLOT PASTIZALES.

PHILADELPHIA, 1972

LEA 8 FEBIGEN.

14.- ESTADOS UNIDOS AGRICULTURA.

ESCUELAS VETERINARIAS DE ESTADOS UNIDOS.

ANUARIOS, N. Y. 1973-1976

15.- FERTILIZANTES Y SUS USOS.

COOKE GEORGE WILLIAM.

CONTINENTAL 1976 MEXICO.

16.- INSTITUTO TECNOLOGICO DE ESTUDIOS SUPERIORES DIVISION DE -  
AGRICULTURA Y MARITIMAS.

MONTERREY, MEXICO.

INFORME DE INVESTIGACION MONTERREY, 1976.

17.- QUIMICA AGRICOLA CONGRESO, MICRONUTRIENTES EN AGRICULTURA.

TENNESSEE VALEY AUTHORITY

COMITE MADISON SOIL SCIENCE OF AMERICA.

18.- PASTIZALES:

UNIVERSITY OF OKLAHOMA, 1973

19.- PASTIZALES:

HEADY HAROLD F.

ACRIBIA, 1970

20.- PASTIZALES:

SMITH ARTHUR.

N.Y. Mc GRAW-WILL, 1975.

21.- FORAGES, THE SCIENCE OF GRASS LAND, AGRICULTURE.

HUGHES, HAROLD DE MATT.

2<sup>a</sup> ED. IOWA STATE UNIVERSITY 1978.

22.- SEMINARIO INTERNACIONAL DE GANADERIA TROPICAL.

SECRETARIA DE AGRICULTURA Y GANADERIA.

ACAPULCO, GUERRERO, 1976.

23.- MANUAL DE METODOS ANALITICOS NUTRICION ANIMAL.

BATEMAN JOHN VICTOR.

HERRERO HERMANOS, MEXICO 1970.

24.- DETERMINACION MICROSCOPICA DE LOS COMPONENTES -  
DE LOS FORRAJES.

FERNANDO RAYMOND.

ACRIBIA ZARAGOZA, 1968.

- 25.- AGRICULTURA Y LA ALIMENTACION O. N. U.  
M. NARAYNA RDA.  
ROMA 1975.
- 26.- VALOR NUTRITIVO DE LOS ALIMENTOS.  
FISHER B.  
LIMUSA MEXICO, 1977.
- 27.- NUTRICION ANIMAL.  
Mc DONALD PETER.  
LONDRES LONGMAIN.  
2<sup>a</sup> EDICION 1973.
- 28.- DEPARTAMENT OF SAILS AND PLANTS NUTRITION,  
UNIVERSITY OF CALIFORNIA.  
RESEARCH CENTER AND AGRICULTURAL EXPERIMENT STATION.  
RIVERSIDE 1878.
- 29.- FORAGES  
HEATH MAURICE E.  
3a ED. AMES.  
THE IOWA STATE UNIVERSITY 1975.