

2ej  
73



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“REVISIÓN DE MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE HIERRO EN ALIMENTOS Y BEBIDAS”**

**TRABAJO MONOGRAFICO**

**Que para obtener el título de  
Químico Farmacéutico Biólogo**

**p r e s e n t a**

**PATRICIA DE LA LUZ MARTINEZ FUENTES**

**México, D. F.**

**1986**



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

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

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

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

## I. INTRODUCCION

## II. METODOS

### II.1. Consideraciones para el Análisis.

II.1.1. Limpieza del Material.

II.1.2. Reactivos a Utilizar.

II.1.3. Tipo de Muestra y su Preparación.

II.1.4. Métodos de Cuantificación.

II.1.4.1. M. Gravimétricos.

II.1.4.2. M. Volumétricos.

II.1.4.2.1. Oxido-Reducción.

II.1.4.2.2. Complejometría.

II.1.4.3. M. Instrumentales.

II.1.4.3.1. D. Colorimétricas.

II.1.4.3.2. D. Espectroscopía  
Atómica.

II.1.4.3.3. D. Cromatografía  
de Intercambio  
Iónico.

II.1.4.4. M. Biológicos.

## III. RECOMENDACIONES DE METODOS DE ANALISIS DE HIERRO PARA GRUPOS DE ALIMENTOS

III.1. Aceites y Grasas.

III.2. Agua.

III.3. Carne y Derivados.

- III.4. Cereales.
- III.5. Cerveza.
- III.6. Enlatados.
- III.7. Especias.
- III.8. Frutas y Verduras.
- III.9. Jugos y otras Bebidas No Alcohólicas.
- III.10. Leche y Derivados.
- III.11. Leguminosas.
- III.12. Pescados y Mariscos.
- III.13. Vinos.

#### IV. DISCUSION

#### V. CONCLUSIONES

#### VI. BIBLIOGRAFIA

#### VII. APENDICES

## I. INTRODUCCION

Para que un organismo funcione normalmente, requiere consumir una serie de sustancias llamadas nutrimentos. Estos son: carbohidratos, lípidos, proteínas, vitaminas, minerales y agua. Dependiendo de su estructura, unos cumplen funciones energéticas, otros plásticas y otros catalíticas.

a) Agua:

Después del oxígeno, el agua es el factor más importante para la sobrevivencia. Se le necesita para realizar todos los procesos bioquímicos. Sus principales funciones se fundamentan en su capacidad para transportar diferentes sustancias a través del cuerpo y de disolver otras, manteniéndolas tanto en solución como en suspensión coloidal (12).

La ingestión diaria mínima de agua debe ser para un adulto 800 ml, ya que la mayor parte de ella se elimina en la orina, heces, sudor y vapor expirado. El consumo diario de agua se puede obtener de diferentes fuentes: bebidas, sopas, alimentos sólidos (que pueden contener en algunos casos hasta 96% de agua, como la lechuga) y por el metabolismo de azúcares, lípidos o proteínas (126).

b) Proteínas:

Las proteínas ocupan la mayor parte de nuestro cuerpo después del agua. Actualmente se sabe que son políme-

ros de aminoácidos con un elevado peso molecular. Sus funciones son importantes y variadas: contribuyen en el transporte de nutrientes a las células corporales (hemoglobina, mioglobina), actúan como enzimas catalizando reacciones biológicas (lipasas, proteasas), realizan funciones de tipo hormonal (insulina) y trabajan como anticuerpos (gamma-globulina).

Por muchos años se ha sabido que las proteínas son indispensables en la dieta, el por qué una proteína era mejor que otra no se explicó hasta que se conocieron los aminoácidos esenciales y no esenciales. Los primeros no pueden ser sintetizados por el hombre y, por lo tanto, debe obtenerlos de la naturaleza (metionina, leucina, ~~tirosina~~, triptofano, valina, isoleucina, lisina y fenil-alanina). Las proteínas de origen animal son buena fuente de estos aminoácidos y por ello, se dice que son proteínas de buena calidad. La deficiencia en el consumo de éstas es probablemente el problema nutricional más extendido en el mundo, conociéndose la enfermedad como Kuashiorkor, la que se caracteriza por pérdida de peso, fatiga, cara hунdida, pelo quebradizo y puede provocar la muerte.

Los requerimientos proteínicos de las personas varían con la edad, sexo y actividad. Durante el embarazo, lactancia, niñez y adolescencia, se deben ingerir elevadas cantidades de proteínas pues son etapas de crecimiento

en la que dichos compuestos se emplean para construir te  
jido nuevo. En la edad adulta, las personas no deben con  
sumir menos de 1 g de proteína por kilogramo de peso cor  
poral al día (21).

Además del punto de vista nutricional, tecnológicamente pueden utilizarse las propiedades especiales de las proteínas para interactuar con otros constituyentes de los alimentos y darles a éstos características tales como mayor viscosidad, color específico, sabor, etc.

#### c) Carbohidratos:

Ocupan una posición clave en la economía de la natu  
raleza. Son la principal fuente de energía para el cuer  
po, la cual es su función más importante; también facili  
tan la oxidación de las grasas, forman parte de compues-  
tos vitales como los ácidos nucleicos, etc. (12, 21).

Sólo las plantas que realizan la fotosíntesis tienen la capacidad de producir sus propios carbohidratos, así que, los demás organismos los obtenemos directa o indirec  
tamente de ellas.

Las fuentes naturales de carbohidratos son las fru  
tas, los vegetales y los cereales. Los requerimientos diarios de estos compuestos varían de acuerdo a la acti  
vidad muscular de la persona, pero si la cantidad que in  
giere es insuficiente, el cuerpo puede llegar a utilizar las proteínas y las grasas para cubrir sus necesidades

energéticas, aunque recientes evidencias indican que una dieta falta de carbohidratos produce síntomas semejantes a los de una persona en estado de inanición, como son la deshidratación, la fatiga y la pérdida de energía (21).

d) Lípidos:

Los lípidos se requieren en el organismo humano por tres cosas: 1) crecimiento y reemplazo de tejido; 2) producción de energía; y 3) secreciones.

En lo referente a la primera función, los lípidos juegan un papel importante en la estructura básica del protoplasma, por ejemplo, los acetilfosfátidos y los proteolípidos. El citoplasma celular en los tejidos animales contiene ciertas estructuras con cantidades significativas de lípidos, principalmente fosfolípidos, como los microsoomas, las mitocondrias y el aparato de Golgi, los cuales realizan funciones trascendentes en la vida de la célula. Las membranas de ésta consisten también de moléculas lipídicas y proteicas (21).

Durante todos los períodos de crecimiento activo y formación de nuevas células hay una demanda de lípidos, sobretodo ácidos grasos de cadena larga.

Los lípidos tienen como principal función el proveer de energía, siendo empleados principalmente los ácidos grasos saturados y con una doble ligadura, desde el de dos carbonos hasta los ácidos con cadena de dieciocho car

bones.

Los lípidos son sustancias capaces de formar hormonas y prostaglandinas. Las principales fuentes que contienen lípidos de secreción exócrina son la leche, la yema de huevo y el sebo de res.

En general, la demanda necesaria de lípidos puede cubrirse de tres maneras: por biosíntesis, por consumo en la dieta y por redistribución. Si no existen una serie de constituyentes esenciales como los ácidos grasos con varias dobles ligaduras, la colina, la tiamina y la piridoxina, pueden presentarse problemas de metabolismo como son la obesidad, la aterosclerosis, etc. Por otro lado, una dieta mal balanceada, en donde el consumo de grasas sea elevado y el de carbohidratos, por el contrario, escaso, causará la cetólisis, acompañada de náusea y vómito (21).

#### e) Vitaminas:

En cantidades muy pequeñas se requieren las vitaminas, las cuales son esenciales porque el hombre no puede sintetizarlas y porque su carencia provoca enfermedades. Por ejemplo, la falta de vitamina C causa el escorbuto, la de tiamina causa el beriberi, etc.

Las funciones de las vitaminas son variadas tanto porque algunas forman parte de sistemas enzimáticos, como porque otras están presentes en tejidos, permiten la

absorción de ciertos minerales o la síntesis de compuestos, etc. Para facilitar su estudio, las vitaminas se dividen de acuerdo a su solubilidad en cuatro liposolubles y once vitaminas hidrosolubles. Las primeras son la A, la D, la E y la K. Las hidrosolubles son las vitaminas del complejo B (tiamina, riboflavina, piridoxina y cobalamina), la vitamina C, la niacina, el ácido fólico, el ácido pantoténico, la biotina, la colina y el inositol (12, 116, 125).

#### f) Minerales:

Los minerales cumplen también con funciones específicas. Están asociados a macromoléculas, contribuyen a la formación de hormonas y tejidos, catalizan reacciones, etc.

Los minerales que deben consumirse en la dieta son trece: calcio, fósforo, magnesio, sodio, potasio, azufre, cloro, hierro, cobre, cobalto, zinc, yodo y manganeso. Algunos de ellos no ocasionan problemas nutricionales al ser asimilados fácilmente por el organismo, otros como el hierro, el calcio y el yodo no tienen esta ventaja y son causa de graves problemas de salud.

El presente trabajo se dedica al estudio de uno de estos minerales, el hierro. Este elemento fue reconocido como constituyente del cuerpo en 1713 (21). Junto con otros minerales comenzó a estudiarse a principios del

siglo por H. C. Sherman. Este elemento es componente de la hemoglobina, la mioglobina, los citocromos y de varios sistemas enzimáticos (catalasa, peroxidasa) interviniendo principalmente en el transporte de oxígeno para efectuar la respiración celular (116).

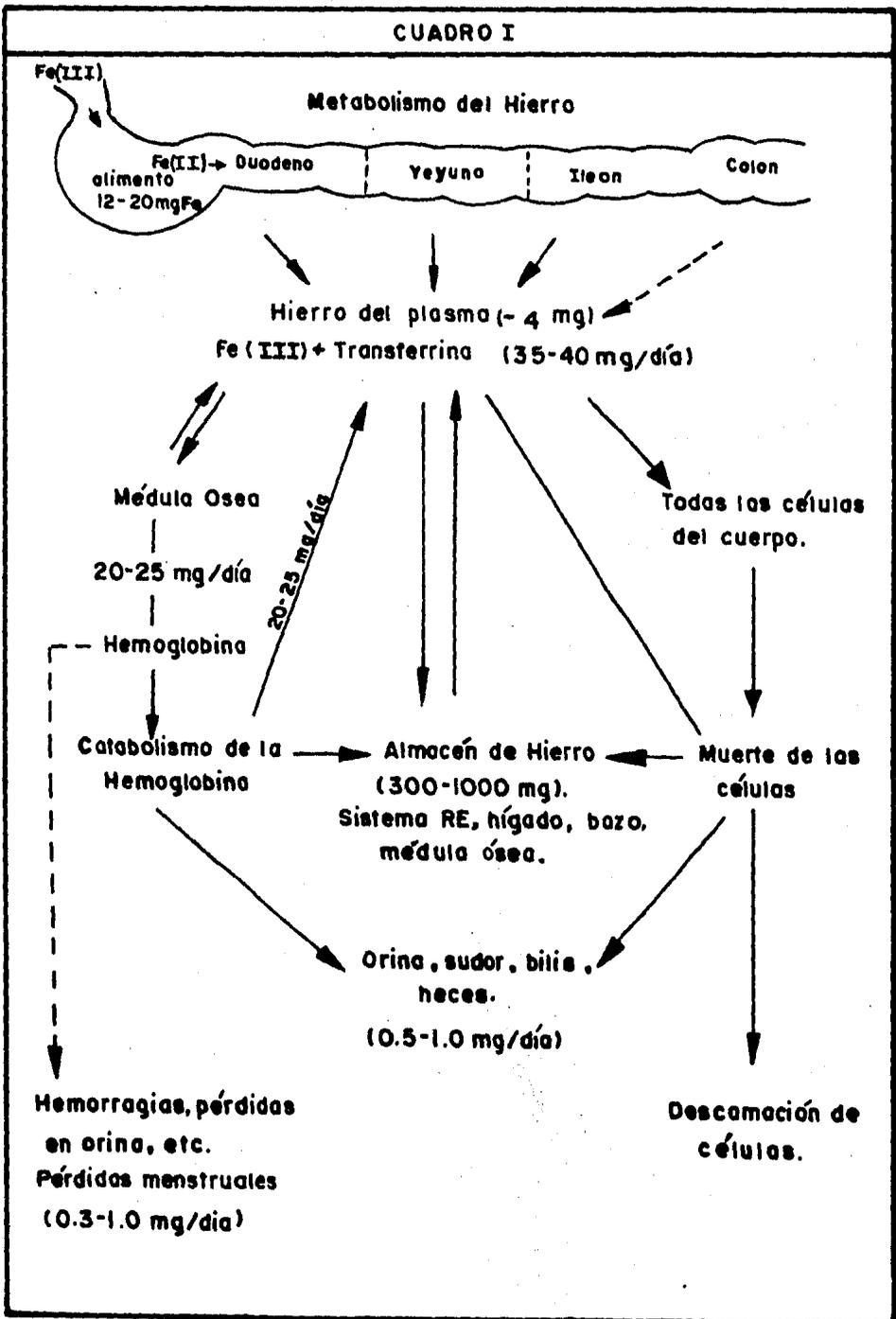
El metabolismo del hierro puede sintetizarse en el cuadro I.

La deficiencia de hierro es un problema común provocado por diversas causas, entre las que podemos citar: la baja disponibilidad biológica de las fuentes de hierro que existen en la dieta, la presencia de fitatos y otros agentes secuestrantes, la presencia de parásitos, problemas de mala absorción, hemorragias y las pérdidas obligatorias que se presentan en las mujeres de edad fértil. En la tabla I se muestran las recomendaciones de hierro diarias en la dieta humana, en la que se puede observar que éstas varían dependiendo de la edad, el sexo y las condiciones fisiológicas de las personas (40).

La anemia por falta de hierro se caracteriza porque los eritrocitos de la sangre son pequeños y pálidos, la concentración de hierro en el plasma sanguíneo es menor a  $40 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$  siendo normal de  $90$  a  $180 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$  en los varones y de  $70$  a  $150 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$  en las mujeres. Esto provoca una síntesis defectuosa de compuestos hemo y la disminución de ciertas metaloenzimas (125).

Una deficiencia de hierro puede ser la causa de fa-

CUADRO I



---

TABLA I

---

Cantidad recomendada de hierro  
por día (\*)

Niños menores a 1 año	10 - 15 mg Fe
Niños de 1 a 16 años	15 mg Fe
Niños de 16 a 19 años	18 mg Fe
Adultos (Hombres y Mujeres)	12 mg Fe
Mujeres embarazadas	18 mg Fe
Lactancia	10 - 15 mg Fe

---

(\*) Según la F.A.O.

tiga y cambios epiteliales en la persona. La terapia a seguir consiste en administrar al paciente dosis de 40 a 50 mg de hierro absorbible al día (125).

La anemia es más frecuente en aquellas áreas donde la dieta es baja en proteína animal, donde las infecciones con parásitos intestinales son comunes y el cuidado médico inadecuado. Lógicamente, la anemia provocada por deficiencia de hierro es alta en las clases pobres.

En diversas partes del mundo se han encontrado deficiencias de hierro, ya que es un problema que se presenta en muchos países. En Estados Unidos la incidencia de anemia en niños es del 20% y del 5 al 10% en mujeres de 15 a 45 años. La ocurrencia en hombres y mujeres adultos es menor (125).

En México, las encuestas realizadas por el Instituto Nacional de la Nutrición revelan que existe anemia generalizada en amplias zonas del país. Los mayores problemas se encuentran en la costa, en el sur y sureste, en donde es posible tener un porcentaje importante de personas con bajos niveles de este elemento (58).

Existen varias formas de erradicar la anemia, entre las que podemos citar: 1) la mejora de la dieta a través del consumo de alimentos con buen contenido de hierro; 2) el reparto de preparaciones farmacéuticas en forma de inyecciones o pastillas. Este tipo de soluciones es altamente deseable aunque tienen sus inconvenienu

---

TABLA I

---

Cantidad recomendada de hierro  
por día (\*)

Niños menores a 1 año	10 - 15 mg Fe
Niños de 1 a 16 años	15 mg Fe
Niños de 16 a 19 años	18 mg Fe
Adultos (Hombres y Mujeres)	12 mg Fe
Mujeres embarazadas	18 mg Fe
Lactancia	10 - 15 mg Fe

---

(\*) Según la F.A.O.

tiga y cambios epiteliales en la persona. La terapia a seguir consiste en administrar al paciente dosis de 40 a 50 mg de hierro absorbible al día (125).

La anemia es más frecuente en aquellas áreas donde la dieta es baja en proteína animal, donde las infecciones con parásitos intestinales son comunes y el cuidado médico inadecuado. Lógicamente, la anemia provocada por deficiencia de hierro es alta en las clases pobres.

En diversas partes del mundo se han encontrado deficiencias de hierro, ya que es un problema que se presenta en muchos países. En Estados Unidos la incidencia de anemia en niños es del 20% y del 5 al 10% en mujeres de 15 a 45 años. La ocurrencia en hombres y mujeres adultos es menor (125).

En México, las encuestas realizadas por el Instituto Nacional de la Nutrición revelan que existe anemia generalizada en amplias zonas del país. Los mayores problemas se encuentran en la costa, en el sur y sureste, en donde es posible tener un porcentaje importante de personas con bajos niveles de este elemento (58).

Existen varias formas de erradicar la anemia, entre las que podemos citar: 1) la mejora de la dieta a través del consumo de alimentos con buen contenido de hierro; 2) el reparto de preparaciones farmacéuticas en forma de inyecciones o pastillas. Este tipo de soluciones es altamente deseable aunque tienen sus inconvenienu

tes: el punto (1) implica cambiar los hábitos alimenticios en algunos casos, el (2) es costoso, pudiendo ambos presentar otras dificultades como, por ejemplo, la absorción.

Varios países, como solución, han puesto en marcha programas de enriquecimiento introduciendo regulaciones, en algunos casos voluntarias y en otros obligatorias para la adición de hierro en los alimentos. Este programa surgió hace cuarenta años en Estados Unidos e Inglaterra y, actualmente, la mayoría de los países lo han adoptado incluyendo México. Por desgracia, en Latinoamérica no se han estipulado controles, de manera que la adición del mineral es con frecuencia al azar, sin considerar que la absorción de este mineral es baja, sólo se aprovecha del 5 al 20% de éste por existir factores que alteran el aprovechamiento (27). Es por ello que se han realizado muchos estudios con el fin de incrementar la absorción de hierro. Se ha encontrado que uno de los compuestos que favorece tal absorción es el ácido ascórbico debido a su acción reductora en el lumen intestinal, previniendo o retardando la formación de compuestos de hierro insolubles que evitan su absorción (22).

Agentes acomplejantes como el citrato ferroso, el citrato férrico amónico y la sal disódica de Fe(III)-EDTA facilitan la absorción, pues cuando el hierro está presente en forma de quelato, se mantiene en solución y

es relativamente mejor absorbido porque está protegido de los ligandos inhibidores (84).

Por el contrario, los investigadores han comprobado que, productos que contienen taninos, fitatos, fosfatos y oxalatos, impiden la absorción del mineral al combinarse con parte del hierro formando compuestos insolubles (13).

Por lo anterior, muchas empresas e instituciones de salud pública se interesan en la evaluación de los alimentos en base a su contenido de hierro principalmente absorbible. Además del punto de vista nutricional, los productores de alimentos deben controlar tal contenido pues el hierro es un índice de contaminación, ya sea de la maquinaria, el empaque, etc., que puede provocar la descomposición más rápida del alimento, problemas con el sabor y otras inconveniencias. Es aquí cuando adquieren una importancia primordial los métodos analíticos para la determinación de hierro en alimentos. La bibliografía sobre éstos está muy dispersa, por lo que para el analista sería de gran ayuda contar con una recopilación de los distintos trabajos realizados sobre el tema con el fin de agilizar el análisis eligiendo el método más adecuado a sus necesidades. El presente trabajo pretende ser una guía sobre los métodos de cuantificación de hierro existentes. En algunos casos se ejemplifica su aplicación para el análisis de ciertos alimentos confiando en que sea

de utilidad y cumpla con el objetivo antes mencionado.

En el cuadro II se muestra una clasificación de los métodos existentes para cuantificar hierro en alimentos y bebidas, los cuales serán explicados con más detalle en el siguiente capítulo.

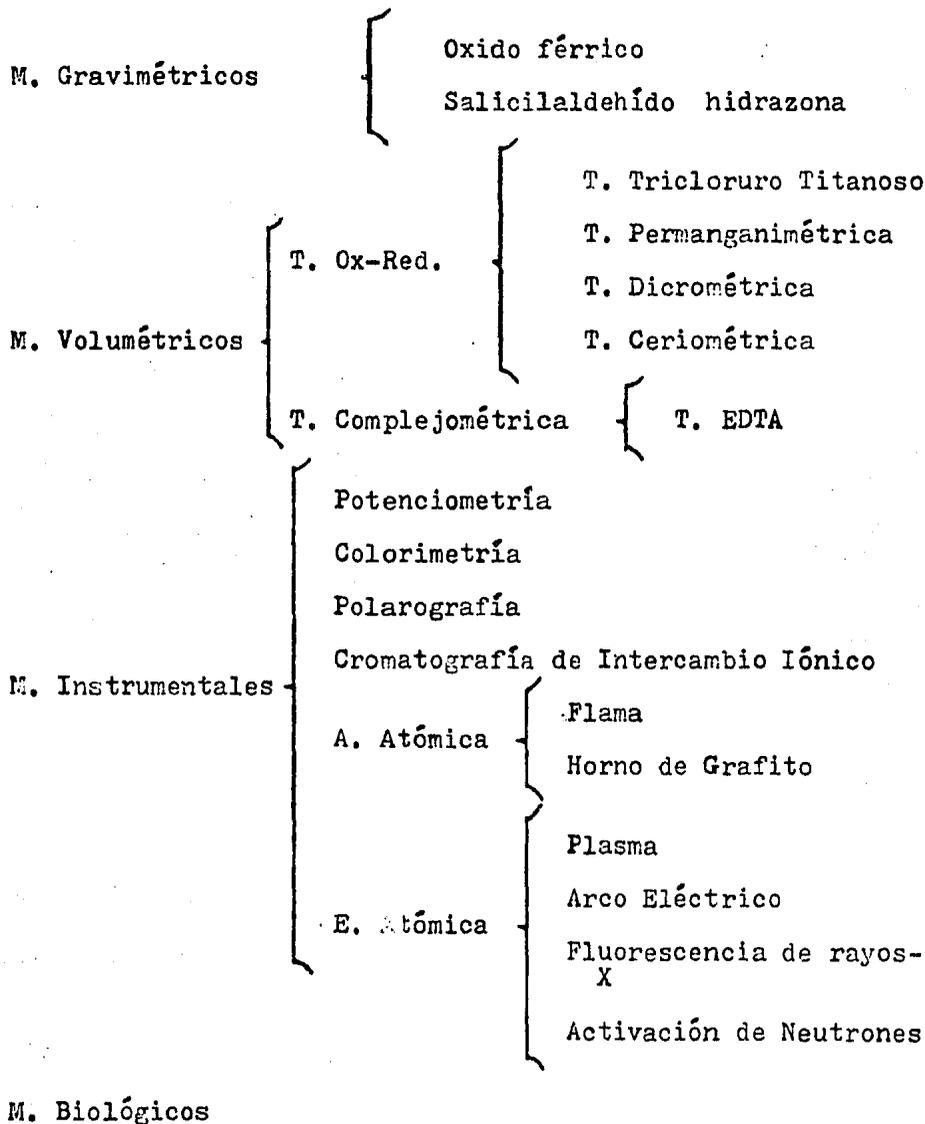
---

CUADRO II

---

MÉTODOS EXISTENTES PARA DETERMINAR HIERRO  
EN ALIMENTOS Y BEBIDAS

---





## II.1. CONSIDERACIONES PARA EL ANALISIS:

Para la determinación de hierro en cualquier muestra es importante seguir una serie de pasos y consideraciones, todos ellos encaminados a obtener los resultados más exactos y reproducibles.

Desde el equipo de laboratorio, el tipo de muestra y su preparación hasta la determinación final, sea cualquiera el método que se utilice, el análisis debe trabajarse con gran cuidado pues la contaminación se puede dar fácilmente, ya sea por la maquinaria o el polvo (43).

Entre las consideraciones que hay que tomar en cuenta en el análisis de hierro se encuentran:

II.1.1. La limpieza del material.

II.1.2. Los reactivos a utilizar.

II.1.3. El tipo de muestra y su preparación.

II.1.4. El método de cuantificación.

### II.1.1. LIMPIEZA DEL MATERIAL:

El material de laboratorio debe estar totalmente limpio y libre de metales que por lo general, se depositan en las paredes de dicho instrumental, lo cual puede provocar valores elevados del elemento a analizar o interferir en su determinación. Se han sugerido diversas técnicas de limpieza del material; a continuación

se mencionan algunas:

i) Remojo de los recipientes y otros materiales de vidrio durante la noche en  $\text{HNO}_3$  6N, se enjuaga doce veces con agua destilada y tres veces con agua libre de hierro. Secado al aire (77).

ii) El instrumental de vidrio se conserva con  $\text{HNO}_3$  1N mientras no se le utilice (117).

iii) Todo el material de vidrio y plástico se lava perfectamente y se remoja en detergente (RBS35) al 2% por no menos de 24 hs. Posteriormente se enjuaga con agua desionizada y se deja remojando en  $\text{HNO}_3$  1M, tres horas mínimo. Se enjuaga nuevamente y se seca en un horno (52).

iv) Remojo del material en  $\text{HNO}_3$  4M por un día a temperatura ambiente, por dos días en  $\text{HCl}$  6M a  $90^\circ\text{C}$  y luego, en  $\text{HCl}$  0.1M tres días a  $90^\circ\text{C}$  en tanque de teflón. Finalmente se lava con agua destilada y se seca a presión reducida a temperatura ambiente (118).

v) El instrumental de vidrio se remoja en  $\text{HNO}_3$  al 6% (v/v) durante una semana antes de emplearse (19).

vi) Se hierve el material de vidrio en  $\text{HCl}$  puro durante 6 hs; posteriormente se enjuaga y se deja secar al aire.

vii) Pipetas y otro instrumental de vidrio se mantiene en  $\text{HNO}_3$  al 40% (v/v) mientras no se les emplee (123).

### II.1.2. REACTIVOS A UTILIZAR:

La mayoría de los autores especifican que los reactivos que se emplean en las determinaciones deben ser grado analítico (1, 6, 13, 15, 17, 24, 45, 48, 52, 55, 57, 63, 65, 74, 79, 83, 88, 89, 90, 92, 96, 104, 109, 112, 115, 117, 118, 123, 129, 130). Otros recomiendan la purificación posterior de los reactivos y/o que se les determine periódicamente el contenido de hierro, lo que les facilita identificar y controlar posibles fuentes de contaminación (19, 56, 59, 72, 78, 103).

Para las determinaciones que requieren el empleo de agua se especifica que ésta puede ser:

- i) Agua destilada (13, 65, 69, 83, 112, 115, 117).
- ii) Agua redestilada (57, 89, 106, 108).
- iii) Agua desionizada (19, 47, 56, 77, 90, 109).
- iv) Agua destilada y desionizada (1, 52, 88, 119, 129, 130).
- v) Agua redestilada y desionizada (59, 74).

### II.1.3. PREPARACION DE LA MUESTRA:

Este es uno de los factores decisivos para llevar a cabo el análisis de hierro con la mayor precisión y exactitud posibles.

En la mayoría de los casos, los constituyentes or-

gánicos presentes en la muestra dificultan la determinación, por ello, la muestra sufre un tratamiento previo con el fin de destruirlos. En general existen dos técnicas:

- a) Las cenizas (9).
- b) La digestión húmeda (9).

a) Cenizas:

El método consiste en carbonizar la muestra con una llama y, posteriormente, calcinarla en una mufla (500 - 550°C) hasta destruir todos los residuos de carbón, quedando al final cenizas usualmente de color blanco o grisáceo. A menudo es difícil y tardado obtener dichas cenizas, por lo que, para acelerar la calcinación se pueden añadir fundentes como el nitrato de magnesio, el acetato de magnesio o el carbonato de amonio. No se recomienda el nitrato de amonio porque forma mucha espuma y puede causar pérdidas (cfr. 97). Pearson recomienda el empleo de óxido de magnesio, carbonato de sodio o ácido sulfúrico (95). Se puede también añadir pequeñas cantidades de glicerina o alcohol puros (97).

La selección del crisol dependerá de la naturaleza del producto a analizar y del mineral que se va a cuantificar (97). Se ha demostrado que, el hierro determinado en muestras biológicas como el hígado se adsorbe en

la superficie de los crisoles de porcelana y el lavado no basta para separarlo y transferirlo al matraz, lo que provoca resultados bajos (18). Es recomendable usar crisoles de platino cuando el hierro se va a determinar como óxido (95, cfr. 97).

Las muestras líquidas o muy húmedas deben trabajarse con especial cuidado durante el secado, pues algunas salpican o forman espuma. Es recomendable evaporar, ya sea con un baño maría (114), con estufa a 90 - 95°C (47) o con una lámpara de infrarrojo (83) antes de carbonizar e introducir la muestra en la mufla.

En el manejo de alimentos ricos en carbohidratos (que tienden a esponjarse y producir espuma) es aconsejable adicionar una gota de aceite de olivo después de secar y antes de calcinar. La muestra debe incinerarse con una flama pequeña hasta que ya no espume, después se incinera con llama más fuerte y se calcina en la mufla (97).

A pesar de las muchas ventajas que representa el preparar las muestras por cenizas como son el no requerir especial atención, su sencillez, la facilidad de manejar se gran cantidad de muestras y el no emplear reactivos ni blanco, la mayoría de los analistas prefieren la digestión húmeda para evitar los problemas de disolución de las cenizas, así como posibles interacciones del hierro

con el material del crisol (18, cfr. 97), las pérdidas por volatilización al haberse demostrado que el cloruro férrico se evapora a  $450^{\circ}\text{C}$  (cfr. 97) y la facilidad con que puede contaminarse la muestra con otros metales por el polvo del ambiente (cfr. 97).

#### b) Digestión Húmeda:

En este tipo de preparación de la muestra, se oxida la materia orgánica a través de una hidrólisis ácida y temperatura. El uso de un solo ácido como el sulfúrico es muy deseable pero no es suficiente para lograr la descomposición total de la materia orgánica pues este ácido no es un agente fuertemente oxidante y el tiempo requerido para la descomposición es largo (97). El ácido nítrico es también empleado como oxidante pero se evapora antes de completar la oxidación de la muestra (97). El A.O.A.C. recomienda el empleo de ambos ácidos, adicionando pequeñas cantidades de nítrico durante la digestión con el fin de mantener las características fuertemente oxidantes. El calentamiento debe continuarse hasta que la materia orgánica se destruya y/o cesen de producirse vapores de  $\text{NO}_2$  y  $\text{SO}_3$ . Finalmente, se añade oxalato de amonio para remover la coloración amarilla debido a los compuestos nitro, grasas, etc. (9, 95).

Por la diferente composición de los alimentos, el tiempo requerido para la destrucción de la materia orgánica

nica puede variar, a la vez que el porcentaje de ácido requerido para la digestión (39).

Joslyn (68) recomienda el uso de ácido perclórico para la digestión ya que el tiempo de descomposición de la muestra se acorta. Otros investigadores reportan el empleo de combinación de ácidos como los antes mencionados (57, 111) y, en caso de analizar alimentos ricos en grasa se aconseja un pretratamiento de la muestra con ácido nítrico antes de adicionar el perclórico (68).

Otro agente oxidante ampliamente utilizado por ser capaz de destruir la materia orgánica más resistente (de ahí su empleo en la digestión de plantas) es el peróxido de hidrógeno (95) que, además, tiene la propiedad de de colorar la solución a menos que ésta esté pigmentada por un exceso de metales (6). Frecuentemente el peróxido sustituye al ácido perclórico porque no presenta los riesgos de explosión de este último (6).

También puede emplearse el ácido clorhídrico en la digestión de muestras (43). Se ha reportado el uso de una mezcla de  $HCl:HNO_3$  5:1 en almendras (110). En combinación con el peróxido de hidrógeno ha sido empleado en la digestión de material biológico (123).

Una de las últimas innovaciones en este campo se basa en la digestión ácida de la muestra bajo presión en un recipiente de poliestireno. Este procedimiento está siendo aceptado poco a poco por su baja contaminación,

gran simplicidad y sensibilidad (123).

En la tabla II se resumen algunos de los ácidos utilizados en la descomposición de muestras de alimentos y bebidas.

#### II.1.4. METODOS DE CUANTIFICACION:

##### II.1.4.1. METODOS GRAVIMETRICOS:

###### a) DETERMINACION GRAVIMETRICA DE HIERRO EN FORMA DE OXIDO FERRICO:

La determinación gravimétrica de hierro en forma de óxido férrico gozó de mucha popularidad en un tiempo; ahora ha sido desplazada por métodos más fáciles y exactos (41). Por otra parte, es raro que este elemento se encuentre en los alimentos en cantidades lo suficientemente elevadas para poder ser determinado por gravimetría (más de 50 mg).

El método se fundamenta en la precipitación del hierro como hidróxido o, mejor dicho, como óxido férrico hidratado, que luego, por calcinación, se convierte en óxido férrico anhidro, el cual se pesa directamente. Las reacciones serían como sigue:

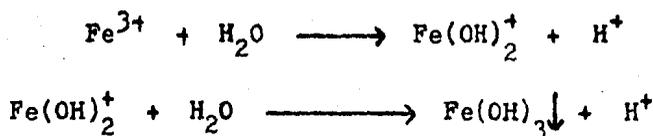


TABLA II

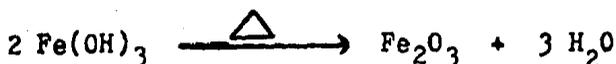
Acidos	Tipo de Muestra	Referencias
Ac. Sulfúrico	Enlatados	(37)
Ac. Nítrico	Cárnicos	(18)
Ac. Perclórico	Varios	(68)
Ac. Clorhídrico	Especies	(43)
Ac. Clorhídrico	Leche	(114)
Peróxido de Hidrógeno	Varios	(95)
Clorhídrico:Nítrico	Vegetales	(65)
Clorhídrico:Nítrico (5:1)	Almendras	(110)
Sulfúrico;Nítrico	Varios	(9), (39), (95)
Sulfúrico:Nítrico	Vinos	(45)
Sulfúrico:Nítrico	Frutas	(77)
Clorhídrico:Peróxido 30 vol. (50:1)	Varios	(128)
Nítrico:Peróxido	Conservas de Pes cados y mariscos	(80)

TABLA II (CONT.)

Acidos	Tipo de Muestra	Referencias
Nítrico:Perclórico (17:3)	Varios	(102)
Nítrico:Perclórico	Vegetales	(6)
Nítrico:Perclórico	Cerveza	(56)
Nítrico:Perclórico (5:1)	Cárnicos	(57)
Nítrico:Perclórico 70% (10:3)	Cereales	(122)
Perclórico:Sulfúrico	Vegetales	(65)
Perclórico:Sulfúrico	Leche	(73)
Perclórico:Sulfúrico	Conservas de <u>Peg</u> cados y mariscos	(80)
Perclórico:Sulfúrico	Varios	(111)
Sulfúrico:Nítrico:Per óxido 70% (5(36M):10 (16M):2)	Vegetales	(6)
Sulfúrico:Nítrico:Per óxido	Varios	(61)

TABLA II (CONT.)

Acidos	Tipo de Muestra	Referencias
Perclórico:Sulfúrico: Nítrico	Vegetales	(6)
Perclórico:Sulfúrico: Nítrico	Leguminosas	(62)
Perclórico:Sulfúrico: Nítrico	Cereales	(69)
Perclórico:Sulfúrico: Nítrico	Conservas de Pesca dos y mariscos	(80)
Perclórico:Sulfúrico: Nítrico	Vegetales	(112)



Durante esta determinación, se deben seguir una serie de recomendaciones con el fin de eliminar errores como pueden ser la pérdida del mineral, la coprecipitación, etc.:

i) El único estado de oxidación que precipita totalmente es el hierro (III), por lo que hay que asegurarse que todo él sea trivalente. Esto se logra hirviendo la solución problema después de agregar ácido nítrico (41, 42) o, para mejores resultados, añadiendo peróxido de hidrógeno (42) porque el producto de reducción del peróxido es agua y porque el exceso se descompone fácilmente con sólo hervir breve tiempo la solución (41).

ii) Se recomienda precipitar el óxido y separarlo a bajos valores de pH, pues, aunque incluso precipita cuantitativamente a partir de soluciones débilmente ácidas, a un pH entre 3 y 4 impide o reduce al mínimo la precipitación de la mayoría de los óxidos e hidróxidos de cationes metálicos con dos cargas positivas. El pH se obtiene empleando un amortiguador de acetatos o de ión piridina-piridinio, siendo este último el mejor porque acompleja otros metales evitando la coprecipitación (41).

iii) Ya formado el precipitado, es preferible decantar la solución y luego filtrar a través de un papel filtro grueso, sin usar vacío (41).

iv) El precipitado se puede lavar con agua caliente o cloruro de amonio al 1%. Como el precipitado gelatinoso generalmente no es tan fácil de lavar, se recomienda redissolver (41).

v) El precipitado se debe calcinar sobre un mechero con acceso de aire, en particular durante la combustión del filtro de papel, con objeto de evitar la reducción parcial del óxido férrico a  $Fe_3O_4$ . Ya en la mufla, la temperatura no debe exceder los  $1000^{\circ}C$  por la misma razón (42).

vi) Si el alimento o bebida a analizar contiene citratos, tartratos, oxalatos, sulfatos o fosfatos, no es recomendable este método pues el ión férrico forma complejos con ellos evitando parcial o totalmente la precipitación del hierro como óxido.

Debido al mucho tiempo que se invierte en esta técnica y a que es un método poco sensible, los analistas han preferido las técnicas instrumentales. Aún así, no deja de ser un método importante que todavía se utiliza en conjunción con otras determinaciones y en lugares donde no se cuenta con el equipo para aplicar técnicas más sofisticadas.

b) DETERMINACION GRAVIMETRICA DE HIERRO CON SALICILALDEHIDO HIDRAZONA:

Un procedimiento que últimamente está siendo estu-

diado, consiste en precipitar el hierro cuantitativamente con salicilaldehído hidrazona formando un complejo rojo-naranja  $(C_7H_7ON_2)_2Fe$  a un pH de 10-11. Todo el hierro presente en la muestra precipita sin importar el estado de oxidación pues el reactivo es un buen agente reductor.

Algunos metales como el níquel, el cobre, el zinc y el manganeso interfieren en la determinación y deben ser removidos. Por otra parte, se recomienda adicionar tartrato de sodio y potasio antes de la precipitación para dar estabilidad al complejo que se forme (63).

#### II.1.4.2. METODOS VOLUMETRICOS:

##### II.1.4.2.1. DETERMINACIONES VOLUMETRICAS POR OXIDO-REDUCCION:

Cuando la técnica seleccionada para el análisis de hierro es volumétrica, la elección del oxidante adecuado es muy importante. Este debe cumplir varios requisitos: 1) ha de ser lo bastante fuerte para que la reacción con el hierro sea prácticamente completa; 2) no ha de ser tan enérgico que pueda reaccionar con cualquiera de los componentes de la solución que se valora, salvo la especie deseada (hierro); y 3) ha de reaccionar rápidamente con la sustancia que ha de determinarse (41).

La determinación volumétrica de hierro por oxidoreducción se resume en cuatro pasos fundamentales: a) la

disolución de la muestra; b) la reducción cuantitativa del hierro (III) a hierro (II) con un reductor adecuado, seguida de la eliminación del agente reductor en exceso; c) la adición, en caso necesario, de reactivos especiales para asegurar que la reacción se efectuará apropiadamente durante la valoración subsiguiente; y d) la valoración de la solución que contiene el hierro (II) con la solución estándar, ya sea de permanganato, dicromato, etc. (41).

a) TITULACION CON TRICLORURO TITANOSO:

Uno de los primeros métodos desarrollados para cuantificar al hierro volumétricamente por oxido-reducción data del año 1903. El método se basa en reducir el cloruro férrico a la forma ferrosa por acción del tricloruro titanoso con la consecuente formación del tetracloruro titanico.

El método presenta la desventaja de ser tardado ya que el cobre y los fosfatos interfieren en la determinación y el removerlos implica pérdida de tiempo. Por otro lado, la posibilidad de contaminación es alta pues hay mucha manipulación (cfr. 125). Por lo anterior, la técnica fue desplazada poco a poco por métodos más exactos y fáciles de manejar.

b) TITULACION PERMANGANIMETRICA:

La determinación de hierro (II) con permanganato en

disolución de la muestra; b) la reducción cuantitativa del hierro (III) a hierro (II) con un reductor adecuado, seguida de la eliminación del agente reductor en exceso; c) la adición, en caso necesario, de reactivos especiales para asegurar que la reacción se efectuará apropiadamente durante la valoración subsiguiente; y d) la valoración de la solución que contiene el hierro (II) con la solución estándar, ya sea de permanganato, dicromato, etc. (41).

#### a) TITULACION CON TRICLORURO TITANOSO:

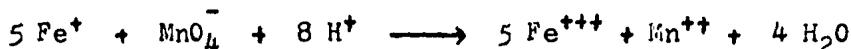
Uno de los primeros métodos desarrollados para cuantificar al hierro volumétricamente por oxidación-reducción data del año 1903. El método se basa en reducir el cloruro férrico a la forma ferrosa por acción del tricloruro titanoso con la consecuente formación del tetracloruro titanico.

El método presenta la desventaja de ser tardado ya que el cobre y los fosfatos interfieren en la determinación y el removerlos implica pérdida de tiempo. Por otro lado, la posibilidad de contaminación es alta pues hay mucha manipulación (cfr. 125). Por lo anterior, la técnica fue desplazada poco a poco por métodos más exactos y fáciles de manejar.

#### b) TITULACION PERMANGANIMETRICA:

La determinación de hierro (II) con permanganato en

solución ácida se fundamenta en la siguiente reacción:



en la que el punto final de la titulación se determina visual (con la aparición de una coloración rosada) o potenciométricamente (véase Figura 1).

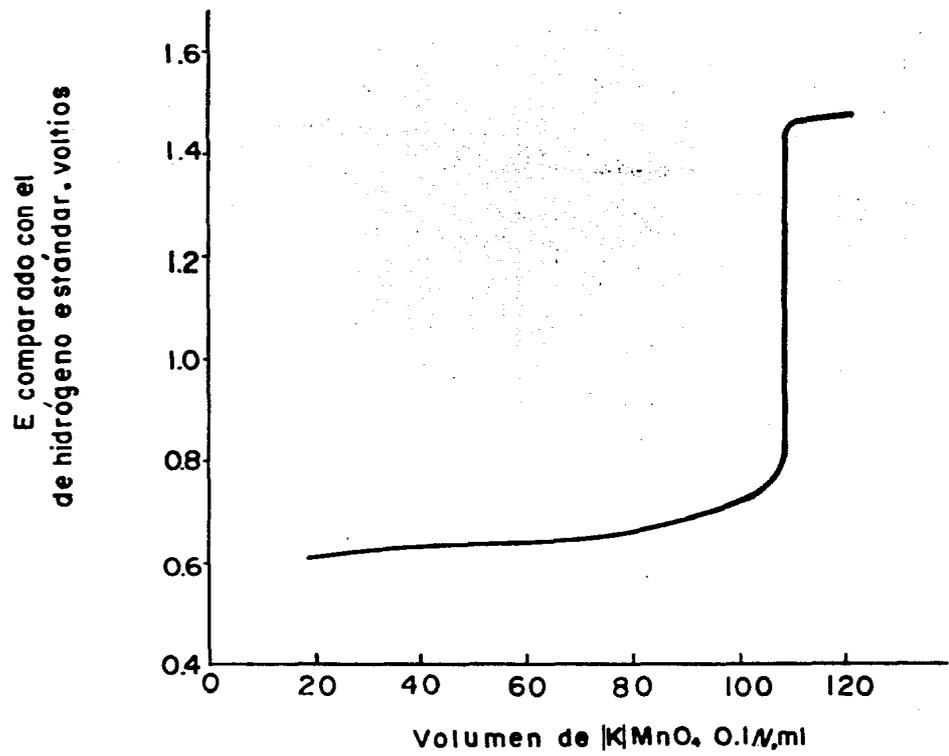
Debido a que la reacción sólo puede efectuarse con el hierro (II), el ión férrico debe reducirse, para lo cual existen diferentes tratamientos:

i) El uso de zinc metálico, el cual se agrega en forma de granalla a la solución y se separa por filtración después de la reducción; también existe la posibilidad de amalgamar este mismo metal con mercurio y empacarlo con una columna vertical a través de la cual se hace pasar la solución problema. A esta amalgama reductora se le conoce como "Reductor de Jones" y fue ideada por C. Jones entre 1888-1889 (41, 42, 70).

ii) El uso de cloruro estanoso\* para reducir el hierro (III) mediante la siguiente reacción:

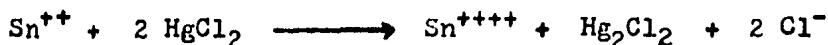
\* Un exceso de cloruro estanoso producirá un precipitado gris voluminoso que impedirá la determinación, por lo que debe tenerse un manejo cuidadoso de este reductor (41, 42, 70, 123).

Fig 1- Valoración potenciométrica de una solución 0.1N de Fe(II) con  $\text{KMnO}_4$ .





Ya que el ión Sn (II) sobrante puede reaccionar con el permanganato, se le destruye con cloruro mercúrico:



iii) El uso de plata como reductor ("Reductor de Walden" en honor a su creador G.H. Walden Jr. en 1934). La reacción del hierro (III) con plata es más selectiva que con otros reductores ya que el poder reductor de ésta es moderado. Al igual que el reductor de zinc, la plata pura se coloca en una columna por donde se hace pasar la solución problema. Como en la mayoría de los casos la muestra se disuelve en ácido clorhídrico haciendo que el potencial de reducción varíe debido a la concentración de cloruro, se ha observado que a una concentración 1M. de ácido clorhídrico en donde la actividad de los cloruros es aproximadamente 1.0, la reducción del hierro es prácticamente cuantitativa (70). La única desventaja es que la plata metálica termina por recubrirse completamente con una película de cloruro de plata y la columna debe tratarse con un reductor fuerte para regenerar la plata elemental (41).

En las determinaciones de hierro (II) con permanga-

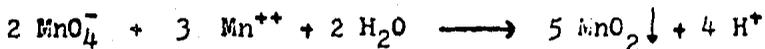
nato existe el inconveniente de que este último reacciona con los iones cloruro aumentando el volumen gastado de titulante, lo que provoca resultados elevados. Este problema puede resolverse mediante el uso de una solución protectora conocida como de Zimmermann-Reinhardt (41, 42, 70, 123). En el año de 1881, Zimmermann descubrió que el uso de sulfato de manganeso (II) disminuía el potencial redox  $MnO_4^-/Mn(II)$  y, en consecuencia, no se producía ninguna reducción intermedia aún cuando existieren altas concentraciones de cloruro en la muestra (cfr. 70). Reinhardt encontró que la adición de ácido fosfórico removía el color amarillo producido por el hierro (III) formando un ión complejo incoloro con este último, además de disminuir el potencial de reducción del sistema  $Fe(II)/Fe(III)$  y, por lo tanto, facilitaba la oxidación del hierro (II) por el permanganato (cfr. 70). En la actualidad se emplea la combinación de ambas contribuciones en una mezcla de sulfato de manganeso (II), ácido fosfórico y ácido sulfúrico, a la que se conoce como solución de Zimmermann-Reinhardt (70).

Algunos investigadores reportan el empleo de otras soluciones protectoras como el sulfato de sodio en altas concentraciones; la mezcla de fosfato de sodio, de potasio y ácido fosfórico; el acetato de manganeso (II), etc., con el inconveniente de que la estabilización del potencial

es tardada por posibles interacciones del manganeso (III) con el fosfato, el acetato, etc. (70).

De acuerdo a lo anterior se concluye que este tipo de determinaciones son eficientes y de fácil ejecución siempre y cuando se tomen en cuenta las siguientes precauciones:

1. El método es adecuado para determinar cantidades relativamente altas de hierro (1-10 mg o más) (87).
2. Disolución adecuada de la muestra para evitar resultados bajos.
3. La solución debe ser llevada a la dilución adecuada antes de ser titulada.
4. La titulación debe realizarse en frío para prevenir la oxidación del ácido clorhídrico con el permanganato.
5. El hierro (II) se puede oxidar a hierro (III) por larga exposición al aire, por lo que, después de añadir el reductor, se deben efectuar inmediatamente y sin interrupción los demás pasos hasta llegar a la titulación.
6. El punto final de la titulación no es permanente. Se considera que se ha llegado al punto final de la titulación cuando perdura por 30 segundos la coloración rosada. Después de un tiempo comienza a precipitar el óxido de manganeso (IV):



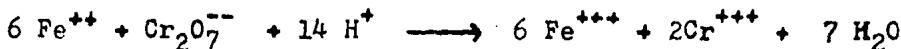
7. Si los resultados obtenidos no son consistentes, es recomendable refiltrar el permanganato y estandarizarlo nuevamente (123).

La determinación permanganimétrica de hierro está siendo desplazada por nuevos métodos más rápidos y precisos o por el empleo de titulantes más baratos que no requieren precauciones especiales con los iones cloruro, como el dicromato y el cerio (IV) (70).

Existe otro procedimiento en el que se determina el contenido de hierro en la siguiente forma: todo el hierro se reduce a la forma hierro (II) con cobre metálico en solución de ácido fosfórico, luego se adiciona ácido fosfomolibdico formándose un complejo de fosfomolibdato reducido que se titula con permanganato (cfr. 87).

#### c) TITULACION DICROMETRICA:

El ácido crómico y sus sales, aunque no son tan fuertes oxidantes como el permanganato, producen buenos resultados en la determinación volumétrica de hierro (II). La reacción que se verifica es la siguiente:



Al igual que en la valoración volumétrica del hierro con permanganato, las sales de hierro (III) deben ser reducidas a hierro (II) por cualquiera de los métodos ya mencionados en la sección dedicada a permanganimetría.

La detección del punto final en este tipo de determinaciones puede establecerse visual o potenciométricamente. Para la primera se requiere el uso de un indicador. Normalmente se emplea difenilaminasulfonato sódico o difenilbencidina sulfonato sódico (41). Los compuestos no sulfonados del que se derivan (difenilamina y difenilbencidina) son recomendados por algunos autores (91) pero presentan el inconveniente de ser relativamente insolubles en medios acuosos obteniéndose resultados menos satisfactorios (41). Cuando no se disponga de alguno de los indicadores antes mencionados se puede utilizar un indicador externo como el ferricianuro de potasio (70, 91, 123). El método de titulación con este último consiste en colocar sobre una placa de porcelana blanca pequeñas gotas de una solución de ferricianuro de potasio y, junto a ellas, ir colocando a medida que la titulación avanza, pequeñas gotas de la solución que se titula, se mezclan ambas gotas y se observa la coloración en el lugar de contacto de los líquidos. Al principio, la coloración es azul, y a medida que la solución ferrosa va siendo oxidada, se obtiene un color verde. Cuando este color deje de producirse se habrá

llegado al final de la reacción. Este método es inexacto debido a la relativa lentitud de la titulación, lo que puede favorecer la oxidación parcial de la sal ferrosa por el oxígeno del aire y al error debido a las porciones de la solución que se utilizan en hacer la reacción sobre la placa de porcelana que no son consideradas para restarse al volumen total (91).

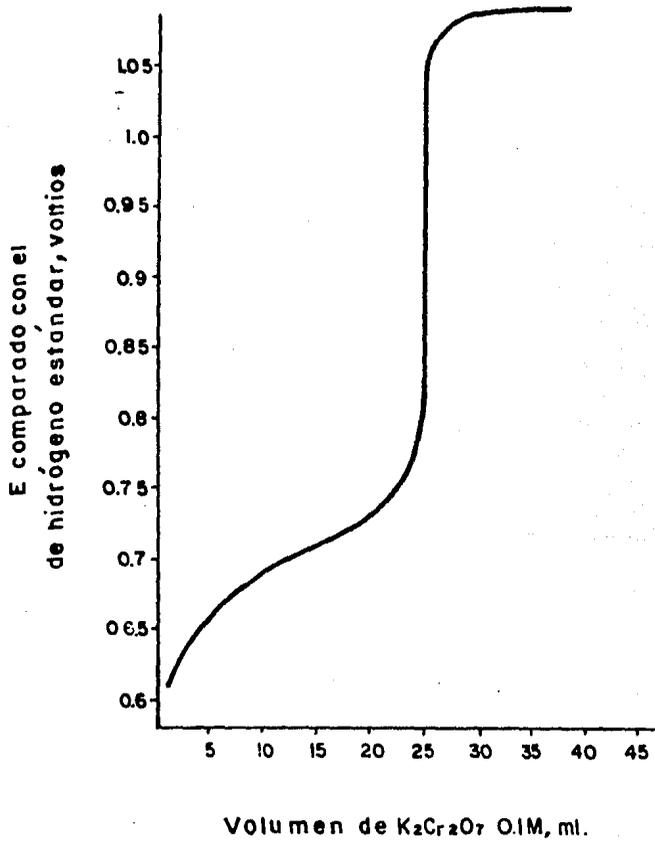
Si la determinación se realiza potenciométricamente, la curva que se observa es la que se indica en la Figura 2.

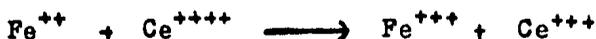
La titulación dicrométrica ofrece varias ventajas sobre titulantes como el cerio y el permanganato. Este último tiene la desventaja de que los cloruros obstaculizan la determinación, requiriéndose el uso de la solución protectora de Zimmermann-Reinhardt, mientras que el dicromato tolera concentraciones de ácido clorhídrico arriba de 3.5N (70). Con respecto al cerio (IV), éste ofrece mejores resultados, sin embargo, para aplicaciones de rutina, el bajo costo, la fácil preparación de la solución estándar y su gran estabilidad, hacen al dicromato más funcional (70, 123).

#### d) TITULACION CERIOMETRICA:

La determinación de hierro se fundamenta en la oxidación del hierro (II) por el cerio (IV) en medio ácido:

Fig 2: Valoración potenciométrica de una solución 0.1M de Fe(II) en HCL 1.0M con  $K_2Cr_2O_7$





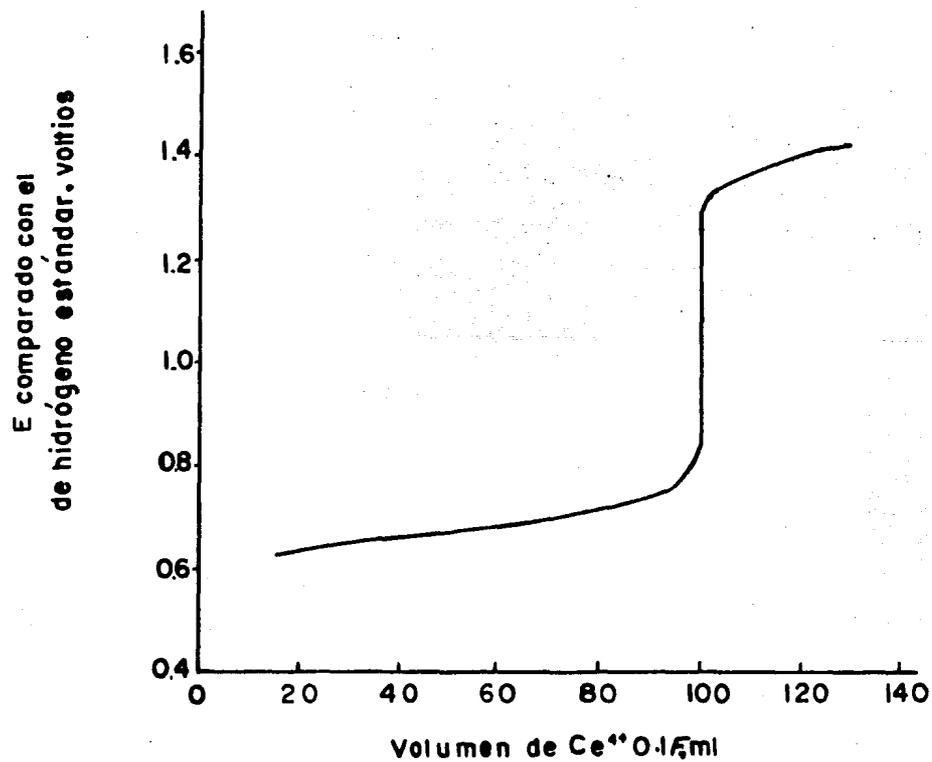
Esta titulación es aplicable a una gran variedad de soluciones de hierro (II). Tiene la ventaja de poderse trabajar con concentraciones de ácido perclórico y sulfúrico de 0.5 a 8M (70).

Por lo general, las muestras problema suelen ser disueltas en ácido clorhídrico. El cerio tolera concentraciones de 0.5 a 6M de este ácido, el cual reúne las condiciones más adecuadas para efectuar la titulación de hierro (II), ya que permite el uso ya sea de cloruro estano-so o del reductor de Walden (ver Titulación Permanganimétrica) como agentes reductores selectivos (70).

El punto final de la titulación puede detectarse con la ayuda de un indicador como la ferroína (hierro-1,10-fenantrolina) (70, 91, 123); la 5,6-dimetil-ferroína (70) o el  $\alpha, \alpha'$ -dipiridilo en solución de ácido clorhídrico o sulfúrico 1M (70). El final de la titulación puede también determinarse potenciométricamente (Figura 3) (70, 91).

Las sales de cerio (IV) son fáciles de conseguir y tienen ciertas ventajas sobre el permanganato y el dicromato como su estabilidad por largos períodos de tiempo, su fuerte poder oxidante, el hecho de no sufrir desviaciones al reaccionar pues sólo existe un producto de reducción del ión cerio (IV) en solución ácida:

Fig 3- Valoración potenciométrica de una solución 0.1N de Fe(II) con Ce (IV).





A pesar de la efectividad de este tipo de titulaciones, se prefiere el uso del dicromato para análisis de rutina por ser éste menos costoso y obtenerse resultados aceptables (70, 123).

#### II.1.4.2.2. METODOS VOLUMETRICOS POR COMPLEJOMETRIA:

##### a) DETERMINACION COMPLEJOMETRICA CON EDTA:

El ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) se ha empleado en la determinación de hierro por formar complejos muy estables con prácticamente todos los iones de los metales (41). La determinación es volumétrica. En primer lugar, se adiciona EDTA 0.005M en exceso y, el que no se haya acomplejado se retitula con nitrato de plomo 0.005M usando como indicador visual anaranjado de xilenol (37) o variamina blue B (70).

Sin embargo, la determinación de hierro con el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) no es muy usada. Eiperson y Paulus la emplean en el análisis de alimentos enlatados (37).

\*NOTA:

Dentro de los métodos electroquímicos, además de la potenciometría, existen otras técnicas de análisis como son la voltamperometría, la amperometría, la culombimetría, etc., las cuales no serán tratadas en este trabajo no porque carezcan de importancia sino por no encontrarse referencias que relacionen dichos métodos con la determinación de hierro en alimentos o bebidas; con la excepción de los trabajos reportados por Eipeson y Paulus (37) y Mohan y Rao (89) quienes emplean un tipo de titulación voltamperométrica, la polarografía, en la determinación de hierro en enlatados y en hojas de maíz respectivamente.

### II.1.4.3. METODOS INSTRUMENTALES:

#### II.1.4.3.1. DETERMINACIONES COLORIMETRICAS:

Muchas veces los métodos gravimétricos y volumétricos ordinarios no sirven para determinar cantidades muy pequeñas de hierro en alimentos, por lo que se han desarrollado varios métodos basados en la absorción de energía radiante para la determinación cuantitativa de este metal (41).

Los métodos de absorción y emisión atómica, por ejemplo, son también rápidos y sensibles, pero los colorimétricos se prefieren generalmente ya que involucran instrumentación menos costosa y dan una sensibilidad muy grande cuando los reactivos cromógenos son empleados apropiadamente (11).

Muchos reactivos que producen color han sido empleados para la determinación espectrofotométrica de hierro. En algunos se efectúa la determinación directa del ión férrico mientras que en otros, se aprovecha la formación de complejos muy coloreados entre el hierro (II) y diversos ligandos orgánicos.

Entre las determinaciones más comunes podemos mencionar:

- a) Determinación colorimétrica con tiocianato.
- b) Determinación colorimétrica con ferrocianuro.
- c) Determinación colorimétrica con  $\alpha, \alpha'$ -dipiridilo.

- d) Determinación colorimétrica con derivados del **α, α'**-dipiridilo.
- e) Determinación colorimétrica con o-fenantrolina.
- f) Determinación colorimétrica con derivados de la o-fenantrolina.
- g) Determinación colorimétrica con ácido tioglicólico.
- h) Determinación colorimétrica con otros reactivos.

a) DETERMINACION COLORIMETRICA CON TIOCIANATO:

Uno de los primeros métodos que aparecieron para cuantificar hierro en alimentos fue diseñado por Herapath en 1853. Este método se basa en la formación del ión  $\text{FeCNS}^{++}$  en solución ácida, el cual es un compuesto colorido que puede determinarse a una longitud de onda de 480 nm (87, 98).

Esta determinación ha sufrido numerosas modificaciones desde 1928, cuando Peterson y Elvehjem constataron que los fosfatos, sobretodo pirofosfatos, interferían en gran manera con el desarrollo del color rojo con el tiocianato debido a la parcial desionización del hierro; y establecieron una serie de pasos adicionales para precipitar los fosfatos con molibdato de amonio y así separarlos (125). Stugart adecuó la técnica para determinar hierro en leche mediante una extracción con alcohol isoamílico (114) previniendo así la interferencia de los fosfatos y la desa-

parición del color del tiocianato férrico, el cual tiende a reducirse en solución acuosa con la consecuente pérdida de color. Thompson empleó una alta concentración de ácido clorhídrico y de tiocianato de potasio, además de extraer con alcohol isobutílico para evitar interferencias (117).

En la literatura se reportan problemas de interferencia con oxalatos, tartratos, cadmio, zinc, cobalto, níquel, cobre y plata (120).

La cuantificación con tiocianato es una técnica que aún se utiliza para análisis de rutina y sus resultados concuerdan con los procedimientos colorimétricos de la o-fenantrolina (111) y del  $\alpha, \alpha'$ -dipiridilo (49).

#### b) DETERMINACION COLORIMETRICA CON FERROCIANURO:

En 1925, Walker desarrolló un método para cuantificar hierro colorimétricamente en cenizas de alimentos. Las cenizas se disuelven en ácido nítrico, se calienta la solución para eliminar el exceso de ácido, se diluye y tratan con ferrocianuro de potasio, produciéndose un color azul que podrá ser comparado con los estándares.

Mummerl (1926) recomienda ácido clorhídrico para disolver las cenizas, pues, con ácido nítrico la disolución no es completa (cfr. 87).

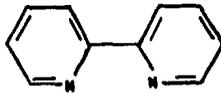
El método no es muy confiable ya que el cobre causa interferencia, por lo cual, esta determinación ha sido

substituida por otras más sencillas y precisas (87).

c) DETERMINACION COLORIMETRICA CON  $\alpha, \alpha'$ -DIPIRIDILO:

El reactivo fue introducido por Hill en 1930 (cfr. 87). Produce un color intensamente rojo con el hierro (II), que puede cuantificarse espectrofotométricamente a una longitud de onda de 510 nm.

Su fórmula es:



Si la materia orgánica es destruida por calcinación u oxidación húmeda, el  $\alpha, \alpha'$ -dipiridilo puede emplearse junto con un agente reductor para determinar el hierro total. En la determinación interfieren los pigmentos amarillos y la alúmina (87). En relación a los pirofosfatos, muchos autores sostienen que no intervienen en el análisis, sin embargo, Howe (cfr. 87) afirma que los resultados bajan y que las cenizas deben ser calentadas por lo menos 15 minutos con ácido clorhídrico (1:1) para transformar el piro- en orto-fosfato.

El método es sumamente confiable y tiene la ventaja de que, en solución acuosa, el color es estable, lo que no sucede con el complejo formado entre el hierro y el tiocianato. Este método (con  $\alpha, \alpha'$ -dipiridilo) es reco-

nocido como un método oficial por la Association of Official Analytical Chemists (9); sin embargo, la síntesis del reactivo es difícil y costosa.

d) DETERMINACION COLORIMETRICA CON DERIVADOS DEL  $\alpha, \alpha'$ -DIPIRIDILO:

El efecto de los substituyentes en los sistemas de anillos aromáticos del  $\alpha, \alpha'$ -dipiridilo ha sido estudiado ampliamente para incrementar la sensibilidad de los complejos coloridos formados con el hierro (II). Se ha encontrado que: a) casi cualquier substituyente incluyendo  $-\text{CH}_3$ ,  $-\text{C}_6\text{H}_5$ ,  $-\text{Cl}$  y  $-\text{NO}_2$  eleva la absorbancia molar y, usualmente aunque no siempre, aumenta la longitud de onda de la absorbancia máxima; b) los grupos fenilo elevan la absorbancia máxima más que los grupos metilo (121).

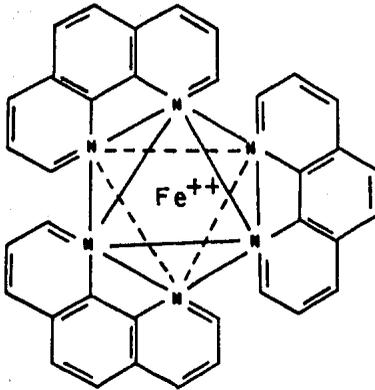
Apoyándose en lo anterior, se han preparado nuevos reactivos como el 2,2'-dipiridildietilditiocarbamato, el cual sirve para determinar simultáneamente cobre y hierro en alimentos y bebidas (11).

El 2:2':2''-tripiridilo es también un reactivo muy sensible para determinar hierro (87).

e) DETERMINACION COLORIMETRICA CON O-FENANTROLINA:

Las primeras investigaciones que se efectuaron con este compuesto fueron realizadas por Blau en 1898 (87), quien observó que se producía un color rojo intenso entre

la o-fenantrolina y el hierro (II) al formarse el complejo  $\text{Fe}(\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2)_3^{++}$  :



Este método se aplicó desde 1937 para determinar hierro en productos como pan, frutas, vinagres, vinos y jugos de fruta con muy buenos resultados (111). Mumsey (1944) desarrolló una técnica para cuantificar hierro que aparece en el A.O.A.C. como el primer método tentativo para la determinación del mismo (cfr. 125). Se sugiere el uso de la o-fenantrolina y/o del  $\alpha, \alpha'$ -dipiridilo, que es actualmente el método oficial de la Association of Official Analytical Chemists (9).

La o-fenantrolina, al igual que el  $\alpha, \alpha'$ -dipiridilo, presenta una elevada sensibilidad. Se prefiere la primera

porque se le requiere en menor cantidad, lo que disminuye el costo del análisis.

La estabilidad del complejo colorido formado en solución acuosa es alta, lo que no sucede con el complejo que se forma con el tiocianato, el cual tiende a decolorarse cuando está expuesto al aire.

Los investigadores reportan que el cobre, el aluminio y el magnesio no interfieren en la determinación (111) mientras que la plata, el bismuto, el níquel, el cobalto, el cianuro, el perclorato y el molibdato interfieren seriamente (120).

#### f) DETERMINACION COLORIMETRICA CON DERIVADOS DE LA O-FENANTROLINA:

Los derivados substituídos de la o-fenantrolina han sido ampliamente estudiados con el objeto de aumentar la sensibilidad de las determinaciones. Smith y Richter (1944) realizaron una recopilación de éstos (cfr. 121).

El derivado de la o-fenantrolina con el que se obtienen mejores resultados es la 4,7-difenil-1,10-fenantrolina, mejor conocida como batofenantrolina. Este reactivo se ha usado en la determinación de hierro en leche (55) y agua (121).

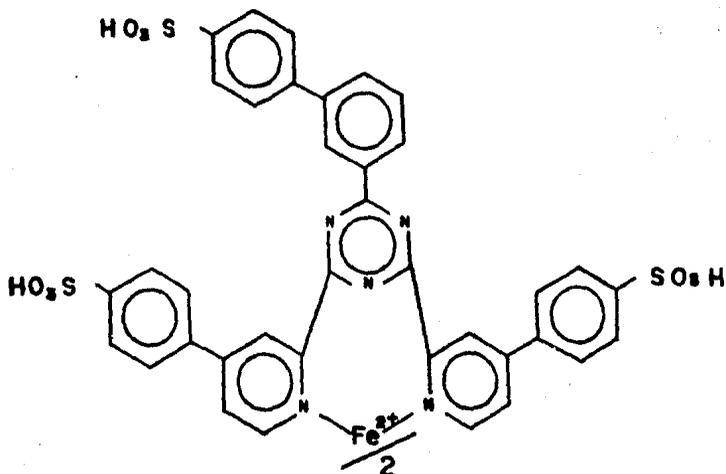
Otro derivado que se emplea para cuantificar simultáneamente hierro y cobre en alimentos es la 1,10-fenantrolina neocuproína (11).

Entre los agentes más sensibles del tipo ferrofina que se han encontrado se encuentra la 3-(4-fenil-2-piridil)-5-fenil-1,2,4-triazina. Las aplicaciones analíticas de este reactivo están limitadas a soluciones no acuosas por su baja solubilidad en agua y por ello se ha dado preferencia a otros compuestos del mismo tipo pero con menor peso molecular. Entre ellos se pueden mencionar el [amonio-3-(4-fenil-2-piridil)-5-fenil-1,2,4-triazina disulfonada dihidratada] o PPTS (112) y el TPPTZ-S que se aplica al análisis de cerveza (56).

El PPTS forma un complejo colorido con el ión hierro (II) que se lee a una longitud de onda de 565 nm. Dicho complejo presenta buena solubilidad en agua y gran sensibilidad en la determinación del hierro. El cobre y el cromo interfieren en la determinación porque forman productos coloridos con el PPTS y deben ser removidos (112).

El TPPTZ-S forma también un compuesto colorido con el hierro (II) que tarda un poco en desarrollarse (20 a 30 minutos) pero presenta una excelente estabilidad. La longitud de onda en que se lee el complejo formado es 607 nm. Muchos de los iones de los metales de transición forman complejos con el TPPTZ-S pero sólo acompañado con el hierro (II) tiene color. Si se agrega una cantidad en exceso del reactivo, los otros iones no interfieren en la lectura (56).

La fórmula del complejo TPPTZ-S:Fe(II) es como sigue:



**g) DETERMINACION COLORIMETRICA CON ACIDO TIOGLICOLICO (MERCAPTOACETICO):**

El método fue introducido por Lyons en 1927. Se basa en la capacidad del ácido tioglicólico de formar un complejo color rojo con el hierro (II) en condiciones alcalinas.

La primera parte de la reacción involucra una reducción del hierro (III) a hierro (II) para luego reaccionar este último con el ácido de la siguiente manera:





#### h) DETERMINACION COLORIMETRICA CON OTROS REACTIVOS:

El hierro puede formar complejos coloridos con gran variedad de compuestos, entre los que se pueden citar:

1. La 3-(2-piridil)-5,6-difenil-1,2,4-triazina o PDT. Es un reactivo que forma con el hierro un complejo colorido que se extrae en alcohol isoamílico y que puede cuantificarse espectrofotométricamente a 561 nm.

En la determinación del hierro por este método pueden interferir el níquel (II), el cromo (II) y el cobalto (II) porque consumen PDT para formar sus respectivos complejos. Para evitar este problema se recomienda emplear una alta concentración del cromógeno.

El nitrato, el oxalato y el tiocianato afectan la determinación. Se les evita con un tratamiento previo de la muestra con el oxidante. El cobre (I) forma también un complejo colorido con el PDT, el problema puede solucionarse al agregar cianuro de sodio. Esta adición provoca la decoloración instantánea del complejo Cu(I)-PDT mientras que, con el Fe(II)-PDT la decoloración es más lenta dando la oportunidad de efectuar la lectura sin que el cobre presente afecte.

El método es simple y rápido. La elevada sensibilidad del PDT como un reactivo cromógeno y la facilidad de extracción del complejo de hierro (II) permite la determinación de cantidades micrográmicas en las muestras

a analizar. El PDT no es costoso y se le sintetiza fácilmente (11).

2. La 3-(4-fenil-2-piridil)-5,6-difenil-1,2,4-triazina o PPDT. Es un cromógeno que funciona en forma semejante al PDT pero es mucho más sensible. Sin embargo, el costo y la dificultad de su síntesis es una seria limitación para su empleo (11).
3. La tiosemicarbazona del piridoxal o PT. Es un ligando cromógeno que forma un complejo colorido con el hierro (III) a un pH ácido. El complejo formado se extrae con alcohol bencílico y la absorbancia se mide a 430 nm (96).
4. La 2,6-dihidroxiimino-3-metilenpiperidina o metilenglutarimidioxima. Es un compuesto perteneciente a la agrupación imidoxima. Estos compuestos presentan gran capacidad de formar complejos coloridos con el hierro. El complejo Fe(III)-metilenglutarimidioxima se forma a un pH aproximado de 5.5. Tiene un color pardo y se le puede determinar espectrofotométricamente a una longitud de onda de 475 nm (100).
5. La 2,2'-dipiridil-2-quinolilhidrazona reacciona con el hierro (II) formando un complejo muy insoluble en medio acuoso pero soluble en varios solventes orgánicos

como acetona, benceno, tolueno y clorobenceno.

Otomo y sus colaboradores (92) recomiendan reducir el hierro (III) a hierro (II) con ácido ascórbico, mantener el pH entre 3.4 y 4.5 y leer a una longitud de onda de 644 nm.

6. El ácido 1-hidroxi-4-sulfo-2-naftóico. Este compuesto forma un complejo estable con el hierro (III). El quelato formado presenta una amplia banda de absorción (460-500 nm) con alta estabilidad a pH 8. La síntesis del reactivo es sencilla.

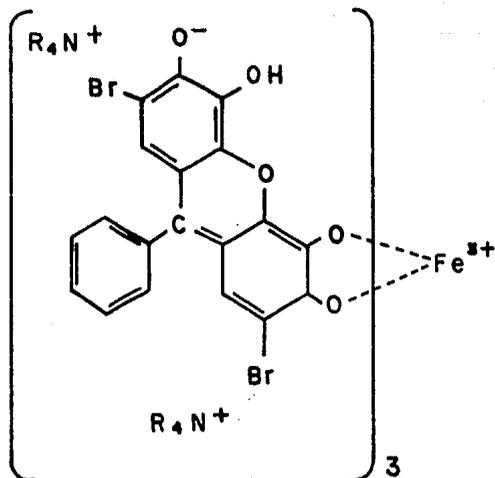
Como desventajas al uso de este reactivo hay que hacer notar que, la solubilidad de éste en medio acuoso es baja y su concentración debe ser veinte veces mayor que la concentración del hierro en la muestra (71).

7. El complejo colorido azul formado entre el rojo de bromopirrogalol(BPR)-cetiltrimetilamonio(CTTAB) y el hierro sin importar su estado de oxidación presenta una absorción máxima de 635 nm. El manganeso (II) y el vanadio (V) interfieren en la determinación.

Se cree que la estructura del complejo formado es la que se muestra en la siguiente página.

El método que emplea este reactivo es adecuado para determinar hierro total. No requiere agentes reductores u oxidantes adicionales, por lo cual es una técnica acce

sible de manejar (129).



6. La piridin-2-hidrazina. Forma con el hierro (II) un complejo color rosa con una absorbancia máxima de 510 nm. La formación del complejo sólo se desarrolla en medio alcalino siendo el pH óptimo de 13. Para que el complejo formado sea más estable se adicionan agentes reductores como el ácido ascórbico o el clorhidrato de hidroxilamina (1).
  
9. El ácido 5-cloroindol-2-carboxílico. Reacciona con el hierro (III) produciendo un compuesto colorido que se extrae en alcohol isoamílico y se lee a 339 nm. El reactivo tiene poca selectividad, pero admite su aplicación en presencia de alcalinos, alcalinotérreos y algunos otros iones que acompañan comúnmente al hierro (III) como el zinc (II) y el níquel (I) (104).

10. El di(2-piridil)-N,N-di[(8-quinolil)amino] metano o DPQAM. Forma un complejo color verde con el hierro (II) que se extrae con cloroformo en presencia de perclorato y se mide su absorbancia a 685 nm con un pH entre 3.5 y 6.5. Compuestos de este tipo apenas están siendo utilizados como reactivos analíticos para la determinación de hierro (38).
11. La fenilbiguanidina en medio de cianuro reacciona con el hierro (II) produciendo un complejo soluble color rojo. En presencia de reductores, el máximo desarrollo de color se alcanza en 1 hora. La longitud de onda en la que se obtiene la máxima absorbancia es de 520 nm. El método presenta la gran desventaja que implica el riesgo de trabajar con cianuro (79).
12. El 1,2,4-triazolil-(3-azo-1)-2-naftol o TRAN. Interactúa con el hierro (III) para formar un complejo de color rojo en medio ligeramente ácido. La formación de dicho complejo es inmediata y su color estable durante por lo menos 85 minutos (24).
13. En los últimos años se han desarrollado técnicas para cuantificar cantidades traza de hierro. Esta consiste en formar un complejo con el hierro y adsorber éste en naftaleno. La mezcla de naftaleno adsorbido puede disolverse en diferentes solventes como la N,N-dimetilformamida,

cloroformo, benceno, tolueno o xileno, dependiendo del complejo que se forme y se mide la absorbancia máxima de la solución que dependerá asimismo del solvente empleado.

En la tabla III se mencionan los reactivos, disolventes y longitudes de onda requeridas para la cuantificación del hierro.

14. El 1,2-dihidroxi-benceno-3,5-ácido disulfónico o Tiron.

Es un reactivo que forma con el hierro (III), a un pH 10, un complejo color rojo intenso con un máximo de absorción a 470 nm.

El método puede usarse para determinar hierro (III) en presencia de cantidades considerables de iones fluoruro y fosfato, de los que se sabe son fuertes agentes acomplejantes del hierro (III) (13).

15. La 8-hidroxi-quinolina. Forma con el hierro un complejo verde oscuro que puede medirse espectrofotométricamente (87).

16. El ácido 7-iodo-8-hidroxi-quinolin-5-sulfónico. Forma con el hierro (III) un compuesto verde a un pH entre 2.7 y 3.2 que se determina colorimétricamente (87).

17. Entre los numerosos agentes quelantes análogos al EDTA se encuentra el ácido etilendiaminotetrametilfosfórico

TABLA III

Reactivo	Forma iónica de hierro con que reacciona	Disolvente	Long. onda (nm)	Interferencias	Referencias
Oxina	Fe (III)	Dimetilfor mamida	462	Oxalato, EDTA	(106)
5-cloro-7- iodo-8-qui nolinol		Dimetilfor mamida, ben ceno, tolu eno, xileno, cloroformo, clorobenceno	480*		(107)
Amonio pi rrolidin tiocarb mato	Fe (III)	cloroformo	357**	Cu (II), Ca (II), Ni (II), fosfatos	(109)

\* pH 1.8 a 4.5

\*\* pH 4.7

o AEDTMF. Forma con el hierro (III) a un pH 4, un complejo que presenta un máximo de absorción a 255 nm. En la determinación deben ser removidos los siguientes iones: Bi(III), Pd(II),  $VO_5$ , Cu(II) y Ce(IV).

El reactivo ha sido aplicado en la determinación de hierro en hígado y riñón de cerdo (16).

18. De los pocos compuestos que forman complejos con el hierro a una absorbancia máxima dentro de la banda infrarroja se encuentra el 2-(2-triazolilazo)-5-dimetilaminofenol o TAK con una absorción característica a 760 nm y un pH alcalino de 9. El compuesto color café se extrae con cloroformo.

El método se utiliza en el análisis de agua. Los resultados que se obtienen concuerdan con los obtenidos por absorción atómica (119).

#### II.1.4.3.2. DETERMINACION DE HIERRO POR ESPECTROSCOPIA ATÓMICA:

La espectroscopia de absorción y emisión atómica se basan en un proceso de excitación y decaimiento al estado fundamental de los electrones de los átomos. Por esta razón, ya sea la energía absorbida en el proceso de excitación o la emitida en el proceso de decaimiento puede ser medida y usada para propósitos analíticos. Arriba de setenta elementos pueden ser determinados usando estas técnicas (30).

a) ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN ATÓMICA:

La facilidad y velocidad a la cual se pueden hacer determinaciones exáctas utilizando la espectroscopía de absorción atómica ha hecho que esta técnica sea uno de los métodos más populares para la determinación de metales. Entre las más recientes aplicaciones de ésta se encuentra la cuantificación de micronutrientes como el hierro en material biológico y alimentos (28, 30). Se han investigado diferentes flamas para su determinación, siendo la más satisfactoria la de aire-acetileno que parece estar libre de interferencias químicas, de matriz y de ionización o, que en todo caso, son fáciles de solucionar. Esta flama alcanza temperaturas entre 2125°C y 2400°C (28, 30, 60).

Para evitar los errores debido, a menudo, a la falta de control sobre la flama y al efecto de la dilución sobre la población de átomos, se realizaron una serie de investigaciones que condujeron a la invención del horno de grafito. Este es un aparato de muestreo que puede determinar muchos elementos en concentraciones mil veces más bajas que las que se pueden detectar con la llama. La energía requerida para la atomización es obtenida aplicando una diferencia de potencial eléctrico a través de un tubo de grafito dentro del cual se ha colocado la muestra. Las interferencias, ya sea espectrales y/o de ionización son relativamente raras en

esta técnica pues, se usan monocromadores de alta resolución y bandas de absorción muy estrechas.

La elección entre la llama y el horno de grafito se determina en forma general de la siguiente manera: si alguna muestra puede ser analizada por cualquiera de los dos sistemas, es mejor utilizar la llama. La absorción atómica con llama es más rápida que con horno (5-10 segundos por determinación con llama contra 2-3 minutos para el horno). Generalmente son más convenientes las medidas con llama (simple aspiración de las soluciones de la muestra contra la inyección volumétrica para el horno). Pero, cuando las concentraciones del analito empiezan a aproximarse al límite de detección los puntos fuertes del horno empiezan a primar. La alta sensibilidad de éste determina su elección para la determinación de ultratrazas de analito. El requerimiento de un pequeño volumen de muestra para el horno de grafito puede también influir en su elección, cuando es limitado el volumen de muestra.

Isaac (60) reporta que, a una longitud de onda de 2483.3 Å puede detectarse de 2 a 20 µg/ml de hierro con un límite de detección de 0.005 µg/ml y una sensibilidad de 0.15 µg/ml.\*

\* Los términos "sensibilidad" y "límite de detección" describen dos características de rendimiento instrumental en absorción atómica. La "sensibilidad" es una conven

La absorción atómica, ya sea con flama o con horno de grafito, ofrece muchas ventajas sobre otros métodos. David (31) indica que la absorción atómica se prefiere sobre los métodos colorimétricos para determinar hierro en base a que es una determinación libre de interferencias, rápida y sencilla, mientras que algunos métodos colorimétricos requieren efectuar extracciones complicadas para eliminar los iones interferentes antes de desarrollar el color. Con respecto a la emisión atómica, se mencionará las ventajas de la absorción sobre ésta en la siguiente sección.

#### b) ESPECTROSCOPIA DE EMISION ATOMICA:

En las técnicas de emisión (flama, arco y chispa, plasma, fluorescencia de rayos X y análisis de activación de neutrones) los átomos son excitados con una forma de energía como flama, arco eléctrico, plasma, etc. respectivamente. La sensibilidad de las mediciones son altas, pudiendo manejar normalmente muestras con una concentración de 0.1 a 50 mg/l. La técnica empleada es simple, por lo que se le usa en la determinación rutinaria de hierro en alimentos y material biológico en general (61, 118, 124).

Se ha demostrado que los métodos de absorción atómica

- \* ción para definir la pendiente de la curva de calibración con respecto a la concentración de cada elemento. Para la absorción atómica con llama, se le expresa en

son mejores que los de emisión atómica con flama por ser más sensibles, precisos y exactos. El costo del equipo de absorción atómica es mayor que el equipo de emisión con flama, sin embargo, se prefiere el primero por la amplia gama de análisis que puede realizar y por la seguridad de sus resultados, aunque es más fácil manejar la emisión atómica cuando se desean realizar determinaciones simultáneas.

Una innovación en la espectroscopía de emisión ha sido el empleo de fuentes de energía de plasma y de arcos eléctricos de corriente alterna y directa para la determinación de metales en plantas (30). Con estas técnicas se alcanzan temperaturas de hasta  $9000^{\circ}\text{C}$  y así, los efectos por interferencia química se evitan.

La espectroscopía de fluorescencia de rayos-X es un método aplicable a la cuantificación de elementos con número atómico mayor a 11. La técnica se fundamenta en el hecho de que, cuando un elemento es irradiado con suficiente energía, se produce una fluorescencia que es característica de tal elemento. La medida de la intensidad y la longitud de onda de la radiación fluorescente permite la cuantificación de éste. El método es rápido, independiente de la combinación química del elemento a determinar y no destructivo en

\* términos de concentración del elemento en microgramos por mililitro requerida para producir una absorbancia de 0.0044. El conocimiento de la "sensibilidad" esperada

el sentido de que la muestra no se destruye aunque puede requerir una preparación previa (23). La espectroscopía de fluorescencia de rayos-X presenta la desventaja de ser un equipo costoso y necesita ser manejado por operadores expertos en el análisis de metales traza. El método ha sido aplicado en la determinación de tales metales en carne, pero la correlación con las determinaciones químicas es baja en ciertos casos (30).

Bergerioux y Haerdi (15) recomiendan concentrar el metal a determinar, en este caso hierro, mediante una coprecipitación con compuestos orgánicos como la mezcla de o-fenantrolina y tetrafenilborón, evitando así las interferencias de matriz. También se obtienen buenos resultados mediante la preconcentración de la muestra con resinas de intercambio o con adsorción en carbón (52).

El análisis de activación de neutrones es uno de los métodos más sensibles para la determinación de cantidades traza de metales en material biológico. Sin embargo, su alto costo al necesitar un reactor nuclear y el tiempo requerido para el análisis ha sido la causa de su escaso uso por parte de los investigadores. El método se fundamenta en bombardear la muestra con neutrones, convirtiendo los

\* permite a un operador determinar si las condiciones instrumentales están optimizadas y si el instrumento está rindiendo de acuerdo a sus especificaciones, simplemen-

átomos de dicha muestra en isótopos con una unidad de masa atómica más alta y emitiendo una radiación gamma. La energía de la radiación es característica de cada elemento por lo que se emplea un espectrofotómetro capaz de medir dicha radiación para así determinar la cantidad de elemento presente. Al igual que en la fluorescencia de rayos-X, se recomienda preconcentrar la muestra con resinas de intercambio iónico o con adsorción en carbón (52).

Todas las técnicas de emisión tienen la desventaja de que sólo una pequeña porción de la población de átomos es excitada, en comparación con la absorción atómica en donde el fenómeno observado es total. Por otra parte, se pueden producir radiaciones ajenas a la radiación de interés, provocando resultados erróneos (30).

\* te midiendo la absorbancia de una concentración conocida y comparando el resultado con el valor esperado.

La definición de "límite de detección" es una indicación de la más baja concentración del elemento que puede ser medida. Se define como la concentración que haga el cociente señal/ruido igual a 2.

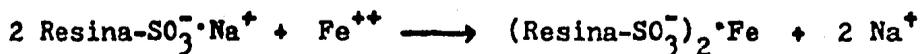
#### II.1.4.3.3. DETERMINACION DE HIERRO POR CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO:

Los principios de la cromatografía de intercambio iónico fueron reconocidos hace cientos de años, pero sólo en las últimas décadas se ha adaptado el análisis de diversos elementos (94).

La cromatografía de intercambio iónico es un proceso físico-dinámico en el cual los componentes de una mezcla son separados debido a las diferentes afinidades de los iones en solución por sitios de polaridad opuesta en la fase estacionaria (95). A través de este mecanismo, se retienen por un tiempo discreto y reproducible las mezclas estándares de los iones de interés en la columna. Dichos tiempos de retención se establecen para cada uno de ellos. A medida que los iones eluyen por la columna, se cuantifican con un detector que produce un signo eléctrico proporcional a la concentración del ión en la muestra (31).

La cromatografía de intercambio iónico tiene la ventaja de poder analizar con exactitud la concentración de varios iones en un mismo análisis, ser rápida y requerir una mínima preparación de la muestra (93), pero, por otra parte tiene el inconveniente del alto costo de las columnas, el tiempo invertido en la constante regeneración de las resinas y la necesidad de que el analista tenga cierta práctica para realizar la determinación eficientemente.

Para la cuantificación de cationes como el hierro (II) y el hierro (III), se emplean resinas de intercambio catiónico, las cuales contienen grupos polares firmemente unidos a la estructura de la resina, mientras que el catión es intercambiable (10). Para este tipo de determinación, las resinas empleadas contienen aniones de los ácidos sulfónicos en donde el catión intercambiable puede ser  $H^+$  o  $Na^+$ ; llevándose a cabo la reacción de intercambio como se ilustra a continuación:



La cromatografía de intercambio iónico ha sido utilizada en la determinación de estos cationes en cerveza y bebidas enlatadas (29).

#### II.1.4.4. METODOS BIOLOGICOS:

Las diferencias en el aprovechamiento de hierro de varios alimentos o sales de hierro han sido reconocidas desde hace tiempo. El determinar el contenido de hierro en alimentos o dietas es claramente insuficiente para evaluar su valor biológico. Así pues, se requieren métodos para estimar la cantidad de hierro aprovechable que proveen los alimentos. Esta estimación con humanos es difícil y, a veces, requiere para mayor efectividad usar isótopos radiactivos de hierro, lo que limita la aplicabilidad general de este tipo de procedimientos. Los métodos químicos, si bien son útiles para la determinación de hierro total, son aún de aplicación cuestionable para cuantificar el hierro absorbible y deben, en cualquier caso, ser validados por métodos biológicos (5). Así pues, es clara la necesidad de contar con ensayos sobre especies animales cuyos resultados sean, en cierta forma, aplicables al hombre, lo cual aún no se ha logrado del todo ya que existen diferencias en el aprovechamiento de hierro aún entre las mismas especies, lo cual se debe en gran manera a la combinación de alimentos con los que se nutre (5).

El método oficialmente aceptado para la determinación de hierro aprovechable en alimentos es el conocido como "Prueba de Carencia de Hemoglobina" (9). Se trabaja con ratas hembras recién destetadas a las que se alimenta por cu

tro semanas o más con una dieta de caseína baja en hierro, hasta que éstas quedan en estado de anemia (menos de 6 g de hemoglobina/100 ml de sangre). Posteriormente se les divide en grupos de ocho ratas cada uno, donde uno de ellos continúa con la dieta basal, otro es sometido a una dieta de referencia con  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y los otros a las dietas a probar por dos semanas. Transcurridas éstas, se toma una muestra de sangre de cada animal (tomar 0.02 ml de la vena de la cola) y se determina el contenido de hemoglobina como se indica en el apéndice I, sección A (44).

Amine y sus colaboradores (5), además del método anterior, compararon la determinación del hematocrito y del peso corporal como índices de respuesta al hierro absorbido en ratas y pollos, encontrando que este último es un criterio poco sensible de respuesta, mientras que la técnica del hematocrito es igualmente satisfactoria que la prueba de carencia de hemoglobina (el hematocrito es el porcentaje de la sangre constituido por eritrocitos. Se estima centrifugando la sangre en un tubo graduado a 100%). Posteriormente, Amine y Hegsted (4) aplicaron ambas técnicas en la evaluación de hierro absorbible en alimentos.

Johnson y sus colaboradores (67) determinan hemoglobina y hematocrito en ratas y cuantifican la absorción de hierro con isótopos radiactivos de hierro administrado a los animales en la dieta y medidos 1, 3, 6 y 9 días después

de su ingestión.

Posiblemente el método más sensible y factible para identificar la deficiencia de hierro es determinar la concentración de éste en la transferrina de la sangre. La saturación normal es del 33%; menos del 15% es índice de deficiencia (99).

Las pruebas de aprovechamiento de hierro han sido aplicadas a productos de panificación, ya que es común enriquecer dichos alimentos (67, 86).

Harrison y sus colaboradores (53) han realizado diversos estudios con ratas para determinar buenas fuentes de hierro para ser usadas como materia prima en el programa de enriquecimiento de cereales en Estados Unidos, siendo el sulfato ferroso ( $\text{FeSO}_4$ ) el preferido por su buen aprovechamiento y bajo costo.

**.III. RECOMENDACIONES DE METODOS DE ANALISIS  
DE HIERRO PARA GRUPOS DE ALIMENTOS**

### III.1. ACEITES Y GRASAS:

La determinación de metales traza en aceites es problemática, sobretodo en lo que respecta a la preparación de la muestra porque la técnica común de cenizas causa serios errores de salpicado, espumado o volatilizaciones. Sin embargo, Mc. Gary y Young (83) indican que los aceites y grasas pueden prepararse para la determinación de hierro por absorción atómica mediante un secado en la estufa a 105°C, carbonización con una lámpara de rayos infrarrojos y calcinación en la mufla elevando la temperatura poco a poco hasta 525°C. Finalmente, las cenizas obtenidas se disuelven en ácido clorhídrico, se aforan con agua destilada y están listas para ser analizadas.

Por otra parte, Hon y colaboradores (55), Lau y Mok (72), han determinado hierro en muestras de aceites vegetales directamente, eliminando los pasos de digestión durante los cuales afirman que hay pérdidas por fusión de la muestra, volatilización, etc. Ellos aplican la disolución de una dilución del aceite (15 - 20%) en ácido propiónico o 4-metil-2-pentanona : etanol (8:3), sugiriendo que el ácido propiónico es menos adecuado por su olor pungente, su carácter corrosivo y porque su alta viscosidad provoca pérdidas en la sensibilidad. Una vez preparada la muestra, se determina el metal por espectroscopía de absorción atómica (55), o por su reacción colorida con la o-fenantroli-

na (72).

### III.2. AGUA:

Nigo y sus colaboradores (90) indican que el hierro se puede encontrar en el agua en forma de ión, acomplejado con ligandos orgánicos o inorgánicos, como coloide, etc., por lo que la adición de un ácido como el clorhídrico o el nítrico puede impedir la oxidación del hierro (II) a hierro (III), convertir el hierro iónico el hierro que forma parte de complejos, coloides o compuestos orgánicos, lo que hace factible la determinación colorimétrica del metal.

El agua tiene diversas modalidades para ser tratada con el fin de determinar la cantidad de hierro en ella presente. La más común consiste en filtrar la muestra a través de una membrana de 0.45  $\mu$ m, acidificar la solución con 1 - 5 ml de ácido nítrico o clorhídrico por cada litro de muestra y guardar en botellas de polietileno. Con una alícuota de esta solución se procede a desarrollar color con o-fenantrolina midiendo la absorbancia del complejo a 512 nm. Esta técnica ha sido automatizada pues, a veces, se presenta la necesidad de determinar hierro total en gran número de muestras, pudiéndose realizar hasta 180 determinaciones por hora con un consumo mínimo de muestra y reactivo (88).

Puede emplearse también, un nuevo método espectrofo-

tométrico basándose en la medición directa de la absorbancia de una resina después de que ésta adsorbe el complejo formado entre el hierro y la o-fenantrolina (90).

En caso de quererse analizar los diferentes estados químicos del hierro (elemental, ferroso, férrico, etc) en una muestra de agua, Lee y Clydesdale (74) desarrollaron un procedimiento de extracciones físicas y químicas para separar y cuantificar las distintas formas de hierro por espectroscopía de absorción atómica y espectroscopía visible.

A menudo, el hierro en el agua potable se encuentra en muy bajas concentraciones. Monier-Williams (87) indica que, arriba de 1 ppm de hierro provoca un sabor distinto al agua. Estas bajas concentraciones hacen necesario manejar cantidades muy altas de muestra, por lo que se han desarrollado varios métodos para concentrar el hierro u otros metales antes de su determinación. Los más frecuentemente reportados son la electrodeposición, la adsorción en carbón, el intercambio iónico, la coprecipitación, la extracción con solventes, la evaporación y la liofilización (15). Hay que hacer notar que existen zonas en donde la concentración de hierro en el agua es mayor alcanzando valores de 3 a 8 ppm.

De entre las técnicas de concentración, Bergerioux y Haerdi (15) recomiendan la coprecipitación de hierro

antes de su determinación por fluorescencia de rayos X, empleando una combinación de o-fenantrolina y tetrafenilborón como precipitantes, los cuales provocan una rápida coprecipitación de elementos traza disueltos, luego, el precipitado se colecta en un filtro, se extiende y analiza en la unidad de rayos X.

La liofilización es recomendada por Hall y Gondinho (52) antes de someter la muestra al espectrofotómetro de absorción atómica.

La extracción con solventes (sobretudo pirrolidintio-carbamato de amonio y 2,6-dimetil-4-heptanona) es probablemente la técnica más usada para concentrar la muestra antes de determinar el hierro por espectroscopía de absorción atómica. La muestra se oxida previamente con sulfato de cerio (IV) al 1% (w/v), se extrae con el solvente y se determina el hierro a una longitud de onda de 248.3 nm con una flama de aire-acetileno (19).

### III.3. CARNE Y DERIVADOS:

En este tipo de productos, gran parte del hierro se encuentra en la estructura de la mioglobina, por lo cual es fácilmente absorbible, presentando un alto potencial alimenticio. De entre estos alimentos los más ricos en este mineral son el hígado y los riñones, los cuales han

sido estudiados exhaustivamente por diversos investigadores.

La carne y sus derivados pueden ser calcinados a  $525^{\circ}\text{C}$  y sus cenizas disueltas en ácido clorhídrico, siendo determinado el contenido de hierro por espectroscopía de absorción atómica (83). Blanusa y Breski (18) no recomiendan tal calcinación pues han comprobado que, alimentos como el hígado presentan ligeras pérdidas del metal al adherirse éste a las paredes del crisol, siendo difícil su remoción durante el lavado, por lo cual recomiendan una digestión con ácido nítrico.

Iida y sus colaboradores (57) diseñaron un recipiente de teflón con cierre hermético, en donde se digiere la muestra con una mezcla de ácido nítrico - ácido perclórico, sin peligro de contaminaciones o explosiones y, con mayor rapidez. En la muestra digerida se determina el contenido de hierro por espectroscopía de absorción con nebulización discreta.

Williams (124) recomienda eliminar la grasa en los productos cárnicos antes de proceder a analizarlos por espectroscopía de absorción atómica. En el apéndice II, sección A, se detalla la técnica sugerida por este investigador.

### III.4. CEREALES:

La mayoría de los cereales contienen gran cantidad de hierro, pero por el ácido fítico también presente, este elemento es poco aprovechable, de ahí que se enriquezcan o fortifiquen las harinas y otros productos de cereal con diversas sales de hierro como el citrato férrico amónico y otras de hierro reducido.

Hoffman, Scheitzer y Dalby (54) recomiendan la cuantificación de hierro en pan y harina de diferentes variedades de trigo con tiocianato, tratando la muestra antes de calcinarla con NaOH 1N para prevenir la pérdida de hierro, indicando que los resultados obtenidos con esta técnica concuerdan con los procedimientos colorimétricos de la o-fenantrolina y del  $\alpha, \alpha'$ -dipiridilo. Por otro lado, Mc. Gary y Young (83) no mencionan la necesidad de adicionar sosa u otro fundente a la muestra para evitar pérdidas de este metal durante la calcinación.

Tanto Williams (124) como Weaver y sus colaboradores (122), preparan las muestras mediante una digestión húmeda. Williams sugiere tratamiento con ácido nítrico concentrado o una mezcla de ácido clorhídrico - peróxido 30 volúmenes (50:1); mientras que Weaver y sus colaboradores (122) predigieren con ácido nítrico concentrado y luego adicionan ácido perclórico al 70% para completar la digestión.

La destrucción de la muestra puede llevarse a cabo tam

bién con una mezcla de ácido nítrico - ácido perclórico - ácido sulfúrico (69).

La A.A.C.C. (3) especifica dos métodos para determinar hierro en cereales preparando la muestra mediante calcinación y realizando la determinación con:

- a) O-fenantrolina, usando una curva de calibración para determinar la concentración de hierro.
- b) Espectroscopía de absorción atómica, usando flama de aire-acetileno a una longitud de 248.3 nm.

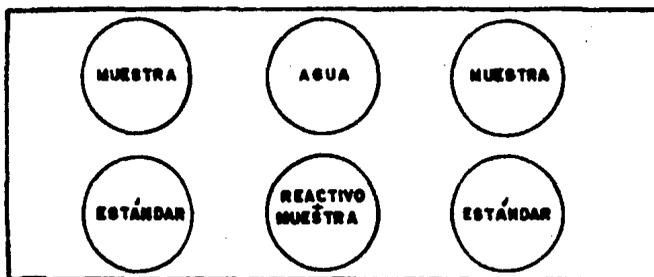
La técnica de la o-fenantrolina ha sido automatizada por Loewe y Ranum (76), quienes determinan el hierro en harinas de diferentes cereales, tanto enriquecidas como no enriquecidas, a una velocidad de cincuenta determinaciones por hora, incluyendo los estándares.

### III.5. CERVEZA:

Normalmente hay trazas de hierro en todas las cervezas. El hierro que no ha sido eliminado durante la filtración, proveniente del agua y la materia prima, se elimina en gran parte al formarse el coágulo en la operación de reposo. Sin embargo, permanecen trazas del metal que tienden a aumentar por el contacto subsecuente con superficies mecánicas, las que a menudo están formadas con hierro.

Las cantidades de hierro normalmente presentes en la cerveza son 0.5 ppm o menos. Es importante controlar el con

tenido de este elemento porque un ligero exceso a la concentración antes mencionada provoca en el producto final un sabor amargo, coloración oscura y pérdida de brillo y espuma. Gray y Stone (49) han desarrollado un método rápido cuyos resultados son generalmente satisfactorios para el trabajo rutinario de control. Colocan 10 ml de la cerveza sin gas en tres tubos, añaden 0.5 ml de  $\alpha, \alpha'$ -dipiridilo y calientan a baño maría a 70°C por 30 minutos para desarrollar el color que luego comparan visualmente en un block contra una solución estándar a diferentes concentraciones y un blanco; tal como se indica en la figura:



El método tiene la ventaja de que, en caso de requerirse un mayor grado de precisión, puede adaptarse a una lectura espectrofotométrica.

La determinación de hierro en cerveza se puede efectuar por espectroscopía de absorción atómica. Williams (124) recomienda la digestión húmeda de la muestra con ácidos,

mientras que Mc. Gary y Young (83) prefieren la calcinación de ésta.

Se ha reportado el uso del ferricianuro para la determinación de hierro en cerveza, pero el método se critica por el exceso de manipulación y el largo tiempo que se invierte, lo que aumenta la posibilidad de pérdidas por combinaciones (49).

La cromatografía de intercambio iónico también es una técnica aplicable a la cuantificación de hierro en cerveza.

### III.6. ENLATADOS:

El carácter perecedero de los alimentos consumidos por el hombre ha obligado a desarrollar técnicas de conservación en los que se ha logrado reducir las pérdidas debidas a la descomposición y degeneración de los alimentos, a la vez de mejorar los suministros de los mismos y reducir su costo.

El enlatado es un método de conservación basado en la esterilización, por el que los microorganismos y enzimas son inactivados por completo al calentarse el alimento en latas herméticamente cerradas (80). No se ha elaborado un recipiente universal para el manejo y enlatado de todo tipo de alimentos y, aunque la hojalata da buenos resultados, a menudo sufre corrosión y por ende, contaminación por

otros metales. Los problemas más comunes causados por éstos son la decoloración o formación de colores extraños y la producción de sabores y olores desagradables.

Estos problemas de contaminación metálica pueden deberse a contaminación previa al enlatado o, a una reacción entre el material que constituye el alimento y el recipiente en que se enlata. En el primer caso, la contaminación proviene de la materia prima y los aditivos empleados en la elaboración del alimento, así como de los distintos ingredientes usados para el líquido de cobertura (salmuera, jarabe o aceite), haciendo la aclaración de que, cuando este líquido es aceite, el aporte de minerales es considerado prácticamente nulo dado que, por sí mismos, los aceites acabados contienen ínfimas concentraciones de elementos minerales por la desmetalización a que son sometidos durante el proceso de refinado (80). La contaminación también puede darse en la elaboración propiamente dicha, en esta etapa el paso de elementos traza al producto están en función de la temperatura y el tiempo requeridos para la esterilización, cualquier variación de éstos puede provocar la alteración del alimento. Por ejemplo, una temperatura de  $118.3^{\circ}\text{C}$  o más, rompe las uniones de azufre de las proteínas combinándose con el hierro para formar el sulfuro de hierro (color negro), lo que provoca una apariencia desagradable en el producto (87). En el segundo caso (reacción

entre el material del alimento y del recipiente), la contaminación se puede deber a un proceso de corrosión pues, a pesar de que la lata de hojalata está constituida básicamente por una delgada lámina de acero dulce recubierta por ambas caras con una capa de estaño, dichas capas no siempre presentan una estructura continua, sino que ésta se ve alterada en mayor o menor grado por la porosidad natural o por la producida por los daños o defectos mecánicos derivados de la manipulación a que se ve sometido el material. Esta falta de continuidad de las capas metálicas permite que el producto envasado entre en contacto con los diferentes metales constituyentes, con la consiguiente formación de pilas galvánicas en las que el alimento actúa como electrolito, produciéndose la disolución del metal que constituye el ánodo con la consiguiente incorporación de iones metálicos, al tiempo que el metal que forma el cátodo permanece inalterado. La consecuencia final de este proceso de corrosión es el enriquecimiento o contaminación, según sea el caso, de elementos minerales en los productos envasados. Estos elementos son fundamentalmente hierro, estaño, plomo y zinc. Los dos primeros pueden provenir de la aleación de  $\text{FeSn}_2$  o de estaño libre, mientras que el plomo y el zinc forman parte de la aleación soldante utilizada en la costura lateral de los envases convencionales de tres piezas (un

cuerpo y dos tapas) (80).

Además de que el hierro puede producir colores indeseables en el alimento envasado, también acelera la oxidación de compuestos constituyentes del alimento como son las grasas, provocando el enranciamiento del producto. Por ello, es importante mantener un control estricto sobre el contenido mineral, en el caso que nos ocupa, sobre el contenido de hierro, para evitar posibles problemas en el producto final.

El método más usado para la determinación de hierro en enlatados consiste en digerir la muestra con ácidos como el nítrico, la mezcla de ácido clorhídrico - peróxido de hidrógeno 30 volúmenes (50:1) o de ácido sulfúrico - ácido nítrico - peróxido de hidrógeno; y cuantificar el hierro por espectroscopía de absorción o de emisión atómica con fuente de plasma (61, 80, 124).

Loría y Villanueva (77) sugieren para cuantificar hierro en frutas enlatadas, una digestión húmeda seguida de calcinación en mufla y cuantificación espectrofotométrica de hierro en las cenizas por el método colorimétrico con  $\alpha, \alpha'$ -dipiridilo.

### III.7. ESPECIAS:

Estos productos tienen un alto contenido de hierro que proviene, principalmente, de la maquinaria de molien-

da. Las especies enteras deben ser molidas a un tamaño de partícula característico antes de su preparación para el análisis en un molino de aluminio con cuchillas de tungsteno-carbide y cubiertas de plástico para evitar la posible contaminación.

Fox y Bender (43) recomiendan digerir las muestras en ácido clorhídrico (el tiempo de digestión para 0.5 g de muestra es aproximadamente 20 minutos), aforar a un volumen determinado con agua destilada y determinar el hierro por absorción atómica o colorimétricamente, con o-fenantrolina, siguiendo la misma digestión.

### III.8. FRUTAS Y VERDURAS:

Por lo general, para el análisis de hierro en frutas y verduras, se recomienda aplicar los mismos métodos (75, 83, 124).

Algunos autores señalan que la calcinación de este tipo de muestras rinde buenos resultados, determinando posteriormente el contenido de hierro por espectroscopía de absorción atómica (83, 110) o colorimétricamente con tiocianato de potasio (98).

Por otra parte, Williams (124) recomienda la digestión húmeda ya sea con ácido nítrico o con una mezcla de ácido clorhídrico - peróxido de hidrógeno 30 volúmenes en una relación 50:1 antes de cuantificar el hierro por espec

troscopía de absorción atómica.

Loría y Villanueva (77), en el caso de las frutas, realizan la medición del metal preparando la muestra mediante una digestión húmeda con ácidos, seguida de calcinación en mufla y cuantificando espectrofotométricamente el calcinado a base de desarrollar el color del complejo hierro-dipiridilo a 530 nm, obteniendo resultados bastante aceptables, además de comprobarse la sensibilidad y precisión del método.

En el Apéndice II, sección B, se detallan algunas de las técnicas de preparación y análisis de este tipo de alimentos.

### III.9. JUGOS Y OTRAS BEBIDAS NO ALCOHOLICAS:

Los jugos pueden trabajarse de igual manera que los vinos para determinar el contenido de hierro.

Saywell y Cunningham (111) recomiendan el uso de la o-fenantrolina con la variante de digerir, diluir y desarrollar color en un mismo tubo de prueba evitando así, posibles pérdidas debido a la transferencia del digerido o el calcinado a un matraz volumétrico. De manera semejante, Jayman y colaboradores (65) analizan el té (véase apéndice II, sección C).

Lee y Clydesdale (74) prefieren el uso de batofenantrolina en lugar de o-fenantrolina, y digerir con ácidos

perclórico y nítrico.

Los jugos de fruta pueden ser acidificados, filtrados, decolorados con carbón activado y diluidos. A una alícuota de esta solución se le agrega clorhidrato de hidroxilamina, buffer de acetatos (pH 4.8) y  $\alpha, \alpha'$ -dipiridilo, leyéndose la absorbancia del complejo colorido formado a 530 nm (33).

Mc. Gary y Young (83) se inclinan por la calcinación de la bebida antes de cuantificar el hierro por espectroscopía de absorción atómica. Para mayores detalles, ver el apéndice II, sección C.

### III.10. LECHE Y DERIVADOS:

El contenido de hierro en leche no puede ser determinado con suficiente exactitud por métodos gravimétricos y volumétricos debido, principalmente, a la gran cantidad de fosfatos presentes en ella. Stugart (114) propone un método en el que el hierro se cuantifica como sulfocianato férrico (tiocianato férrico), indicando que la exactitud de los resultados depende ante todo, de la preparación adecuada del material para el análisis. También recomienda la calcinación tomando las precauciones necesarias para prevenir las pérdidas y la fusión de las cenizas. Una vez obtenidas éstas, sugiere disolver en ácido clorhídrico, hidrolizar durante 20 minutos, extrayendo el hierro con al-

cohol isoamílico determinándolo colorimétricamente con tío cianato.

El hierro en leche también puede determinarse mediante una reacción colorida con ácido mercaptoacético (tioacético) digiriendo la muestra con ácido sulfúrico concentrado o ácido perclórico en matraces microkjeldahl (5 cc de leche fluida o 0.5 g de leche en polvo requieren de 30 minutos a 2 horas para completar la digestión), leyendo la absorbancia de la solución en un espectrofotómetro a 535 nm (73).

Williams (124) recomienda la digestión con ácido nítrico concentrado o con una mezcla de ácido clorhídrico - peróxido de hidrógeno 30 volúmenes (50:1) antes de determinar el contenido de hierro por espectroscopía de absorción atómica empleando una flama de aire-acetileno, en horno de grafito o la técnica de emisión con fuente de plasma; siendo esta última la que ofrece mayor sensibilidad y amplios rangos de detección.

Mc. Gary y Young (83) sugieren someter la leche a una calcinación habiéndola secado previamente con una lámpara de rayos infrarrojos. Las cenizas se disuelven en ácido clorhídrico 0.1N, se aforan con agua destilada y se determina el contenido de hierro por espectroscopía de absorción atómica.

En el apéndice II, sección D, se describen las técni-

cas recomendadas por la International Dairy Federation (59) para la determinación de hierro en leche y sus derivados.

### III.11. LEGUMINOSAS:

Varios investigadores como Lee y Clydesdale (74) señalan que, a pesar de que la A.O.A.C. recomienda el uso de la o-fenantrolina en la determinación de hierro en alimentos, este reactivo no produce resultados confiables para medir al hierro (II) cuando hay una elevada cantidad de hierro (III) al aumentar la absorbancia del complejo colorido en un 15%, por lo que recomiendan la determinación colorimétrica con batofenantrolina o la espectroscopía de absorción atómica para analizar alimentos con altas cantidades de hierro (III) como es el caso de ciertas leguminosas, entre las que se puede mencionar el frijol verde. El método desarrollado por Lee y Clydesdale permite la determinación simultánea de las diferentes formas del hierro (reducido, soluble, acomplexado, etc.) utilizando extracciones químicas y físicas para separar y cuantificar dichas formas.

Jambunathan y Singh (64) cuantifican el hierro presente en diferentes variedades de garbanzo por absorción atómica, digiriendo previamente la muestra con una mezcla oxidante de ácido nítrico - ácido sulfúrico - ácido perclórico.

### III.12. PESCADOS Y MARISCOS:

El pescado, junto con otros productos del mar, tiene un gran potencial en la alimentación por su elevado contenido de minerales, superando en algunos casos a la carne (80).

Diversos autores recomiendan la digestión de la muestra. Williams (124) hace hincapié en la necesidad de eliminar la grasa de éste para luego determinar el hierro por espectroscopía de absorción atómica. Uchida y sus colaboradores (118) emplean la técnica de absorción o de emisión atómica con nebulización discreta.

En 1983, Martínez Para y colaboradores publican una revisión bibliográfica de métodos analíticos para el análisis de hierro en productos del mar, en la cual indican que el tratamiento a aplicar a muestras de pescado antes de la determinación de hierro por espectroscopía de absorción atómica puede ser una digestión con ácido clorhídrico - ácido sulfúrico - ácido perclórico o con ácido sulfúrico - ácido nítrico, siendo la primera mezcla oxidante la más favorecida por los investigadores.

A diferencia de los autores antes mencionados, Mc. Gary y Young (83) se inclinan por calcinar la muestra antes de la cuantificación.

En el apéndice II, sección E, se detallan algunas técnicas de análisis para este tipo de productos.

### III.13. VINOS:

Está comunmente aceptado que la calidad del vino depende en gran parte de los diversos microconstituyentes presentes en él. Del conocimiento de éstos depende el controlar el proceso tecnológico del vino.

La determinación de hierro en vino ha gozado de un innegable interés desde tiempos muy lejanos, quizá sea debido a la importancia que su conocimiento tiene tanto desde el punto de vista tecnológico (principalmente en relación a su conservación) como desde el punto de vista analítico (45).

El hierro presente en el vino procede de: la propia uva (de los agregados de multienzimas de sistemas de citocromos presentes en las mitocondrias) en cantidad de 1 a 5 mg/l; de la tierra salpicada a la uva en el momento de la vendimia o bien, de los aparatos mecánicos de la vinificación (7).

El hierro se encuentra usualmente en el vino en un rango de 5 a 20 mg/l. Una concentración de 7 a 10 mg/l puede producir en el vino turbidez o cambio de color. Concentraciones más elevadas causan las llamadas "quiebras del vino" que consisten en la precipitación de compuestos de hierro, alterando así las características fisicoquímicas del producto. La quiebra blanca, procedente de la precipitación de fosfato férrico coloidal y la quiebra azul, pro-

cedente de la precipitación de tanato férrico, pueden presentarse en concentraciones de 13 a 15 mg/l en el vino blanco y de 20 a 23 mg/l en el tinto (7).

Arroyo (7) recomienda la determinación directa del hierro sobre el vino por espectroscopía de absorción atómica, diluyendo la muestra previamente 1:1 con agua. Para obtener las curvas de calibración efectúa disoluciones de 0 a 8 mg/l de hierro en un patrón vino diluido también con agua. La composición del patrón vino es la siguiente:

---

TABLA IV

---

Componente	Cantidad
Etanol	125 ml
Acido Cítrico	0.5 g
Glucosa	1.75 g
Glicerina	7.5 g
Acido Tartárico	1.6 g
Acido Fosfórico (1:10)	1.5 ml
Agua c.b.p.	1000 ml

---

La determinación directa de hierro en vinos implica grandes ahorros de tiempo, sin embargo, muchos otros au-

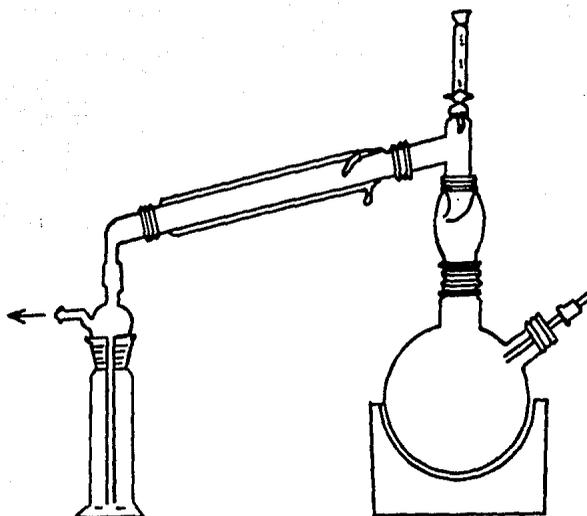
tores mantienen el criterio de que es necesario el tratamiento previo de la muestra, ya sea el llevarla a cenizas o bien, digerirla con ácidos (45).

Mc. Gary y Young (83) recomiendan pesar 10 g de muestra en un crisol de platino, secar la muestra a  $105^{\circ}\text{C}$ , carbonizar con lámpara de infrarrojo y calcinar en la mufla a  $525^{\circ}\text{C}$ . Las cenizas obtenidas se disuelven en ácido clorhídrico, se filtra, lava, afora y efectúa la lectura es un espectrofotómetro de absorción atómica.

González Pérez y Esquivel (47) sugieren usar 100 ml de muestra, secar a  $90^{\circ}$ - $95^{\circ}\text{C}$  y calcinar en mufla por 3 horas ( $500^{\circ}$ - $550^{\circ}\text{C}$ ). Las cenizas se disuelven, filtran y aforan con ácido nítrico al 20% para leerse en el espectrofotómetro de absorción atómica.

Gallego y sus colaboradores (45) no se inclinan por este procedimiento, indicando los problemas que presentan ciertos mostos y licores por su alto contenido de azúcar. Ellos aconsejan la utilización de diversos agentes oxidantes en distintas proporciones, siendo las mezclas constituidas por ácido sulfúrico - peróxido de hidrógeno 10 volúmenes (3:2) o ácido sulfúrico - ácido nítrico (3:1) las más adecuadas. El inconveniente común a estas dos mezclas oxidantes es la duración de la digestión, por lo que estos mismos investigadores adaptan el método de Bonastre, el cual incluye un ataque sulfonítrico y una destilación em-

pleando el siguiente dispositivo:



Primeramente se depositan 50 ml de vino en el matraz y se digiere con ácido sulfúrico. Una vez que adquiere consistencia siruposa se deja enfriar y se conecta el resto del equipo. Se añaden 10 ml de ácido nítrico y se continúa calentando adicionando de vez en vez gotas de este ácido hasta decolorar totalmente el digerido. Cuando el matraz alcanza la temperatura ambiente, se diluye con 50 ml de agua desionizada y se calienta para recoger y disolver las

posibles sales a la vez que se destruye el sulfato de nitrosilo. Luego se afora a 25 ml con agua desionizada, consiguiéndose concentrar al doble la muestra y facilitar la determinación del hierro por espectroscopía de absorción atómica. La digestión de la muestra por este método no es superior a 1 hora.

Williams (124) recomienda pesar 10 g de la muestra, calentarla a 70°C en un recipiente hermético por 4 horas, enfriar a 20°C, adicionar 10 ml de ácido nítrico, cerrar el recipiente y poner a baño maría 24 horas a 20°C, incrementar la temperatura a 70 ± 2°C por 4 horas, calentar el recipiente destapado 2 a 3 horas más, para eliminar los gases disueltos, enfriar, aforar a 25 ml y centrifugar la muestra a 3000-4000 rpm. En la porción clara se determina el hierro por espectroscopía de absorción o de emisión atómica. En lugar de añadir ácido nítrico, Williams indica que éste puede substituirse con una mezcla de ácido clorhídrico - peróxido de hidrógeno 30 volúmenes (50:1) con lo que el tratamiento de la muestra se disminuye mucho tiempo porque la digestión sólo requerirá 30 minutos aproximadamente. Una vez digerida la muestra, se diluye a 25 ml y se centrifuga de igual manera que con el ácido anterior para ser inyectada al aparato de absorción o al de emisión atómica.

#### IV. DISCUSION

La determinación de hierro en alimentos y bebidas es importante desde el punto de vista nutricional y tecnológico, ya que la deficiencia de hierro es un problema común en la actualidad, principalmente en países subdesarrollados donde la dieta es escasa en proteína animal, por lo que es primordial conocer el contenido de hierro absorbible de los alimentos además de enriquecer o no dichos productos para su mejor aprovechamiento. Por otra lado, el hierro excesivo en los alimentos y bebidas puede provocar problemas con la vida de anaquel cuando éste proviene de la maquinaria, el empaque, etc., por lo que su cuantificación es un índice de contaminación muy valioso.

En base a la información recopilada en los capítulos anteriores, existen varios aspectos a discutir. Uno de ellos, que parece trivial para la cuantificación de hierro en alimentos y bebidas y, que por el contrario, es a menudo fuente de error o de interferencias en la determinación es la limpieza exhaustiva del material, la cual elimina la posible contaminación con hierro u otros compuestos diferentes presentes en dicho material. De no hacerlo, los resultados obtenidos serían irreales.

Se ha mencionado insistentemente la importancia que tiene el preparar adecuadamente una muestra para el análisis cuantitativo de hierro. La mayoría de los autores se inclinan por la digestión húmeda a pesar de los múltiples

riesgos que ésta encierra, pues como se mencionó oportunamente, la manipulación de los ácidos en caliente involucra peligro de explosiones, quemaduras, etc. (6, 11, 57, 124), aún así, este tipo de preparación se prefiere por su rapidez, eficacia y baja probabilidad de contaminación y pérdida del metal en cuestión. El uso del ácido perclórico no es muy favorecido por su tendencia a detonar durante la digestión (6). Ácidos como el clorhídrico, que presentan menores problemas de manipulación se prefieren usualmente en combinación con ácido nítrico o peróxido de hidrógeno (110, 124). Entre las mezclas oxidantes más favorecidas se encuentran las de ácido sulfúrico - ácido nítrico ya que, en conjunto, digieren eficientemente la muestra y, trabajados con cuidado no presentan problemas de detonación (9, 39, 45, 95).

Muchos investigadores señalan que la calcinación no es recomendable cuando se desea analizar el contenido de hierro en una muestra. Se ha demostrado que existe una alta probabilidad de pérdidas por diversos factores como:

- 1) formación de compuestos volátiles de hierro como es el caso del cloruro férrico (volátil a  $450^{\circ}\text{C}$ ) (cfr. 97);
- 2) adherencia del hierro a las paredes del crisol principalmente si éste es de porcelana (95, cfr. 97) dificultándose su remoción durante el lavado;
- 3) interacción entre el hierro y el material del crisol, pudiendo formar compues-

tos insolubles (18, cfr. 97); y 4) problemas de solubilización de cenizas (18, cfr. 97). Por último, existe una alta probabilidad de contaminación por la manipulación. Algunos autores continúan empleando la calcinación, tratando de eliminar algunos de los problemas antes mencionados como es el evitar la volatilización del cloruro férrico mediante la adición de hidróxido de sodio o carbonato de calcio (54) o eliminar el problema de adherencias usando crisoles de platino (95, cfr. 97) o efectuar una disolución más eficiente de las cenizas usando un baño maría mientras el ácido que se agrega al crisol disuelve éstas. A pesar de las mejoras en esta técnica de preparación, poco a poco ha ido perdiendo adeptos ya que no se obtienen resultados confiables ni repetitivos.

Con respecto a los métodos a utilizar, existen una gran variedad que difieren entre sí ya sea en sus fundamentos, reactivos empleados, hasta los límites de detección y sensibilidad. El analista debe considerar una serie de puntos para seleccionar el método más adecuado como son: la sensibilidad, la precisión, la exactitud, el costo (en equipo, reactivos y/o personal) y el objeto del análisis a efectuar, ya sea rutinario, de investigación, etc.

Las técnicas de cuantificación de hierro, con el transcurso del tiempo han ido mejorando y desplazando a las anteriores. La determinación gravimétrica fué uno de los pri

meros métodos utilizados, mas, como se menciona en el capítulo II correspondiente a los métodos de análisis, hay que seguir una serie de pasos a menudo tediosos y tener muchas precauciones, lo que incrementa el tiempo del análisis. Por otra parte, como el método detecta sólo cantidades significativas del metal (más de 50 mg de hierro), no es recomendable aplicarlo en la determinación de él en alimentos, sino que se le emplea para muestras que lo contienen en cantidades importantes como los suelos y las aleaciones (41).

En 1903 surgió el primer método volumétrico para la cuantificación de hierro en alimentos empleando tricloruro titanoso (cfr. 125). La técnica presenta muchas deficiencias, sobretodo en lo referente al tiempo que requiere el análisis y al aumento de las posibilidades de contaminación pues, las interferencias de cobre y fosfatos deben ser removidas. Posteriormente aparecen las determinaciones volumétricas por oxido-reducción y complejometría. Dentro de las primeras, las titulaciones dicrométrica, permanganimétrica y ceriométrica tienen más éxito. A pesar de que el cerio (IV) es más eficiente y sensible que el dicromato, se prefiere este último por su menor costo y por dar tan buenos resultados como el cerio en los análisis de rutina. La titulación con permanganato no es muy favorecida pues requiere tomar una serie de precauciones que la hacen tediosa y de más difícil ejecución (implica el uso de la solución protectora de Zim-

mermann-Reinhardt, una titulación rápida, en frío, etc) (41, 42, 70, 123).

En cuanto al análisis de hierro por complejometría, los analistas se inclinan más a usar el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) en lugar de otros agentes quelantes como el ácido etilentriaminopentaacético (ETPA) o el ácido etilendiaminotetrametilfosfórico (AEDTMF) (16) ya que estos agentes se encuentran aún a nivel de investigación y no hay una seguridad total en su eficiencia. Inicialmente el punto final de las titulaciones se determinaba con la ayuda de indicadores visuales, ahora puede usarse la potenciometría, ya que se aplica a valoraciones de soluciones coloreadas u opacas, es menos subjetiva, más precisa y se adapta fácilmente a instrumentos de titulación automática (97).

La sensibilidad de los métodos volumétricos no es muy alta, por ejemplo, el método del permanganato es adecuado para determinar de 1 a 10 mg de hierro, cosa que es poco común en los alimentos (87), por ello, estas técnicas fueron superadas fácilmente con el surgimiento de los colorímetros y espectrofotómetros, los cuales permiten medir la absorbancia de una solución que contiene hierro a una determinada longitud de onda y luego calcular la concentración de éste con ayuda de una curva patrón, eliminando así en gran porcentaje el error humano.

En la década de los 20's aparecieron varias técnicas

colorimétricas. Lyons (1927) desarrolla el método del ácido mercaptoacético, el cual forma un complejo color rojo con el hierro (II) en condiciones alcalinas. Surgen los métodos del  $\alpha, \alpha'$ -dipiridilo y de la o-fenantrolina, provocándose entre los tres un poco de polémica pues la técnica de Lyons ofrece ciertas ventajas sobre las otras como el no requerir la adición de un agente reductor y el no sufrir interferencias por la presencia de varios metales pesados. Sin embargo, se prefiere el uso de la o-fenantrolina seguida por el  $\alpha, \alpha'$ -dipiridilo al rendir resultados más precisos y también debido a que el color producido es más intenso y estable (111). Este orden de importancia se debe a que, a pesar de que la o-fenantrolina y el  $\alpha, \alpha'$ -dipiridilo producen resultados similares con buena precisión y exactitud, este último emplea mayores cantidades de reactivo, lo cual encarece la determinación.

El método del tiocianato, aún siendo de las primeras técnicas colorimétricas que aparecieron, sigue siendo empleado para el análisis de rutina al concordar sus resultados con los procedimientos de la o-fenantrolina y del  $\alpha, \alpha'$ -dipiridilo (46, 111).

A partir de la mitad de este siglo han aparecido muchos reactivos cromogénicos derivados de los anteriores, principalmente de la o-fenantrolina y del  $\alpha, \alpha'$ -dipiridilo, mas su aplicación se enfoca muy poco al área de alimentos y, la

gran mayoría sólo se han empleado para la determinación de hierro en agua (119, 121). Han surgido también métodos electroanalíticos de gran utilidad para cuantificar al hierro como la polarografía, la cual ha sido empleada en el análisis de alimentos enlatados (25) y la cromatografía de intercambio iónico, que se utiliza para análisis de muestras líquidas como bebidas enlatadas (94, 126). Todas estas técnicas han recibido poca atención por ser campos poco estudiados, así pues, se prefieren métodos menos complicados y más manejados.

Los métodos más sofisticados que han surgido con los avances de la ciencia son los de espectroscopía atómica, con sus múltiples técnicas como la absorción, la emisión, la fluorescencia, etc. Todas ellas ofrecen buenos resultados, siendo las más utilizadas la espectroscopía de absorción con flama y la de emisión con plasma y arco eléctrico, no sólo para el análisis de hierro sino también para cuantificar otros elementos traza, lo que facilita y ahorra trabajo al analista, disminuyendo los costos. Sin embargo, estos instrumentos sólo se fabrican en países con tecnología altamente desarrollada, por lo que países como México, con una situación económica cada vez más difícil, se ven imposibilitados de importarlas y, por otra parte, no cuenta con personal capacitado para su mantenimiento y reparación. Es por ello que otros métodos, sobretodo los colorimétricos, son

aún utilizados al dar buenos resultados y, además, la mayoría de éstos se basan en la formación de compuestos coloridos cuya longitud de onda varía entre 450 y 650 nm por lo que no requieren espectrofotómetros sino que basta con los colorímetros para obtener resultados confiables.

Un aspecto clave en la elección de la técnica a seguir en la preparación y determinación del contenido de hierro en diversas muestras es el tipo de muestra, ya que el tratamiento varía dependiendo de su estado físico, de su contenido de grasa y de ciertos compuestos o elementos que pueden interferir con el análisis.

En el capítulo III correspondiente a las recomendaciones de métodos para grupos de alimentos, puede observarse que, aquéllos con un alto contenido de grasa deben ser tratados previamente para eliminar ésta antes de continuar con el análisis (59, 124).

El método del tiocianato, por ejemplo, no puede aplicarse al análisis de hierro en aquellos alimentos ricos en fósforo, por lo que se recomienda emplear otra técnica o, en todo caso, removerlo (114, cfr. 125). Del mismo modo, el aluminio junto con los fosfatos en grandes cantidades interfieren en la determinación colorimétrica por el método de la o-fenantrolina, ya que el aluminio coprecipita con el hierro en condiciones débilmente ácidas aconsejándose eliminarlo previamente a la cuantificación (65).

En el caso de manejar una muestra en estado líquido, los diferentes investigadores recomiendan secar la muestra como parte de su preparación, para lo cual existen diversos métodos como la evaporación en baño maría o en estufa a  $90^{\circ}$ - $95^{\circ}$ C (47), seguida de una calcinación o una digestión ácida de la muestra desecada.

En casos especiales se menciona la posibilidad de determinar directamente el hierro en la muestra sin necesidad de previo manejo de la misma (7). Tal innovación no ha sido aceptada del todo pues algunos investigadores han demostrado la interferencia de ciertos compuestos presentes en la muestra como es el caso de los vinos y la cerveza, donde el ácido tartárico, el láctico y el etanol alteran la medición (45). Con los aceites, los resultados obtenidos son aceptables haciéndose notar que se extrae el hierro con un solvente y, en sentido estricto, la determinación no se efectúa directamente en la muestra (55, 72).

Por último, es importante hacer notar que no basta con el análisis químico del hierro en un alimento para poder evaluarlo nutricionalmente con respecto a este mineral, sino que se requiere efectuar una determinación biológica, para lo cual existen métodos de laboratorio donde se trabaja con ciertas especies animales (ratas y pollos) y cuyos resultados son extrapolados al hombre, no sin considerar que la absorción de hierro en los individuos es variable,

debiéndose tal fenómeno principalmente a los distintos componentes que constituyen la dieta.

## V. CONCLUSIONES

A través de la información recolectada en esta revisión puede verse claramente que la gran mayoría de los analistas se inclina por:

- 1) Mantener el material libre de posibles contaminaciones mediante su remojo en ácidos, siendo el ácido nítrico en concentraciones 6N, 1N y 6% (v/v) los más empleados.
- 2) Eliminar la materia orgánica por medio de una digestión húmeda prefiriéndose la mezcla en concentraciones variables de ácido sulfúrico - ácido nítrico, siendo este último ácido el que se agrega en mayor cantidad para mantener las condiciones oxidantes del medio.
- 3) Seleccionar el método analítico en base al tipo de muestra, equipo y material disponible.
- 4) Favorecer el método colorimétrico de la o-fenantrolina por su elevada sensibilidad.
- 5) Usar con mayor frecuencia las técnicas de absorción atómica, lo que ha provocado el desplazamiento de las colorimétricas por ser más selectivas, además de que pueden realizarse determinaciones simultáneas de otros metales aprovechando la misma muestra.
- 6) Continuar realizando estudios tendientes a optimizar los distintos métodos de análisis de hierro en alimentos y bebidas.

Es importante, también, hacer notar que el método que se emplea muchas veces para el análisis de hierro en la rutina no siempre es el más adecuado, por lo que el analista debe considerar aspectos tales como la precisión, la exactitud, el costo de la determinación, etc., para seleccionar el óptimo.

## VI. BIBLIOGRAFIA

1. Abdullah, K.A. and Hassan, Y.I. (1981). Reagent for the spectrophotometric determination of iron (II) in alkaline solution. Analyst 106: 1348-1351.
2. Al-Daher, I.M. and Kratochvil, B. (1980). Potentiometric titrations of metal ions in acetonitrile with polyamine ligands. Talanta 27: 983-988.
3. American Association of Cereal Chemists. (1973). APPROVED METHODS OF AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS. Vol. I, pp. 40-40 (1,1), 40-41A (1,2), 40-42 (1,2). Ed. American Association of Cereal Chemists, Inc. Minnesota, U.S.A.
4. Amine, E.K. and Hegsted, D.M. (1974). Biological assessment of available Iron in Food Products. J. Agr. Food Chem. 22(3): 470-476.
5. Amine, E.K.; Neff, R. and Hegsted, D.M. (1972). Biological estimation of available Iron using Chicks or Rats. J. Agr. Food Chem. 20(2): 246-251.
6. Arafat, N.M. and Glooschenko, W.A. (1981). Method for the simultaneous determination of Arsenic, Aluminium, Iron, Zinc, Chromium and Copper in Plant Tissue without the use of Perchloric Acid. Analyst 106: 1174-1178.
7. Arroyo, M.C. (1982). Determinación del contenido en

caciones de los Vinos de Rioja. II. Contenido de Hierro, Cobre y Zinc. An. INIA/Ser. Agric./N.20: 193-198.

8. Arvía, A.J. y Bolzan, J.A. (1974). POLAROGRAFIA. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. Monografía # 13. Secretaría General de la O.E.A. Washington, D.C.
9. Association of Official Analytical Chemists. (1984). OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS. 14th. Edition. pp. 38, 39, 40, 43, 164, 180, 181, 200, 223, 250, 251, 259, 264, 267, 628, 629, 880, 881. Association of Official Analytical Chemists, Inc. Arlington, Virginia.
10. Ayres, G.H. (1970). ANALISIS QUIMICO CUANTITATIVO. 7a. Reimpresión. pp. 188-189, 387-389, 535-536. Ed. Harla, S.A. Madrid, España.
11. Badillo, F. (1977). ESTUDIO MONOGRAFICO DE LA DETERMINACION DE INORGANICOS EN ALGUNOS ALIMENTOS POR METODOS COLORIMETRICOS. Tesis. pp. 115-129. U.N.A.M. México.
12. Badui, S. (1981). QUIMICA DE LOS ALIMENTOS. 1a. Edición. Ed. Alhambra, S.A. México.
13. Bashir, W.A. (1981). Photometric determination of

- Iron (III). Microchem. J. 26: 477-480.
14. Bender, A.E. (1968). DIETETIC FOODS. pp. 171-175. Chemical Publishing Co. Inc. New York.
15. Bergerioux, C. and Haerdi, W. (1980). Coprecipitation of dissolved Trace Elements with combined Organic Precipitating Reagents for use in X-Ray Fluorescence Analysis. I. 1,10-phenanthroline and Tetraphenyl Boron. Analisis 8(5): 169-173.
16. Bermejo Barrera, A. y Bermejo Martínez, F. (1979). Determinación espectrofotométrica de Hierro (III) con Acido Etilendiaminotetrametilenfosfónico (AEDTMP). Acta Quím. Compostelana 3(4): 125-133.
17. Black, M.S. and Browner, R.F. (1981). Volatile metal-chelate sample introduction for Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry. Anal. Chem. 53(2): 249-253.
18. Blanusa, M. and Breski, D. (1981). Comparison of dry and wet ashing procedures for Cadmium and Iron determination in Biological Material by Atomic Absorption Spectrophotometry. Talanta 28: 681-684.
19. Bone, K.M. and Hibbert, W.D. (1979). Solvent extraction with Ammonium pyrrolidinedithiocarbamate and 2,

- 6-dimethyl- 4-heptanone for the determination of Trace Metals in Effluents and Natural Waters. Anal. Chim. Acta 107:219-229.
20. Bourges, R.H. (1983). EL HIERRO. Cuadernos de Nutrición 7, 3. México.
21. Bourne, G. and Kidder, G. BIOCHEMISTRY AND PHISIOLOGY OF NUTRITION. Vol. II. Academic Press, Inc. New York.
22. Brise, H. and Hallberg, L. (1962). Effect of Ascorbic Acid on Iron Absorption. Acta Med. 376: 51-58.
23. Brown, F. (1959). X-Ray Fluorescence Analysis. A Review. Analyst 84: 344-355.
24. Cacho Palomar, J. y Nerín de la Puerta, C. (1982). Determinación espectrofotométrica de Fe(III), Co(II) y Mn(II) con 1,2,4-triazolil-(3-azo-1)-2-naftol. Afijidad 39: 44-46.
25. Galvo, C.C.; Wurts, M.L. y López, M.Y. (1984). Disponibilidad de hierro en los alimentos. Tecnol. Alim. (Méx.) 19(1): 29-32.
26. Chang, L.; Satake, M.; Puri, B.K. and Bag, P. (1983). Spectrophotometric determination of Iron (II) after separation by collection of its ternary complex of 1,10-phenanthroline and tetraphenylborate on micro-

- crystalline Naphthalene. Bull. Chem. Soc. Jpn. 56: 2000-2003.
27. Chopra, J.G. (1974). Enrichment and Fortification of Foods in Latin America. AJPH 64(1).
28. Christian, G.D. and Feldman, F.J. (1970). ATOMIC ABSORPTION SPECTROSCOPY. Applications in Agriculture, Biology and Medicine. pp. 311-314. Wiley-Interscience. New York.
29. Cox, D.; Harrison, G.; Jandik, P. and Jones, W. (1985). Application of Ion Chromatography in the Food and Beverage Industry. Food Techn. 39(7): 41-44.
30. Crosby, N.T. (1977). Determination of Metals in Foods. A Review. Analyst 102(1213): 225-268.
31. David, D.J. (1960). The application of Atomic Absorption to Chemical Analysis. A Review. Analyst 85: 779-791.
32. DeBolt, D. (1980). Multielement Emission Spectroscopic Analysis of Plant Tissue using D.C. Argon Plasma Source. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 63(4): 802-805.
33. Deurenberg, P.; Müllers-Boumans, M. and Thomas, K. (1980). Over het ijzergehalte van appelstroop. Voeding - 41e Jaargang No. 10: 363-364.

34. Díaz Alonso, A.A. (1983). Vinos de Mesa. Determinación de los niveles de calidad y Metodología para la realización de ensayos comparativos. Ind. Alimentaria, Rev. de Tecnología e Higiene de los Alimentos, Año XX, No. 142: 59-68.
35. Disler, P.B.; Lynch, S.R.; Charlton, R.W.; Torrance, J.D.; Bothwell, T.H.; Walker, R.B. and Mayet, F. (1975). The effect of Tea on Iron absorption. Gut 16: 193-200.
36. Egan, H.; Kirk, R.S. and Sawyer, R. (1981) CHEMICAL ANALYSIS OF FOODS. 8th. Edition. Churchill Livingstone. New York.
37. Eipeson, W.E. and Paulus, K. (1974). Determination of Tin and Iron in Canned Foods. A comparative study using a Complexometric and a Polarographic Method. Lebensm.-Wiss. u. Technol. 7(1): 47-49.
38. Escobar, R.; Cano-Pavón, J.M.; Bellanato, J.; Gálvez, E. and Pino, F. (1982). Synthesis and Analytical properties of di(2-pyridyl)-N,N-di[(8-quinolyl)amino] methane. Talanta 29: 135-136.
39. Evans, W.H.; Dellar, D.; Lucas, B.E.; Jackson, F.J. and Read, J.I. (1980). Observations on the determination of Total Copper, Iron, Manganese and Zinc in

Foodstuffs by Flame Atomic-Absorption Spectrophotometry. Analyst 105(1251): 529-543.

40. Fischer, P. and Bender, A. (1978). VALOR NUTRITIVO DE LOS ALIMENTOS. pp. 45, 48. Ed. Limusa. México.
41. Fischer, R. y Peters, D. (1971). COMPENDIO DE ANALISIS QUIMICO CUANTITATIVO. 1a. Edición. pp. 135-138, 249-252, 287-294, 322-326, 386-393. Ed. Interamericana, S.A. México.
42. Flashka, H. (1976). QUIMICA ANALITICA CUANTITATIVA. Ed. C.E.C.S.A. México.
43. Fox, S.J. and Bender, A.E. (1977). The Iron content of Curry Powders and some of their constituent Spices. Food Techn. 12: 535-539.
44. Fritz, J.C.; Pla, G.W.; Harrison, B.N. and Clark, G.A. (1974). Collaborative study of the Rat Hemoglobin Repletion Test for Bioavailability of Iron. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 57(3): 513-517.
45. Gallego, R.; Bernal, J.L. y Del Nozal, M.J. (1981). Determinación de Hierro, Cobre, Manganeso, Cinc y Plomo en Vinos por Espectroscopía de Absorción Atómica. Anal. Bromatol. 33(2): 175-190.
46. Gomes Cassidy, H. (1957). TECHNIQUE OF ORGANIC CHE-

MISTRY. Vol. X. pp. 285-287. Interscience Publishers, Inc. New York.

47. González Pérez, A. y Esquivel, B. (1982). Evaluación del contenido metálico en Vinos Mexicanos por Espectrofotometría de Absorción Atómica. Tecnol. Alim. (Méx.) 17(5): 18-21.
48. Gowda, H.S. and Mohan, B.M. (1981). N-Substituted Phenothiazines as redox indicators in titrations with Cerium (IV) Sulphate. Indian J. of Chem. 20A: 903-905.
49. Gray, P.P. and Stone, I.M. (1938). Direct determination of Iron in Malt Beverages. Ind. Eng. Chem. 10.
50. Gruenwedel, D.W. and Patnaik, R.K. (1973). Model Studies regarding the "internal corrosion of Tin-Plated Foods Cans. IV. Polarographic investigation of the interaction of Tin(II)-ions with L-cysteine. Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm. 2: 97-101.
51. Guyton, A.C. (1974). FISILOGIA HUMANA. 4a. Edición. pp. 56. Ed. Interamericana, S.A. México.
52. Hall, A. and Godinho, M.C. (1980). Concentration of Trace Metals from Natural Waters by Freeze-drying prior to Flame Atomic Absorption Spectrometry. Anal.

Chim. Acta 113: 369-373.

53. Harrison, B.N.; Pla, G.W.; Clark, G.A. and Fritz, J.C. (1976). Selection of Iron sources for Cereal Enrichment. Cereal Chem. 53(1): 78-84.
54. Hoffman, C.; Schweitzer, T.R. and Dalby, C. (1940). Iron content of Bread and Bread Ingredients. Ind. Eng. Chem. 12(4): 454-455.
55. Hon, P.K.; Lau, O.W.; Luk, S.F. and Mok, C.S. (1980). Solvent Systems for the Direct Atomic Absorption Spectrometric determination of Iron in Vegetable Oils with Aqueous Inorganic Standards. Anal. Chim. Acta 113: 175-178.
56. Hoyle, W.C. and Benga, J. (1980). 2,4,6-tris[2',4'-(p-sulfophenyl)pyridyl]-s-triazine: A new Analytical Reagent for the Spectrophotometric determination of Iron. Talanta 27: 963-969.
57. Iida, Ch.; Uchida, T. and Kojima, I. (1980). Decomposition of Bovine Liver in Sealed Teflon Vessel for determination of Metals by Atomic Absorption Spectrometry. Anal. Chim. Acta 113: 365-368.
58. Instituto Nacional de la Nutrición. (1980). SEGUNDA ENCUESTA NACIONAL DE ALIMENTACION 1979. Segunda Parte. La Alimentación en el medio Rural de México. Pro-

yecto 2 del S.A.M. Perfil Nutricional de México.  
México.

59. International Dairy Federation (1981). Milk and Milk Products. Determination of the Iron Content (Photometric Reference Method). Provisional International IDF STANDARD 103:1981.
60. Isaac, R.A. (1980). Atomic Absorption Methods for Analysis of Soil Extracts and Plant Tissue Digests. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 63(4): 788-796.
61. Jackson, C.J.; Porter, D.G.; Dennis, A.L. and Stockwell, P.B. (1978). Automated Digestion and Extraction Apparatus for use in the determination of Trace Metals in Foodstuffs. Analyst 103: 317-331.
62. Jacobs, M.B. (1958). THE CHEMICAL ANALYSIS OF FOODS AND FOOD PRODUCTS. 3rd. Edition. pp. 772-774. Robert E. Krieger Publishing Co. Inc. U.S.A.
63. Jain, M.P. and Kumar, S. (1982). Estimation of Iron with Salicylaldehydehydrazone. Talanta 29: 52-53.
64. Jambunathan, R. and Singh, U. (1981). Studies on Desi and Kabuli Chickpea (Cicer arietinum L.) Cultivars. 3. Mineral and Trace Element Composition. J. Agr. Food Chem. 29(5): 1091-1093.

65. Jayman, T.C.Z.; Sivasubramaniam, S. and Wijedasa, M.A. (1975). Elimination of Interference from Aluminium in the determination of Total Iron in Soils and Plant Materials using 1,10-phenanthroline reagent. Analyst 100: 716-720.
66. Jiménez, A.M.; Herrador, M.A. y Asuero, A.G. (1984). Elementos Traza en Alimentos. I. Aspectos metodológicos de su determinación. Ind. Alimentaria. Rev. de Tecnología e Higiene de los Alimentos, Año 21, No. 152: 107-112.
67. Johnson, C.D.; Berry, M.F. and Weaver, C.M. (1985). Soybean Hulls as an Iron Source of Bread Enrichment. J. Food Sci. 50: 1275-1277.
68. Joslyn, M.A. (1970). METHODS IN FOOD ANALYSIS. Physical, Chemical and Instrumental Methods of Analysis. 2nd. Edition. pp. 129-130, 135-136. Academic Press. New York.
69. Lai, F.S.; Pomeranz, Y.; Martin, C.R.; Dikeman, E. and Miller, B.S. (1981). Mineral components of Grain Dust. Cereal Chem. 58(5): 417-421.
70. Laitinen, H.A. (1960). CHEMICAL ANALYSIS. AN ADVANCED TEXT AND REFERENCE. Mc. Graw-Hill Book Company, Inc. New York.

71. Lajunen, L.H. and Aitta, E. (1981). Spectrophotometric determination of Iron with 1-hydroxy-4-sulpho-2-naphtoic acid. Talanta 28: 603-606.
72. Lau, O. and Mok, Ch. (1982). Direct Spectrophotometric determination of Iron in Vegetable Oils. J. Sci. Food Agric. 33: 1030-1034.
73. Leavell, G. and Ellis, N.R. (1934). Determination of Iron. Adaptation of the Mercaptoacetic Acid colorimetric method to Milk and Blood. Ind. Eng. Chem. 6(1): 46-47.
74. Lee, K. and Clydesdale, F.M. (1979). Quantitative determination of the Elemental, Ferrous, Ferric, Soluble and Complexed Iron in Foods. J. Food Sci. 44(2): 549-554.
75. Limongelli, J.C.H.; Beconi de Bocchieri, M.T. y Barreiro, M. (1977). Estudios preliminares sobre el contenido de Hierro en Espinaca (Spinacia oleracea L.). Rev. del I.T.A. 2(1): 103-110.
76. Loewe, J. and Ranum, P. (1979). Note on a Semiautomated Colorimetric determination of Iron in Cereals. Cereal Chem. 56(6): 581-582.
77. Loría, A. y Villanueva, M. (1979). Contenido de

- Hierro en Frutas antes y después de su transformación Industrial. Rev. Invest. Clín. (Méx.) 31: 21-27.
78. Marczenko, Z. and Kalowska, H. (1981). Spectrophotometric determination of Iron (III) with Chrome Azurol S or Eriochrome Cyanine R and some Cationic Surfactants. Anal. Chim. Acta 123: 279-287.
79. Martínez Calatayud, J.; Bosch Reig, F. and García Alvarez-Coque, M.C. (1982). A compound of Iron (II), Phenylbiguanidine and Cyanide. Talanta 29: 139-141.
80. Martínez Para, M.C.; Masoud, T.A.; Aguilar, M.V. y Polo, M.I. (1983). Elementos Minerales en Conservas de Pescados y Moluscos. Alimentaria 142: 37-43.
81. Matz, S.A. (1960). BAKERY. TECHNOLOGY AND ENGINEERING. The Avi Publishing Co., Inc. Westport, Conn.
82. Maynard, L.A. and Loosli, J.K. (1975). NUTRICION ANIMAL. 3a. Edición. Unión Tipográfica Editorial Hispano-Americana. México.
83. Mc. Gary, E.D. and Young, B.E. (1976). Quantitative determination of Zinc, Iron, Calcium and Phosphorus in the Total Diet Market Basket by Atomic Absorption and Colorimetric Spectrophotometry. J. Agr. Food Chem. 24(3): 539-542.

84. Mc. Phail, A.P.; Bothwell, T.H.; Torrance, J.D.; Derman, D.P.; Bezwoda, W.R. and Charlton, R.W. (1981). Factors affecting the Absorption of Iron from Fe(III) EDTA. Br. J. Nutr. 45: 215.
85. Merodio, J.C. y Rapanelli de Trauman, H. (1981). Espectrometría de Absorción Atómica de Hierro, Cobalto y Níquel en sistemas No Acuosos. Anales Asoc. Quím. Argentina 69: 93-107.
86. Miller, J. (1976). Utilization of Iron from Enriched wheat bread by Normal and Anemic Rats. Cereal Chem 53(1): 33-41.
87. Monier-Williams, G.W. (1950). TRACE ELEMENTS IN FOOD. 2nd. Edition. John Wiley & Sons, Inc. New York.
88. Mortatti, J.; Krug, F.J.; Pessenda, L.C.R. and Zagatto, E.A.G. (1982). Determination of Iron in Natural Waters and Plant Material with 1,10-phenanthroline by Flow Injection Analysis. Analyst 107: 659-663.
89. Murali Mohan, K. and Brahmaji Rao, S. (1980). Determination of Submicrograms quantities of Iron (III) by a Catalytic Polarographic Method. Talanta 27: 905-906.

90. Nigo, S.; Yoshimura, K. and Tarutani, T. (1981). Ion-Exchanger Colorimetry. VII. Microdetermination of Iron (II) and Iron (III) in Natural Water. Talanta 28: 669-674.
91. Orozco, F. (1981). ANALISIS QUIMICO CUANTITATIVO. 12a. Edición. Ed. Porrúa, S.A. México.
92. Otomo, M.; Ano, S. and Kako, H. (1981). Solvent Extraction and Spectrophotometric determination of Iron (II) with 2,2'-dipyridyl-2-quinolyl-hidrazone. Microchem. J. 26: 228-235.
93. Owens, D.L. (1974). ION EXCHANGE WITH THE AMBERLITE RESINS. pp. 11. Rohm and Hass. Philadelphia. (Folleto).
94. Owens, D.L. (1980). CHEMICAL PROCESSING BY ION EXCHANGE. pp. 2. Rohm and Hass. Philadelphia. (Folleto).
95. Pearson, D. (1976). THE CHEMICAL ANALYSIS OF FOODS. 7th. Edition. Churchill Livingstone. New York.
96. Pérez Bendito, D. y Valcárcel, M. (1980). Determinación fotométrica de Trazas de Cobalto y Hierro con las Tiosemicarbazonas del Piridoxal y Salicilaldehído. Afinidad 37: 123-126.

97. Pomeranz, Y. and Meloan, C.E. (1978). FOOD ANALYSIS. THEORY AND PRACTICE. pp. 551-573. The Avi Publishing Company, Inc. Westport, Conn.
98. Preer, J.R.; Collins, M.S. and Gitahi, G. (1974). Mineral Analysis of Edible Wild Plants and Market Vegetables. J. of Chem. Education.
99. Recheigl, M. (1978). CULTURA MEDIA FOR MICROORGANISMS AND PLANTS. Vol. 3. (CRC Handbook. Series in Nutrition and Food; Section G). CRC Press. U.S.A.
100. Rius, J.; Mongay, C. y Cerdá, V. (1981). Aplicaciones Analíticas de la agrupación Imidoxima. 5. Síntesis, Características, Equilibrio Acido-Base y Aplicaciones Analíticas de la 2,6-dihidroxi-3-metileno piperidina (metilenglutarimidodioxima). Afinidad 38: 235-240.
101. Rius, J.; Mongay, C. y Cerdá, V. (1981). Aplicaciones Analíticas de la agrupación Imidoxima. 6. Estudio del complejo Fe(III)-metilenglutarimidodioxima y su Aplicación a una Volumetría Fotométrica. Afinidad 38: 357-361.
102. Robinson, J.W. (1966). ATOMIC ABSORPTION SPECTROSCOPY. pp. 129-131. Marcel Decker, Inc. New York.

103. Román Ceba, M.; Arrebola Ramírez, A. and Berzas Nevado, J.J. (1981). Spectrophotometric Determination of Trace Amounts of Iron (III) by Extraction of the mixed-ligand Iron-Fluoride-Purpurin Complex. Talanta: 142-144.
104. Román Ceba, M.; Muñoz Leyva, J.A. y Vinagre Jara, F. (1982). El Acido 5-cloro-indol-2-carboxílico como reactivo analítico. Estudio de su reacción con Fe (III). Afinidad 39: 421-424.
105. Salinas, F.; Genestar, C. and Grases, F. (1981). Kinetic Fluorimetric determination of Iron and Thallium based on Oxidation Transformation of 1,4-diamino-2,3-dihydroanthraquinone. Anal. Chim. Acta 130: 337-344.
106. Satake, M.; Matsumura, Y. and Mehra, M.C. (1981). Spectrophotometric determination of Iron (III) after separation by Adsorption of its Oxinate on Microcrystalline Naphthalene. Analisis 9(8): 389-392.
107. Satake, M.; Mehra, M. and Fujinaga, T. (1982). Spectrophotometric determination of Iron (III) after separation by Adsorption of its 5-chloro-7-iodo-8-quinolinol Complex on Microcrystalline Naphthalene. Bull. Chem. Soc. Jpn. 55: 2079-2082.

108. Satake, M. and Nagahiro, T. (1984). Solid-Liquid separation after Liquid-Liquid Extraction: Spectrophotometric determination of Iron (II) by Extraction of its Ternary Complex with 2,2'-dipyridyl and Tetraphenylborate into Molten Naphthalene. Analyst 109: 31-34.
109. Satake, M. and Yoshida, N. (1980). Spectrophotometric determination of Iron (III) after separation by Adsorption of its Pyrrolidinedithiocarbamate on Naphthalene. Fukui Kagaku 28(2): 207-216.
110. Saura Calixto, F.; Bauza, M.; Martínez de Toda, F. and Argamentería, A. (1981). Amino Acids, Sugars, and Inorganic Elements in the Sweet Almond (Prunus amygdalus). J. Agric. Food Chem. 29: 509-511.
111. Saywell, L.G. and Cunningham, B.B. (1937). Determination of Iron. Colorimetric Method with o-phenanthroline. Ind. Eng. Chem. 9.
112. Schilt, A. and DiTusa, M. (1982). Spectrophotometric determination of Iron and Reducing Agents with PPTS, a new Water-Soluble Ferriin-type Chromogen of superior sensitivity. Talanta 29: 129-132.
113. Stewart, G.F. and Amerine, M.A. (1973). FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY. 2nd. Edition. Academic Press. New

York.

114. Stugart, R. (1931). Determination of Iron in Milk and other Biological Materials. Ind. Eng. Chem. 3 (4): 390-393.
115. Sugimae, A. (1980). Determination of Trace Elements in Sea Water by Inductively-Coupled Plasma Emission Spectrometry. Anal. Chim. Acta 121: 331-336.
116. The United States Department of Agriculture. (1959). FOOD. THE YEARBOOK OF AGRICULTURE. Washington, D.C.
117. Thompson, K.C. and Wagstaff, K. (1980). Some Observations on the determination of Iron by Atomic-Absorption Spectrophotometry using Air-Acetylene Flames. Analyst 105(1252): 641-650.
118. Uchida, T.; Kojima, I. and Iida, Ch. (1980). Determination of Metals in Small Samples by Atomic Absorption and Emission Spectrometry with Discrete Nebulization. Anal. Chim. Acta 116: 205-210.
119. Ueda, K.; Kiyota, Y. and Yamamoto, Y. (1981). Selective Extraction Spectrophotometric determination of Iron by utilizing the peculiar Absorption of Iron(II)-2-(2-thiazolylazo)-5-dimethylaminophenol Complex. Bull. Chem. Soc. Jpn. 54: 3763-3767.

120. Vogel. (1978). VOGEL'S TEXTBOOK OF QUANTITATIVE INORGANIC ANALYSIS. 4th. Edition. pp. 741-744. Longman Group Limited. New York.
121. Walton, H.F. (1970). PRINCIPIOS Y METODOS DE ANALISIS QUIMICO. 2a. Edición. Ed. Reverté Mexicana, S.A. México.
122. Weaver, C.M.; Chen, P.H. and Rynearson, S.A. (1981). Effect of Milling on Trace Element and Protein content of Oats and Barley. Cereal Chem. 58(2): 120-124.
123. Willard, H.; Furman, N. and Bacon, E. (1957). A SHORT COURSE IN CUANTITATIVE ANALYSIS. 2nd. Edition. D. Van Nostrand Company, Inc. Canadá.
124. Williams, E.V. (1978). New Techniques for the Digestion of Biological Materials. Application to the determination of Tin, Iron and Lead in Canned Foods. J. Food Techn. 13(5): 367-384.
125. Winton, A.L. and Winton, K.B. (1947). THE ANALYSIS OF FOODS. 2nd. Edition. John Wiley & Sons, Inc. U.S.A.
126. Wohl, M.G. and Goodhart, R.S. (1968). MODERN NUTRITION IN HEALTH AND DISEASE. 4th. Edition. Ed. Lea & Febiger. Philadelphia.

127. Wytttenbach, A.; Bajo, S. and Farrankothén, K. (1980). Neutron Activation Analysis of Freshwater Samples. Radiochem. Radioanal. Letters 42(4-5): 307-318.
128. Wytttenbach, A.; Rauter, R.; Stauffer, B. and Schotter, U. (1977). Determination of Impurities in Ice-Cores from the Jungfrau-Joch by Neutron Activation Analysis. J. of Radioanal. Chem. 38: 405-413.
129. Xi-Wen, H. and Poe, D.P. (1981). Spectrophotometric study on the reactions of Iron (II) and Iron (III) with Bromopyrogallol Red and Hexadecyltrimethylammonium Bromide. Talanta 28: 419;424.
130. Zagatto, E.A.G.; Jacintho, A.O.; Pessenda, L.C.R.; Krug, F.J.; Reis, B.F. and Bergamin, H. (1981). Merging zones in Flow Injection Analysis. Part 5. Simultaneous determination of Aluminium and Iron in Plant Digest by a Zone-Sampling approach. Anal. Chim. Acta 125: 37-43.

**BIBLIOGRAFIA RECOMENDADA PARA METODOS ELECTROANALITICOS:**

- A. Charlot, G. (1977). CURSO DE QUIMICA ANALITICA GENERAL. Tomos II y IV. 1a. Edición. Ed. Toray-Masson, S.A. Barcelona, España.

B. Kolthoff, I.M. and Furman, N.H. (1947). POTENTIOMETRIC TITRATIONS. A THEORETICAL AND PRACTICAL TREATISE. 2nd. Edition. p. 51-54, 290. John Wiley & Sons, Inc. New York.

C. Pecksook, R.I.; Shields, L.D.; Cairns, T. and Mc. William, I.G. (1976). MODERN METHODS OF CHEMICAL ANALYSIS. p. 400-412. John Wiley & Sons, Inc. Toronto, Canada.

D. Skoog, D.A. y West, D.M. (1975). ANALISIS INSTRUMENTAL. 1a. Edición. Ed. Interamericana, S.A. México.



APENDICE I. SECCION A.

Técnica Oficial para determinar hemoglobina en sangre (9).

Pipetee 5 ml de la solución de Drabbkin en tubos de colorímetro (la solución de Drabbkin se prepara disolviendo 1 g de  $\text{NaHCO}_3$ , 52 mg de KCN, 198 mg de  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  en agua y diluyendo a 1 l). Dentro de cada tubo se agregan 0.02 ml de sangre de la rata extraída por la vena de su cola. Enjuague varias veces la pipeta con la misma solución del tubo. Mezcle el contenido por inversión y prepare un blanco. Permita reposar los tubos por 10 minutos y lea la absorbancia a 540 nm. Use la siguiente tabla para obtener la concentración de la muestra en gramos de hemoglobina/100 ml de sangre (Tabla V).

TABLA V

Table 43:08 Conversion of % T to g Hemoglobin/100 ml Blood\*

	7	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0											
10											
20	22.3	21.6	21.0	20.3	19.7	19.2	18.6	18.0	17.6	17.1	
30	16.6	16.1	15.7	15.3	14.9	14.5	14.1	13.7	13.4	13.0	
40	12.6	12.3	12.0	11.6	11.4	11.0	10.7	10.4	10.1	9.8	
50	9.5	9.3	9.0	8.7	8.5	8.2	8.0	7.7	7.5	7.2	
60	7.0	6.8	6.5	6.4	6.1	5.9	5.7	5.5	5.3	5.1	
70	4.9	4.7	4.5	4.3	4.1	3.9	3.8	3.6	3.4	3.2	
80	3.0	2.9	2.7	2.5	2.4	2.2	2.0	1.9	1.7	1.6	
90	1.4	1.3	1.1	1.0	0.8	0.7	0.5				

\* Example: Transmission reading on scale = 47. Concentration found opposite 40, under 7 = 10.4.

## APENDICE II. SECCION A.

1. Técnica recomendada por Mc. Gary y Young (83) para la determinación de hierro en carne y derivados.

Se toman 5 g de muestra y se seca a la estufa a 105°C por 2 horas, se carboniza con lámpara de infrarrojo y calcina en la mufla elevando poco a poco la temperatura hasta 525°C. Las cenizas así obtenidas son disueltas en ácido clorhídrico diluido (1:1), diluidas con agua destilada y evaporadas en baño maría hasta sequedad, luego son redisueltas con ácido clorhídrico 0.1N, filtradas y aforadas con agua destilada a 100 ml. Esta solución se inyecta al espectrofotómetro de absorción atómica calculando el contenido de hierro a partir de la absorbancia por interpolación con una curva estándar.

2. Técnica recomendada por Williams (124) para la determinación de hierro en carne y derivados.

Se colocan 5 g de muestra en un recipiente de teflón con cierre hermético, se añaden 10 ml de ácido nítrico concentrado y digiere a baño maría 24 horas a 20°C, luego se aumenta la temperatura a 70 ± 2°C por 4 horas. Se libera la presión residual y, ya abierto el recipiente se continúa calentando 2 o 3 horas más para

eliminar los vapores tóxicos formados durante la digestión. Se diluye y afora a 25 ml con agua caliente (70 - 80°C) y se permite la separación de la grasa. Una alícuota de 7 ml de la fase acuosa vuelve a ser digerida de igual manera que cuando se inició el procedimiento para determinar el hierro por espectroscopía de absorción o de emisión atómica.

## APENDICE II. SECCION B.

1. Técnica recomendada por Mc. Gary y Young (83) para la determinación de hierro en frutas y verduras.

Se toman 5 g de muestra y se seca a la estufa a 105°C por 2 horas, se carboniza con lámpara de infrarrojo y calcina en la mufla elevando poco a poco la temperatura hasta 525°C. Las cenizas así obtenidas son disueltas en ácido clorhídrico diluído (1:1), diluídas con agua destilada y evaporadas en baño maría hasta sequedad, luego son redisueltas con ácido clorhídrico 0.1N, filtradas y aforadas con agua destilada a 100 ml. Esta solución se inyecta al espectrofotómetro de absorción atómica calculando el contenido de hierro a partir de la absorbancia por interpolación con una curva estándar.

2. Técnica recomendada por Williams (124) para la determinación de hierro en frutas y verduras.

Se colocan 5 g de muestra en un recipiente de teflón con cierre hermético, se adicionan 10 ml de ácido nítrico y se cierra para digerir 24 horas a 20°C, luego la temperatura se eleva a 70 ± 2°C por 4 horas; se deja escapar la presión residual, se destapa el recipiente y continúa calentando para eliminar los vapores tóxicos. Se enfría y el contenido se transfiere a un ma-

traz volumétrico de 25 ml, se afora y centrifuga a 3000-4000 rpm durante 5 minutos. La fase clarificada se inyecta al espectrofotómetro de absorción atómica empleando una flama de aire-acetileno o un horno de grafito.

La fruta o vegetal pueden digerirse con una mezcla de ácido clorhídrico-peróxido de hidrógeno (30 volúmenes) en relación 50:1 a  $70 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , siendo más rápida la destrucción de la materia orgánica procediendo después a la digestión de igual manera que en el párrafo anterior.

3. Técnica recomendada por Preer y colaboradores (98) para la determinación de hierro en frutas y verduras.

Se pica finamente la muestra, se seca en la estufa a  $85^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. Una vez seca, se tritura con mortero y calcina por lo menos 24 horas a  $550^{\circ}\text{C}$ . Disolver las cenizas en ácido clorhídrico 6N - ácido nítrico concentrado (5:1); filtrar y aforar a 100 ml. Una alícuota de 4 ml se coloca en un tubo de colorímetro, se adiciona 1 ml de tiocianato de potasio 3M y se mide la absorbancia del compuesto colorido desarrollado a 480 nm contra un blanco, calculando la concentración de hierro a partir de una curva estándar.

## APENDICE II. SECCION C.

1. Técnica recomendada por Jayman y colaboradores (65) para la determinación de hierro en bebidas no alcohólicas.

El procedimiento ha sido utilizado para la cuantificación de hierro en té.

Se seca la hoja y muele finamente, se pesan 0.2 g, los cuales se colocan en un tubo de vidrio especial para ignición; calcinar toda la noche a  $450^{\circ}\text{C}$ , enfriar; añadir pocas gotas de agua y 2 ml de una mezcla de ácido nítrico - ácido clorhídrico - agua (25 + 25 + 50) evaporando la mezcla hasta sequedad en una parrilla. Inmediatamente agregar 10 ml de ácido clorhídrico 0.05N, calentar un poco para disolver el contenido, tapar y agitar la solución. Reposar y trabajar una alícuota desarrollando color con o-fenantrolina y leyendo la absorbancia del complejo a una longitud de onda de 490 nm.

2. Técnica recomendada por Deurenberg y colaboradores (33) para la determinación de hierro en jugos.

La muestra de jugo se acidifica, filtra, decolora con carbón activado y se diluye. A una alícuota de esta solución se agrega clorhidrato de hidroxilamina, buffer de acetatos (pH 4.8) y *o*, *o'*-dipiridilo, leyéndose la

absorbancia del complejo colorido a 530 nm.

3. Técnica recomendada por Mc. Gary y Young (83) para la determinación de hierro en jugos y otras bebidas no alcohólicas.

Se sigue el mismo procedimiento empleado para frutas y verduras (Apéndice II, sección B).

4. Técnica recomendada por Williams (124) para la determinación de hierro en jugos y otras bebidas no alcohólicas.

Se sigue el mismo procedimiento empleado para frutas y verduras (Apéndice II, sección B).

APENDICE II. SECCION D.

1. Técnicas recomendadas por la International Dairy Federation (59) para la determinación de hierro en leche y sus derivados.

La leche entera, la leche descremada, el suero de mantequilla, el yoghurt natural y la crema se calientan a  $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$  y mezclan suavemente. En caso de separarse la grasa, se aumenta la temperatura a  $40^{\circ}\text{C}$  lentamente, se mezcla y se enfría rápidamente a  $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Se pesan 10 g aproximadamente en un matraz microkjeldahl y se procede a la digestión con ácido nítrico - ácido sulfúrico - peróxido de hidrógeno. Una vez digerida la muestra, se desarrolla color en el mismo matraz adicionando 4 ml de la solución de batofenantrolina (83.1 mg en 100 ml de alcohol isoamílico), calentando a  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 1 hora y midiendo la absorbancia de la fase alcohólica a 533 nm contra un blanco.

La leche evaporada debe ser agitada en la lata con frecuentes inversiones, luego se transfiere a un recipiente de vidrio, el cual se cierra y calienta en un baño a  $40 - 60^{\circ}\text{C}$  removiéndola y agitándola vigorosamente cada 15 minutos. Después de 2 horas se enfría a  $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$  se agita con una espátula cuidando que la grasa no se separe. Se pesan 2.5 g en el matraz microkjeldahl y se

procede a digerir y determinar el hierro de igual manera que en la leche entera.

La leche condensada debe mezclarse homogéneamente con una espátula y ser transferida a un recipiente de vidrio, en donde se le calienta a 30 - 40°C, luego se enfría a 20 ± 2°C y se pesan 2.5 g en el matraz microkjeldahl, procediéndose a trabajar de igual manera que la leche entera a partir de la digestión.

La leche en polvo entera y descremada puede homogeneizarse por inyección de aire al recipiente donde se le coloque; pesar 1 g y digerir de igual manera que la leche entera, así como también la medición.

Como es posible que en la mantequilla exista una distribución irregular del hierro, éste se determina en el suero. El contenido de hierro en la fracción grasa de la mantequilla es nulo comparado con el del suero y puede ser ignorado. Para producir esta separación, 100 g de la muestra se colocan en un tubo de centrifuga previamente tarado y se coloca en un baño de agua a 45 ± 1°C, en cuanto la mantequilla se funde, el tubo se centrifuga a 2500 g. La capa de grasa se remueve con una pipeta y se agregan 10 ml de éter de petróleo, el cual también se remueve con una pipeta y se repite la operación. El residuo de éter se elimina por calentamiento en baño

de agua a  $65^{\circ}\text{C}$ . El tubo se enfría a  $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , se pesa con su contenido (para ser considerado en el cálculo final), se mezcla y se toman 2 g para ser trabajados de igual forma a la leche entera a partir de la digestión.

Los helados deben fundirse a baño maría a  $45 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , mezclarse y enfriarse a  $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , mezclarse nuevamente y pesarse 2.5 g para trabajarse como la leche entera.

Con respecto a los quesos, se recomienda eliminar la cubierta y moler rápidamente, homogeneizar con inyección de aire y pesar 1 g. En caso de trabajar con quesos suaves, se homogeneiza con una pala de la mejor manera posible, se pesa 1 g y se procede a digerir y a cuantificar el hierro de manera similar a la leche entera.

Las caseínas, caseinatos y coprecipitados deben tener un tamaño de partícula de 0.5 mm para proceder a su análisis por lo que, si no lo presenta, deben molerse 50 g, homogeneizarse por inyección con aire y pesarse 0.75 g en el caso de caseína y caseinatos y 0.35 g para coprecipitados.

La grasa de manteca se calienta a  $40^{\circ}\text{C}$  y se deja a esta temperatura 5 minutos. Se mezcla suavemente, se enfría a  $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$  y se pesan 20 g. Esta muestra se somete a un lavado con ácido nítrico a  $80 - 90^{\circ}\text{C}$ , luego se enfría a  $40^{\circ}\text{C}$  y la grasa se remueve con una pipeta. Se

añaden 15 ml de éter de petróleo, se agita con cuidado y se elimina con una pipeta. La operación se repite y el exceso de éter se elimina por calentamiento a  $65^{\circ}\text{C}$  en baño maría. Se enfría a temperatura ambiente y se continúa el análisis al igual que la leche entera a partir de la digestión.

La diferencia que exista entre un duplicado y otro no debe ser mayor que el valor de repetitividad que se dá en la siguiente tabla (Tabla VI).

---

TABLA VI

---

PRODUCTO	REPETITIVIDAD mg/kg
leche	0.02
leche descremada	0.02
suero de manteca	0.03
yoghurt	0.03
leche evaporada	0.1
leche condensada	0.1
leche entera en polvo	0.2
crema	0.02
mantequilla	0.03
grasa de mantequilla	0.05
helados	0.2
queso fresco y procesado	0.2
caseína, caseinatos y coprecipitados	0.4

---

APENDICE II. SECCION E.

1. Técnica recomendada por Mc. Gary y Young (83) para la determinación de hierro en pescados y mariscos.

Se sigue el mismo procedimiento empleado para carne y derivados (Apéndice II, sección A).

2. Técnica recomendada por Williams (124) para la determinación de hierro en pescados y mariscos.

Se sigue el mismo procedimiento empleado para carne y derivados (Apéndice II, sección A).

3. Técnica recomendada por Uchida y sus colaboradores (118) para la determinación de hierro en pescados y mariscos.

El procedimiento ha sido utilizado para la cuantificación de hierro en ostiones y tiburón en polvo.

Se digiere la muestra (2 mg) en un recipiente de teflón con cierre hermético, con pequeños volúmenes (40  $\mu$ l) de ácido nítrico - ácido perclórico en relación 5:1 por 3 horas a 130°C. El digerido se diluye a 1.5 g con agua bidestilada (en balanza analítica) y se inyectan alícuotas, ya sea de 75  $\mu$ l para la absorción atómica, o de 100  $\mu$ l para la emisión, siendo los resulta-

dos obtenidos interpolados en una curva estándar de hierro para conocer la concentración.