

Microdeterminaciones de cobalto en alimentos criollos *

SILVIA GARCÍA GARCILASO
Instituto Nacional de Nutrición

INTRODUCCION

El verdadero papel del cobalto como elemento necesario para el organismo era poco conocido hasta que se descubrió su presencia en la vitamina B₁₂; aunque ya Underwood (1), en 1937, había efectuado estudios tratando anemias en el ganado ovino y bovino con agregado de cobalto, y así mismo en 1951, Layrisse (2) demuestra que, unido al hierro en el tratamiento de las anemias ferroprivas, ayuda a la fijación de éste, obteniendo buenos resultados.

Se ha demostrado que el cobalto forma parte integral en la estructura química de la vitamina B₁₂ (3), conocida químicamente como la cobalamina, y que ese elemento, administrado por vía oral, estimula la síntesis de la B₁₂ por la microflora intestinal (4), función distinta a la acción que ejerce sobre los tejidos hematopoyéticos.

Así mismo se ha podido comprobar que en animales no rumiantes, tales como: ratones y ratas (6), pollos (7) y cochinos (8), el cobalto tiene un efecto beneficioso aunque los animales se mantengan con dietas deficientes en vitamina B₁₂.

Esta vitamina se encuentra casi exclusivamente en los alimentos de procedencia animal, siendo extremadamente pobres las cantidades de B₁₂ encontradas en los de origen vegetal.

* El presente trabajo fue efectuado bajo la dirección del Dr. W. G. Jaffé, a quien doy las gracias por su valiosa colaboración.

Una observación reciente (9) sobre el contenido relativamente elevado de vitamina B₁₂ en leguminosas no está de acuerdo con las observaciones y los valores obtenidos por algunos autores.

Por estas razones podemos suponer que en aquellos humanos con dietas bajas en alimentos de origen animal y, por lo tanto, probablemente, carentes de vitamina B₁₂, el cobalto dietético posiblemente tenga mucha importancia si se efectúa en ellos la síntesis intestinal de dicha vitamina de modo similar como en las especies animales citadas, lo que no se ha comprobado hasta el presente, si bien parece bastante probable de que así sea.

Por lo anotado anteriormente podemos darnos cuenta del interés especial que debe darse al cobalto dietético, que, aunque no era considerado como esencial para el hombre hasta hace poco, dadas sus relaciones con la vitamina B₁₂, entró a formar parte, si no de los indispensables, al menos de los elementos necesarios para el organismo.

Aparte de la importancia ya reconocida, debemos agregar a ésta la importancia que tiene como elemento posiblemente esencial en la fisiología de las plantas, últimamente considerado como indispensable para éstas. Se encuentra en mínimas cantidades en muchas plantas (10), (11), (12), (13), (14), y parece ser esencial en el crecimiento de ellas, pero aún faltan nuevas comprobaciones.

Dada la importancia antes descrita, tiene por ello gran interés encontrar un micrométodo para su determinación, en el cual no interfieran elementos presentes en las cenizas, tales como: hierro, calcio, fósforo, zinc, cobre, fluor, etc. Al efecto, se efectuaron estudios detallados de varios métodos que hicieron posible una selección para utilizar el más conveniente, obteniéndose resultados bastante aceptables si se comparan con valores aparecidos en algunas publicaciones (12), (13), (15), (16).

ESTUDIO Y SELECCION DE METODOS

Se ensayaron varios métodos analíticos para la determinación del cobalto, ya publicados, utilizando soluciones standard.

Los métodos ensayados fueron los siguientes:

- 1º Modificación del método 2-nitroso-1-naftol (17).
- 2º Método de Ahmad y Mc. Collum (10).
- 3º Método de sal nitroso R (18).
- 4º Modificación del método sal nitroso R (19).
- 5º Microdeterminaciones de cobalto en materiales biológicos (20).

Los tres primeros métodos carecen de especificidad y no son lo suficientemente sensibles para valorar cantidades de cobalto del orden de 0.4 mcg. El método enunciado como 4º reúne las condiciones de especificidad y sensibilidad necesarias para este tipo de determinaciones, pero tiene el inconveniente de que en algunas muestras, cuando se trabaja con las soluciones de sus cenizas, al hacer el pH alcalino frente a la fenolftaleína, para extraer en condiciones óptimas el cobalto con ditizona, se forma un precipitado bastante denso (probablemente de fosfatos), lo cual no es deseable. Por este motivo preferimos efectuar esta operación de acuerdo al método N° 5.

METODO ELEGIDO

Cenizas de la muestra: Se emplea el método seco por ser el más recomendable cuando se trata de cantidades mayores de 15 gramos; en este caso se utilizan cenizas de 200 gramos de muestra y a una temperatura inferior a 700°C, como lo especifica el micrométodo en materiales biológicos de Saltzman (20).

Separación preliminar del cobalto: Se realiza con ácido nítrico 1:1 a "baño de maría", según recomendaciones anteriormente hechas por Saltzman (21).

Disolución de las cenizas: El residuo obtenido anteriormente se disuelve en ácido fosfórico 1:49, se ajusta el pH utilizado anaranjado de metilo como indicador y citrato de sodio al 50% o ácido clorhídrico 1:1, según el carácter de la solución proveniente de las cenizas, el cual varía de ácido a básico según sus constituyentes. El ajuste del pH se realiza con el fin de poder luego tratar la solución con 2-nitroso-1-naftol en medio ácido y lograr extracción completa.

Extracción del cobalto: La extracción se realiza con cloroformo haciendo sucesivos lavados con ácido clorhídrico 1:99. El cloroformo de los extractos purificados de cobalto se evapora a sequedad.

Dstrucción del 1-nitroso-2-naftol: La destrucción se realiza con mezcla sulfo-nítrica hasta obtención de una solución completamente incolora.

Formación del complejo: El residuo ácido anterior se neutraliza en presencia de fenolftaleína, utilizando potasa al 20%; de esta manera, al agregar nuevamente ácido sulfúrico 1.5 NI, se tiene la certeza de que no se ha agregado en exceso para luego hacerlo con clorhídrico 0.25 NI; ya en esta forma se considera la solución con un pH conveniente para agregar el reactivo específico, en este caso sal nitroso R, obteniéndose un complejo que se lee a 530 milimicras.

Con este método se obtiene bastante linealidad, un blanco bajo y lecturas constantes con respecto a los standards.

VENTAJAS PROPUESTAS

Como se puede observar, el método tiene ciertas ventajas sobre los experimentados hasta ahora. Tales ventajas son:

1ª) Se ajusta el pH de la solución problema entre 3 y 4, y no alcalino como lo especifica el método modificado de la sal nitroso R (19), porque las sales extrañas de las muestras producen recuperación incompleta del cobalto.

2ª) La separación, precipitando en medio ácido con 1-nitroso-2-naftol (22), (23), no se considera apropiada para cantidades de microgramas, debido al problema de supersaturación; en cambio, la separación por extracción empleando ditizona (24), 2-nitroso-1-naftol (25) o 1-nitroso-2-naftol (26), (27), (28), es apropiada para cantidades pequeñas de cobalto y especialmente en el 1-nitroso-2-naftol se puede utilizar un pH suficientemente ácido para evitar la precipitación de fosfato cálcico.

3ª) Para desarrollar el complejo de cobalto se agrega el reactivo sal nitroso R a la solución problema una vez que se han separado los metales que pueden intervenir en el curso de la reacción. La mayoría de los métodos añaden la sal ni-

troso R directamente a la solución de las cenizas (10), (18), (29), (30), (31), (32), (33), (34), con lo cual se forman junto con el cobalto otros complejos de cationes que pueden interferir en la lectura final. La sensibilidad es inadecuada debido a los límites físicos de solubilidad de las sales incineradas, lo que impide la concentración del color al nivel requerido. Aquí se nota la preferencia por la sal nitroso R debido a la mayor especificidad de este reactivo.

4ª) Los métodos (17), (10), (18), usados anteriormente, no dan finalmente la especificidad requerida para los niveles bajos de cobalto a determinar.

APLICACIONES DEL METODO A SOLUCIONES STANDARDS DE COBALTO CON Y SIN INTERFERENCIAS

El método elegido ha sido comprobado empleando cantidades conocidas de cobalto del orden de 0.2 y 0.4 mcg; asimismo hemos determinado la influencia que sobre estas cantidades de cobalto ejerce la presencia de 400 mcg. de zinc, cobre, hierro, respectivamente, siendo los resultados totalmente satisfactorios.

ENSAYO DE RECUPERACION

Finalmente se hicieron experiencias de recuperación de 0.2 y 0.4 mcg. de cobalto añadidas a las cenizas de 200 gramos de papas blancas, obteniéndose los resultados que aparecen en la tabla N° 1.

TABLA N° 1
PRUEBA DE RECUPERACION

| Muestras | Cobalto añadido mcg. | Cobalto encontrado mcg. |
|---------------------|-------------------------|----------------------------|
| Standard | 0.2 | 0.2 |
| Standard | 0.4 | 0.4 |
| Papas blancas | — | 0.09 |
| Papas blancas | 0.2 | 0.31 |
| Papas blancas | 0.4 | 0.495 |

RESULTADOS OBTENIDOS

En la tabla 2 se presentan los resultados obtenidos con varias muestras de diferentes alimentos. Las muestras analizadas, con una excepción, se obtuvieron en el mercado de Caracas. La muestra de harina de alfalfa se obtuvo de una fábrica de alimentos para animales y era importada. Todas las determinaciones se hicieron por duplicado.

Por el análisis de la tabla 2 observamos el bajo contenido de cobalto de la mayoría de las muestras analizadas, especialmente de las distintos variedades de cambur (bananas) y caraotas, en la papa blanca, zanahoria, yuca, sal de cocina y también en el topocho maduro, plátano verde, plátano maduro, pimentón verde, ñame y leche en polvo.

Valores algo superiores se encontraron en el ocumo, harina de funche, berenjena y papa rosada, sobre todo en esta última.

Un contenido bastante más elevado de cobalto lo presentaron la arepa, el pan blanco y negro, la espinaca, la harina de alfalfa y las arvejas secas.

Si comparamos algunos de los valores obtenidos por nosotros con los correspondientes obtenidos por otros autores (12), (13), (15), (16), se observa que nuestros valores son bastante más bajos; esta diferencia se puede explicar teniendo en cuenta que muchos de los valores obtenidos por otros autores fueron determinados empleando métodos que dejan mucho que desear en cuanto a especificidad y exactitud se refiere, sin que descartemos igualmente la influencia que hayan tenido sobre las muestras ciertos factores ambientales, como las características del suelo.

TABLA N° 2

CONTENIDO DE COBALTO EN LOS ALIMENTOS ANALIZADOS

| Muestra analizada | mcg./kg. |
|---|----------|
| Arvejas secas (<i>Pisum sativum</i>) | 34.75 |
| Arepas (pan de maíz) | 15.88 |
| Berenjena (<i>Solanum melongena</i>) | 3.1 |
| Cambur manzano maduro (<i>Musa paradisiaca sapientum</i>) | 0.1 |
| Cambur manzano verde " " " | 0.0 |
| Cambur morado maduro " " " | 0.4 |
| Cambur pineo maduro " " " | 1.1 |
| Cambur pineo pintón " " " | 0.3 |
| Cambur titiario maduro " " " | 0.8 |
| Caraotas blancas grandes (<i>Phaseolus vulgaris</i>) | 0.0 |
| Caraotas blancas pequeñas " " " | 0.0 |
| Caraotas negras " " " | 1.5 |
| Caraotas rojas " " " | 0.2 |
| Caraotas rosadas " " " | 0.3 |
| Espinaca (hojas) (<i>Spinaca oleracea</i>) | 26.1 |
| Harina de maíz (funche) | 4.1 |
| Leche en polvo | 2.5 |
| Ñame (<i>Dioscorea alata</i>) | 1.2 |
| Ocumo (<i>Xanthosum sagittifolium</i>) | 4.5 |
| Pan blanco | 21.8 |
| Pan negro | 21.6 |
| Papa blanca (<i>Solanum tuberosum</i>) | 0.3 |
| Papa rosada " " " | 7.9 |
| Pimentón verde (<i>Capsicum annum</i>) | 2.0 |
| Plátano maduro (<i>Musa paradisiaca normalis</i>) | 2.6 |
| Plátano verde " " " | 2.0 |
| Sal de cocina | 0.6 |
| Topocho maduro (<i>Musa paradisiaca sapientum</i>) | 1.1 |
| Yuca (<i>Manihot utilissima</i>) | 0.9 |
| Zanahoria (<i>Daucus carota</i>) | 0.6 |
| Harina de alfalfa | 28.2 |

CONCLUSIONES

1.—La mayoría de los métodos existentes (17), (10), (18), no son lo suficientemente sensibles ni específicos para valorar las pequeñas cantidades de cobalto presentes en las muestras; solamente han reunido estas condiciones dos métodos de los expuestos anteriormente (19), (20).

2.—Debido a esta falta de especificidad de los reactivos empleados en la valoración del cobalto, es preciso efectuar una separación previa de este metal de los restantes que interfieren en la determinación, con lo cual se consigue además una concentración del cobalto en un volumen más pequeño de solución.

3.—De los dos métodos más importantes de extracción de cobalto: a) con ditizona a pH entre 8 a 9 en presencia de citrato (19); b) con 1-nitroso-2-naftol a pH ácido (20), se recomienda el b), ya que en estas condiciones de pH ácido se evita la precipitación de los fosfatos alcalinos térreos.

4.—Una vez extraído el cobalto con 1-nitroso-2-naftol a pH ácido, se recomienda la destrucción del exceso de reactivo con una mezcla nítrico-sulfúrica (19).

5.—La formación del complejo de cobalto - sal nitroso R se debe efectuar calentando la solución 10 minutos a baño de maría y a continuación se añade ácido clorhídrico concentrado y se vuelve a calentar en el mismo baño por otros 10 minutos, para destruir las interferencias de los complejos que se forman con la sal nitroso R de otros metales extraídos simultáneamente con el cobalto.

6.—Cuando las cantidades de cobalto a determinar no son inferiores a 0.2 mcg. se recomienda que se lea la trasmisión del color del complejo cobalto - sal nitroso R a una longitud de onda de 530 milimicras.

7.—Para cantidades de cobalto inferiores a 0.2 gammas se aconseja destruir el exceso de reactivo añadiendo 1 cc. de agua de bromo concentrada y calentar a ebullición un minuto y luego hacer las lecturas a una longitud de onda de 420 milimicras, a fin de aumentar la sensibilidad del método.

8.—Hemos aplicado el micrométodo que proponemos a valoración cuantitativa del cobalto en 31 muestras de alimentos

criollos, observándose los valores más altos en las espinacas, arepas, pan blanco, pan negro y papas rosadas.

RESUMEN

Se ha efectuado un estudio de los principales micrométodos existentes para determinar cuantitativamente el cobalto en los alimentos. Se analizan varias muestras de alimentos vegetales con el fin de determinar su contenido de cobalto, dada la importancia de este elemento para la síntesis de la B₁₂ por activación de los micro-organismos de la flora intestinal.

Entre los métodos estudiados nos ha parecido más conveniente elegir al micrométodo en materiales biológicos con algunas modificaciones inherentes a la naturaleza de las muestras utilizadas, dado que el método es para materiales biológicos y el nuestro es para vegetales. Así obtuvimos 4 valores bastante apreciables en algunos alimentos de consumo diario, tales como: arvejas, arepas, espinacas y pan blanco y negro.

SUMMARY

A study of the main micromethods for determining cobalt quantitatively in foods has been carried out.

Several samples of staple vegetable foods has been analyzed for determining their cobalt content owing to the importance of this element in the synthesis of vitamin B₁₂ by its activation of the micro-organisms of the intestinal tract.

Among the methods that we have revised, it has appeared to us as most useful the micro-method for biological material, with some modification inherent to the nature of the samples analyzed.

In this way, we obtained four values highly noticeable in some foods of dairy consumption, such as green beans, spinach, black and white bread and "arepa" (a typical venezuelan corn food).

BIBLIOGRAFIA

- (1) Underwood, E. D.—Cobalt content of iron and its posible relation to treatment of anemia. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 36: 296-299 (1937).
- (2) Layrisse, M.—Estudios preliminares del tratamiento de las anemias ferroprivas en los anquilostomos con la asociación hierro-cobalto. *Arch. Ven. Nutr.* Vol. II, No. 1, 125-138 (1951).
- (3) Rickes, G. M., et al.—*Science* 108, 134 (1948).
- (4) Hendlin y Ruger, R. L.—*Science* 111, 541 (1950).
- (5) Saunders, A. P.; Otto, R. H., y Sylvester, J. C.—*Bact.* 64, 725 (1952).
- (6) Jaffé, W. G.—*Science* 115, 225 (1952).
- (7) Davis, R. L.; Briggs, G. M., y Sloan, H. J.—*Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 82, 175 (1953).
- (8) Klosterman, E. W., et al *Science* 112, 168 (1950).
- (9) Rohatgi, K.; Barenjee, M., and Barenjee, B.—Effect of germination on vitamin B₁₂ values of pulses (Leguminous seeds). *J. Nutrition*, Vol. 56: 403 (1956).
- (10) Ahmad, B., and Mc. Collum, E. V.—Cobalt of some food materials from different parts of the United States. *Am. J. Hyg.* 29A, 24-6 (1939).
- (11) Beeson, K. C.—The mineral composition of crops with particular reference to the soils in which they were grown. *U. S. Dept. Agr. Misc. Pub.* 369 (1941).
- (12) Bertrand, G., and Mokragnatz, M.—*Bull. Soc. Chma.* 47, 326-331 (1930).
- (13) Calvery, H. O.—Trace elements in foods. *Food research*, 7, 313-331 (1942).
- (14) Askew, H. O., and Dixon, J. K.—*New Zeland. J. Sc. Tech.* 18, 688-693 (1937).
- (15) Bowtead, J. E.; Saekwille, J. P., and Sanclair, R. D.—*Sei Agr.* 22, 314 (1942).
- (16) Hurwitz, C., and Beeson, K. C.—Cobalt content of some food plants. *Food Research*, 9348-357 (1944).
- (17) Bianchi C., L.—Modificación del método 2-nitroso-1-naftol. Trabajo sin publicar (1952).
- (18) Beeson, K. C., and Gregory, R. L.—Report on copper and cobalt in plants. *J.A.O.A.C.* Vol. 33, 824 (1950).
- (19) Díaz C., R.—Modificación del método sal nitroso R. Trabajo no publicado (1953).
- (20) Saltzman, B. E.—Microdeterminations of cobalt in biological materials. *Anal. Chem.* Vol. 27, 284 (1955).
- (21) Saltzman, B. E.—*Anal. Chem.* Vol. 24, 1016-20 (1952).
- (22) Sylvester, N. D., and Lanipett, I. H.—*J. Soc. Chem. Ind.* Vol. 59, 57-60 (1940).
- (23) Waldbaver, L., and Ward, N. M.—*Ibid.* vol. 14, 727-8 (1942).
- (24) Marston, H. R., and Dewey, D. W.—*J. Exptl. Biol. Med. Sci.*, Vol. 18, 343-52 (1940).

- (25) Boyland, E.—Analyst Australian. Vol. 71, 230-1 (1946).
- (26) Howk, A. J., and Young, R. S.—Anal. Chem. Vol. 22, 497 (1950).
- (27) Nichol, W. E.—Can. J. Chem. Vol. 31, 145-9 (1953).
- (28) Paulais, M. R.—Am. Pharm. Franc. Vol. 4, 101-10 (1946).
- (29) Hall, A. J., and Young, R. S.—Anal. Chem. Vol. 22, 497 (1950).
- (30) Keenan, R. G., and Flick, B. M.—Anal. Chem. Vol. 20, 1238-41 (1948).
- (31) Kidson, E. B., and Auskew, H. O.—New Zealand. J. Sci. Technol. B21, 178-89 (1944).
- (32) Mc. Naught, K. J.—New Zealand. J. Sci. Technol. Vol. 30, 109-15 (1948).
- (33) Pascual, J. N.; Schipman, W. H., and Wilson, S.—Anal. Chem. Vol. 25, 1830 (1948).
- (34) Young, R. S.; Pinkey, E. T., and Dick, R.—Ind. Eng. Chem. Anal. Vol. 18, 474 (1946).