

# INFLUENCIA DE DIVERSOS FACTORES EN LA DETERMINACION DEL CONTENIDO DE CENIZAS, FOSFORO, MAGNESIO Y SODIO EN UNA MUESTRA DE PASTURAS

(*Bothriocloa laguroides*)

M.R. BIANCHINI<sup>1</sup> y G.A. EYHERABIDE<sup>2</sup>

Recibido:11-02-93

Aceptado:14-05-93

## RESUMEN

Con el objeto de estudiar el efecto del tamaño del crisol, la posición de este en la mufla y la cantidad de muestra empleada, sobre la evaluación del contenido de cenizas, fósforo, magnesio y sodio, se diseñó un experimento factorial con tres factores a 2 niveles, con 4 repeticiones. Se utilizó en el ensayo una muestra de pastura (*Bothriocloa laguroides*, estado reproductivo, fracción tallo). Las muestras fueron calcinadas a 500°C durante 5 horas, las cenizas disueltas en HCl 4 F, y diluidas a 25 ml con agua destilada. el contenido de P se determinó colorimétricamente por el método del azul de molibdeno, el de Na por fotometría de llama, y el de Mg por de absorción atómica. Una interacción significativa ( $P<0,05$ ) se observó entre la posición del crisol en la mufla y la cantidad de muestra, en relación al contenido de P, Mg y Na. El análisis de contenido de Na mostró una correlación significativa ( $P<0,05$ ) con respecto a la cantidad de muestra y al tamaño del crisol. El tamaño de crisol influyó significativamente ( $P<0,01$ ) en el contenido de cenizas. Se condujo un ensayo de recuperación de fósforo para distintas relaciones CaO/P2O5, no observándose una correlación significativa ( $P<0,05$ ).

**Palabras clave:** cenizas, fósforo, magnesio, sodio, pastura.

## FACTORS DETERMINING ASH, PHOSPHORUS, MAGNESIUM AND SODIUM CONTENTS IN *Bothriocloa laguroides* PASTURE

## SUMMARY

The object of this experiment was to study the effects of vessel size, position of the crucible in the muffle furnace and sample weight on ash, phosphorus, magnesium and sodium contents. A factorial experiment with 3 factors each at two levels, with 4 replications was designed. *Bothriocloa laguroides* (reproductive state, stem fraction) was chosen as the test material. The samples were ashed at 500°C for 5 hours, and the ashes were dissolved in HCl 4 F, and diluted to 25 ml with distilled water. P contents was determined colorimetrically by the molybdenum-blue method, Ns by flame photometry, and Mg by atomic absorption spectrophotometry. A designificant interaction ( $P<0,05$ ) between crucible position and sample weight was found when phosphorus, magnesium and sodium contents were determined.

Sodium content showed a significant correlation ( $P<0,05$ ) to sample weight and cricible size. A positive correlation between ash and vessel size ( $P<0,01$ ) was found. Phosphorus assay recovery show no significant correlation ( $P<0,05$ ) for different CaO/P2O5 relationships.

**Key Words:** ashes, phosphorus, sodium, magnesium, pasture.

<sup>1</sup>Cátedras de Química General e Inorgánica y Química Analítica. Unidad Integrada INTA-F.C.A., Universidad Nacional de Mar del Plata. C.C. 276 (7620), Balcarce.

<sup>2</sup>Cátedras de Química General e Inorgánica y Química Analítica, Unidad Integrada INTA-F.C.A., Universidad Nacional de Mar del Plata.

## INTRODUCCION

La ganadería en la Argentina depende casi exclusivamente del pastoreo a campo, donde los animales prácticamente no reciben ningún tipo de suplemento y dependen de los elementos disponibles en el forraje para cubrir todas sus necesidades nutricionales (Ruksan, 1985). El contenido mineral de las plantas debe satisfacer las necesidades nutricionales de las mismas, de los animales y del hombre. Los análisis de plantas sirven principalmente como base para estimar el valor nutricional de un cultivo (Lakanen, 1969).

Antes de efectuar la determinación de los nutrientes, debe realizarse la mineralización del material vegetal. Esta etapa puede efectivizarse mediante el empleo de 2 técnicas: 1°) Acenización del tejido vegetal por vía seca; 2°) Acenización por vía húmeda (Gorsuch, 1959; Jackson *et al.*, 1981). Existe una gran controversia respecto a la conveniencia de las técnicas por vía seca o húmeda para la digestión de materia vegetal, previo a la determinación de nutrientes (Jones *et al.*, 1973; Hoirtokann *et al.*, 1975, citados por Prasad *et al.*, 1978; Tusl, 1972). El primero de los métodos nombrados es en general aceptable, salvo cuando se quieren determinar elementos volátiles, y tiene una alta precisión (Adrián, 1973). Tiene la ventaja de evitar la contaminación por agregado de reactivos, y permitir el procesamiento de muchas muestras con facilidad (Gorsuch, 1959).

Aunque la metodología ha sido estudiada en detalle, no se pueden hacer generalizaciones en lo que respecta a la pérdida de elementos, lo que estaría íntimamente relacionado con: a) el tipo de material biológico empleado (Gorsuch, 1959; Groove *et al.*, 1961; Basson, 1972); b) el material de los crisoles empleados, Rowan y otros (1982) constataron pérdidas en el contenido de sodio mayores cuando se trabajó con crisoles de porcelana; c) la temperatura y el tiempo de calcinación. El efecto de varias temperaturas, dentro del rango especificado para la destrucción de materia orgánica en plantas (475-550°C, en combinación con diferentes tiempos de calcinación, no dio diferencias en la recuperación de sodio agregado, mientras la mayor recuperación de potasio se encontró calcinando a 500°C por 2-3 horas (Rowan y otros, 1982).

Groove *et al.*, (1961), encontraron que la máxima temperatura a la cual se pudo calcinar tejido vegetal durante 24 horas, sin pérdida apreciable de sodio y potasio, fue 550°C.

La posibilidad de pérdida de ácido fosfórico durante la acenización ha sido considerada por mucho tiempo, y para evitarla se ha sugerido el agregado de ácido nítrico o nitrato de potasio, antes de la incineración de la muestra (Stuffins, 1967), o carbonato de sodio (Tusl, 1962).

Para poder determinar la exactitud del método de calcinación empleado en la preparación de muestras de forraje, con miras a la cuantificación de fósforo, sodio y magnesio, se implementó el siguiente trabajo.

## MATERIALES Y METODOS

La determinación del contenido de cenizas, fósforo, magnesio y sodio se efectuó sobre una muestra de pastura (*Bothriocloa laguroides*, estado reproductivo, fracción tallo).

Las muestras secas y molidas, fueron provistas por la Cátedra de Forrajes (Facultad de Ciencias Agrarias, Balcarce).

Se usaron crisoles de porcelana por 20 y 30 ml, y dos pesos de muestra (150 y 250 mg), y dos posiciones dentro de la mufla (atrás y adelante, **Figura 1**).

Se hicieron 4 repeticiones, calcinándose ocho muestras en cada ensayo, utilizando una mufla Thermolyne 2000, cuyas dimensiones internas son 22 cm de profundidad, 10 cm de ancho y 10 cm de alto.

Las determinaciones de fósforo se hicieron por el método del azul de molibdeno, empleado por Tusl (1972), usando un Fisher Electrophotometer II. Las determinaciones de sodio se efectuaron por fotometría de llama, usando un fotómetro de emisión por llama Crudo-Caamaño, y las de magnesio por absorción atómica, con un espectrofotómetro Jarrel Ash, usando la línea de 285,2 nm.

Para el análisis de los resultados se utilizó un diseño estadístico factorial, con tres factores a 2 niveles, con 4 repeticiones.

### Preparación de la muestra

Se pesaron alrededor de 150 ó 250 mg de muestra, previamente secada a 65°C hasta peso constante, según

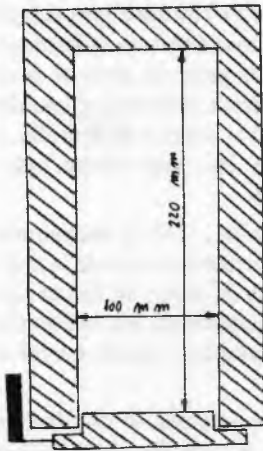


Figura 1: Thermolyne, Modelo 2.000. Dimensiones internas.

correspondiera, de acuerdo al diagrama propuesto, empleando los dos tamaños de crisoles mencionados. Estos fueron llevados a la mufla y se dejaron a 150°C durante 15 minutos. La temperatura se aumentó 10°C cada 15 minutos, hasta alcanzar los 250°C, y se mantuvo ésta durante 30 minutos. Se elevó la temperatura a razón de 50°C cada 15 minutos, hasta llegar a 500°C. Se calcinaron las muestras durante 5 horas. Cada vez que se modificó la temperatura, se permitió la entrada de aire a la mufla. Los crisoles fueron retirados y colocados en un desecador. Una vez que los crisoles alcanzaron la temperatura ambiente, se volvieron a pesar y se determinó el contenido de las cenizas.

Las cenizas obtenidas se trataron con 1 ml de HCl 4 F y se evaporaron a sequedad y a baño maría. A continuación se adicionó 1 ml de HCl 4 F y unos de agua caliente, y cuando se enfrió la solución, se trasvasó un matraz de 25 ml, se hicieron varios lavados del crisol con agua tibia (40-50°C), y se diluyó con agua destilada hasta completar el volumen.

La solución así obtenida fue utilizada para efectuar la determinación de fósforo, magnesio y sodio.

## RESULTADOS Y DISCUSION

En la determinación de fósforo, magnesio y sodio, se encontró una interacción significativa ( $P < 0,05$ ) entre la posición del crisol en la mufla y la cantidad de muestra (Cuadros N° 1, 2 y 3).

Cuadro N°1: Efecto de la cantidad de muestra y la posición del crisol en la evaluación del contenido de fósforo.

Cantidad de muestra (mg)	Posición	
	Atrás	Adelante
150	0,066 (a) (x)	0,060 (b) (y)
250	0,062 (a) (x)	0,066 (a) (x)

Referencia: a y b representan diferencias entre niveles de cantidad para cada posición.  
x e y representan diferencias entre posiciones para cada cantidad.  
(letras distintas indican diferencias significativas,  $P < 0,05$ ).

Cuadro N°2: Efecto de la cantidad de muestra y la posición del crisol en la mufla, en la evaluación del contenido de magnesio.

Cantidad de muestra (mg)	Posición	
	Atrás	Adelante
150	0,162 (a) (x)	0,147 (b) (x)
250	0,143 (b) (x)	0,158 (a) (x)

Referencia: a y b representan diferencias entre niveles de cantidad para cada posición.  
x e y representan diferencias entre posiciones para cada cantidad.  
(letras distintas diferencias significativas,  $P < 0,05$ ).

Cuadro N°3: Efecto de la cantidad de muestra y la posición del crisol en la mufla, en la evaluación del contenido de sodio.

Cantidad de muestra (mg)	Posición	
	Atrás	Adelante
150	0,029 (a) (x)	0,0027 (a) (y)
250	0,022 (b) (x)	0,023 (b) (y)

Referencia: a y b representan diferencias entre niveles de cantidad para cada posición.  
x e y representan diferencias entre posiciones para cada cantidad.  
(letras distintas diferencias significativas,  $P < 0,05$ ).

**Cuadro N°4: Recuperación de P en función de la relación CaO/P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>**

1° Determinación		2° Determinación	
CaO/P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	% P Rec.	CaO/P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	% P Rec.
5,51	03,3	5,8	98,7
3,81	10,0	4,1	103,3
2,9	98,7	2,9	99,3
2,6	93,8	2,5	97,7
2,1	98,4	2,2	96,6
1,8	87,4	1,7	98,4
1,7	98,4	1,4	90,5
1,4	97,6	1,4	103,2
0,5	103,3	0,5	98,7
0,2	97,2	0,2	99,1
0,1	92,9	0,1	101,3

Coefficientes de correlación:  
 Lineal: 0,19 (NS) 0,10 (NS)  
 Cuadrático: 0,23 (NS) 0,18 (NS)  
 (NS): Coeficientes de correlación no significativos (P < 0,01)

**Cuadro N° 5: Efecto del tamaño del crisol en la evaluación del contenido de sodio.**

Repetición	Tamaño de crisol	
	chico	grande
1	0,023	0,028
2	0,024	0,028
3	0,024	0,027
4	0,026	0,028
x (*)	0,024 (a)	0,028 (b)
s	0,0013	0,0005

(\*): Promedios seguidos de distinta letra difieren significativamente (P<0,05).

**Cuadro N°6: Efecto del tamaño del crisol sobre la evaluación del contenido de cenizas.**

Repetición	Tamaño de crisol	
	chico	grande
1	2,94	4,42
2	4,28	3,40
3	3,33	4,05
4	3,36	4,42
x (*)	3,48 (a)	4,07 (b)
s	0,92	0,54

(\*): Promedios seguidos por distinta letra difieren significativamente (P<0,01).

Al trabajar con 150 mg el porcentaje más alto de dichos elementos se obtuvo en las muestras que se calcinaron en la parte de atrás de la mufla. Estos resultados podrían atribuirse a una diferencia de temperatura en el interior de la mufla, lográndose, supuestamente, las temperaturas más altas en la parte posterior.

Hamilton *et al.*, (1967), encontraron un ingrediente de temperatura dentro de la mufla trabajando con testigos de punto de fusión conocido, llegando a la conclusión de que la desviación dependía de la temperatura, siendo mayor al aumentar ésta.

Cuando los crisoles se ubicaron adelante, el porcentaje de fósforo fue significativamente mayor (P < 0,05) al aumentar la cantidad de muestra (Cuadro N° 1).

Según Stuffs (1967), no habría pérdidas de fósforo cuando el contenido de calcio, expresado como CaO, es por lo menos el doble respecto al de fósforo, expresado como PO. En la muestra analizada los valores promedio encontrados fueron 0,08 % y 0,30 % respectivamente, por lo que la relación sería 1:3,8. Para verificar si las pérdidas de fósforo son causadas por la baja relación CaO/P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, se efectuó un ensayo de recuperación de fósforo, con distintas relaciones CaO/P O. Los datos del Cuadro N°4 muestran que, en el amplio intervalo de relaciones CaO/P. utilizadas, no se observó una correlación significativa (P < 0,05) en el % de recuperación de fósforo.

Los datos de la evaluación del contenido de magnesio (Cuadro N° 2), muestran que cuando los crisoles fueron ubicados en la parte posterior, se obtuvieron resultados significativamente mayores (P < 0,05) trabajando con 150 mg. Según Gorsuch (1965) no habría evidencia de pérdidas de metales alcalinotérreos acenizando por debajo de 600 °C, ni tampoco reacciones entre estos siones y el material de crisol. Posiblemente, la cantidad de oxígeno en la parte posterior de la mufla sea insuficiente para la acenización total para muestras tan grandes como 250 mg.

El tamaño de crisol influyó significativamente en el contenido de cenizas (P < 0,01) y de sodio (P < 0,05), siendo los mayores valores para los crisoles grandes (Cuadros N° 5 y 6). El empleo de crisoles grandes tendría la ventaja de permitir una

**Cuadro N°7: Efecto de la cantidad de muestra sobre la evaluación del contenido de sodio.**

Repetición	Cantidad de muestra	
	150 mg	250 mg
1	0,028	0,023
2	0,029	0,024
3	0,029	0,022
4	0,031	0,023
x (*)	0,029 (a)	0,023 (b)
s	0,014	0,0034

(\*) letras distintas indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

**Cuadro N°8: Efecto de la cantidad de muestra y el tamaño de crisol en la evaluación del contenido de sodio.**

Tamaño de crisol	Cantidad de muestra (mg)	
	150	250
chico	0,027 (a) (x)	0,022 (b) (x)
grande	0,032 (a) (y)	0,023 (b) (x)

**Referencia:** a y b representan diferencias entre niveles de tamaño para cada cantidad.  
x e y representan diferencias entre niveles de cantidad para cada tamaño.

mejor oxidación de la muestra al aumentar la superficie expuesta (Gorsuch, 1965). Por otro lado, Rowan *et al.*, (1982), encontraron que las superficies de sílice en la porcelana pueden producir pérdidas en la recuperación de sodio debido a las relativamente altas temperaturas de acenizado. El uso de crisoles de mayor tamaño implicaría menor superficie de muestra en contacto con las paredes del crisol. El aumento en el contenido de cenizas al aumentar el tamaño de crisol podría atribuirse a posibles desprendimientos en el material refractario de la mufla, debido al largo período a que las muestras son sometidas en el proceso de calcinación.

El tamaño de muestra influyó significativamente ( $P < 0,05$ ) sobre la evaluación del contenido de

sodio (**Cuadro N°7**). Los resultados tienden a señalar que aumenta el contenido del elemento con la menor cantidad de muestra (**Cuadros N° 3 y 8**). Esto estaría indicando que la cantidad de oxígeno no es adecuada cuando aumenta la cantidad de muestra por encima de 150 mg. Groove *et al.*, (1961), encontraron una película de material carbonizado en el fondo de crisoles, lo que estaría indicando que el material acenizado superior actuaría como barrera que impide el acceso de aire a las partes inferiores de la muestra. Por otro lado, Heanes (1981), encontró valores ligeramente más altos de cobalto y molibdeno en muestras a las que les hizo llegar oxígeno a razón de 100 ml. por minuto durante la calcinación.

## CONCLUSIONES

La posición del crisol en la mufla y la cantidad de muestra calcinada influyeron en la determinación de fósforo, magnesio y sodio, mientras que el tamaño del crisol solo influyó en el contenido de cenizas y sodio.

Los resultados obtenidos indicarían que influyen varios factores en la evaluación de los contenidos de los elementos estudiados, tales como la temperatura y la cantidad de oxígeno disponible.

Los datos obtenidos en la recuperación de P mostraron que en las condiciones experimentales en las cuales se llevó a cabo el ensayo, una menor relación Ca/P no afectó la evaluación del elemento.

En resumen, podemos decir que dada la gran diversidad de material biológico que puede presentarse para este tipo de análisis, es necesario realizar un estudio previo de las condiciones experimentales, y decidir de acuerdo a eso la metodología a seguir.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la colaboración prestada por el personal del Laboratorio de Bioquímica y el Servicio de Estadística de la Unidad Integrada (INTA-Fac. Cs. Agrarias), y a la Cátedra de Forrajes de la Fac. de Cs. Agrarias, UNMdP.

## BIBLIOGRAFIA

- **ADRIAN, W.J.** 1973. A comparison of a wet pressure digestion method with other commonly used wet and dry ashing methods. *Analyst*, 98:213-216.
- **BASSON, W.D.** and R.G. BOHMER. 1972. An investigation into more rapid procedures for preparing leaf-tissue samples for analysis. *Analyst* (London), 97:482-489
- **GORSUCH, T.T.** 1959. Radiochemical investigations on the recovery for analysis of trace elements inorganic and biological materials. *Analyst* (London), 84:135-173.
- **GORSUCH, T.T.** 1965. Organic analysis: The Elements. In Kolthoff, I.M. and Elving, P.J. Treatise on Analytical Chemistry. Interscience Publishers, New York and London. V 12, Part II, 295-298.
- **GROOVE, E.L.; R.A. JONES** and **W. MATHEWS.** 1961. The loss of sodium and potassium during the dry ashing of animal tissue. *Anal. Biochem.*, 2: 221-230.
- **HAMILTON, E.I., MINSKI, N.J.** and **CLEARY, J.J.** 1967. The loss of elements during the decomposition of biological materials with special reference to arsenic, sodium, strontium and zinc. *Analyst*, 92: 257-259.
- **HEANES, D.L.** 1981. Determination of trace elements in plant materials by a dry ashing procedure. *Analyst*, 106:172-181.
- **JACKSON, H.W., EBDON, L., WEBB, D.C.** and **COX, A.G.** 1981. Determination of lead in vegetation by a rapid microsampling cup atomic absorption procedure with solid sample introduction. *Anal. Chim. Acta*, 128, 67-74.
- **LAKANEN, E.** 1969. Mineral composition of Finnish timothy. *Annales Agriculturae Fenniae*.8:20-29.
- **PRASAD, M** and **SPIERS, M.** 1978. Comparative study of ashing techniques for the digestion of horticultural plant samples. *J. Agric. Food Chem.*, 26(4): 824-827.
- **ROWAN, C. A., ZAJLZEK, O. T.** and **CALABRESE, E. J.** 1982. Dry ashing vegetables for the determination of sodium and potassium by atomic absorption spectrometry. *Anal. Chem.*, 54:149-151.
- **RUKSAN, B.** 1985. Mapa de microelementos en forrajes de Argentina. *Rev. Arg. Prod. Anim.*, 4, Sup. 3:89-98.
- **STUFFINS, C.B.** 1967. The determination of phosphate and calcium in feeding stuffs. *Analyst*, 92:107-111.
- **TUSL, J.** 1972. Spectrophotometric determination phosphorus in biological samples after dry ashing without reagents. *Analyst*, 97:111-113.