



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Aplicación de la determinación de proteínas de un alimento por el método Kjeldahl. Valoración con una base fuerte.

Apellidos, nombre	García Martínez, Eva (evgamar@tal.upv.es) Fernández Segovia, Isabel (isferse1@tal.upv.es) Fuentes López, Ana (anfuelo@upvnet.upv.es)
Departamento	Departamento de Tecnología de Alimentos
Centro	ETSIAMN. Universidad Politécnica de Valencia



1 Resumen de las ideas clave

El contenido proteínico de los alimentos puede determinarse por medio de diversos métodos. El método Kjeldahl se basa en la determinación del nitrógeno. La determinación del contenido de nitrógeno en muestras de naturaleza orgánica es importante en muchos campos de análisis, como los relacionados con las industrias agroalimentaria o farmacológica o con el medio ambiente, entre otros. En este artículo se describe el fundamento del método Kjeldahl, recogiendo el nitrógeno sobre ácido clorhídrico o sulfúrico y valorándolo con hidróxido sódico. También se explican los cálculos necesarios para obtener el porcentaje de proteínas de un alimento a partir del valor del contenido en nitrógeno obtenido.

2 Introducción

El contenido proteínico de los alimentos puede determinarse por medio de diversos métodos. La forma más habitual es su cuantificación de forma indirecta y aproximada, bien a partir del contenido en nitrógeno de la muestra, o bien deduciendo su cantidad a partir del contenido de uno o dos aminoácidos particulares que conforman la proteína, fáciles de identificar y de cuantificar por su reactividad química específica. Este segundo procedimiento conlleva una mayor inexactitud. Desde hace más de 100 años se está utilizando el método Kjeldahl para la determinación del nitrógeno en una amplia gama de muestras (alimentos y bebidas, piensos, forrajes, fertilizantes) para el cálculo del contenido en proteína. También se utiliza el método Kjeldahl para la determinación de nitrógeno en aguas residuales y suelos. Es un método oficial descrito en múltiples normativas: AOAC, US-EPA, ISO, Farmacopeas y distintas Directivas Comunitarias. La convención general, sobreentendida, es que la totalidad del nitrógeno de la muestra está en forma proteica, aún cuando la realidad es que, según la naturaleza del producto, una fracción considerable del nitrógeno procede de otros compuestos nitrogenados (bases púricas y pirimidínicas, creatina y creatinina, urea, amoníaco, etc.), por ello se denomina "proteína bruta" o "proteína total" a la obtenida por este método. Con este análisis, sin embargo, no se determina el nitrógeno nítrico, el cianhídrico, el de la hidracina, el de grupos azo y el nitrógeno de un núcleo cíclico.

3 Objetivos

Con la redacción de este artículo docente se persigue que los alumnos adquieran la capacidad de:

- Comprender los fundamentos del método Kjeldahl para la determinación del contenido en proteína de un alimento.
- Poner en práctica el procedimiento experimental del análisis de proteínas por el método de Kjeldahl, recogiendo el nitrógeno sobre ácido clorhídrico o sulfúrico y valorándolo con hidróxido sódico.



- Calcular el porcentaje de proteína de un alimento a partir del contenido de nitrógeno obtenido por el método Kjeldahl.

4 Desarrollo

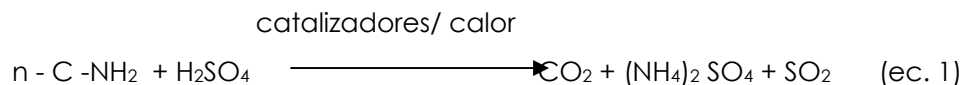
A continuación pasamos a describir el fundamento del método Kjeldahl y las etapas que los constituyen. Después, se describirá el procedimiento experimental y los cálculos implicados. Para finalizar se expondrá un ejemplo práctico real.

4.1 Fundamentos del método y etapas

El método Kjeldahl mide el contenido en nitrógeno de una muestra. El contenido en proteína se puede calcular seguidamente, presuponiendo una proporción entre la proteína y el nitrógeno para el alimento específico que está siendo analizando, tal y como explicaremos más adelante.

Este método puede ser dividido, básicamente en 3 etapas: digestión o mineralización, destilación y valoración. El procedimiento a seguir es diferente en función de si en la etapa de destilación el nitrógeno liberado es recogido sobre un exceso conocido de ácido clorhídrico o sulfúrico patrón o sobre una disolución de ácido bórico. Ello condicionará la forma de realizar la siguiente etapa de valoración, así como los reactivos empleados. En este artículo docente se explica el primer procedimiento, cuando el nitrógeno se atrapa sobre ácido clorhídrico o sulfúrico.

- (a) Etapa de digestión: un tratamiento con ácido sulfúrico concentrado, en presencia de un catalizador y ebullición convierte el nitrógeno orgánico en ión amonio, según la ecuación 1.



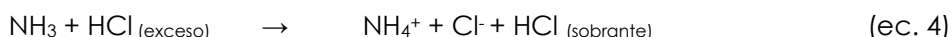
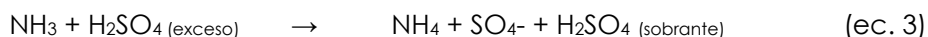
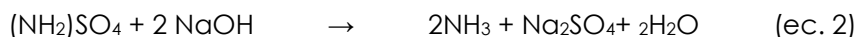
Procedimiento: Se introducen de 1 a 5 g de muestra un tubo de mineralización y se ponen 3 g de catalizador que suele estar constituido por una mezcla de sales de cobre, óxido de titanio o/y óxido de selenio. De forma habitual se utiliza como catalizador una mezcla de K_2SO_4 : $CuSO_4$: Se (10:1:0,1 en peso). Después se adicionan 10 mL de H_2SO_4 concentrado y 5 mL de H_2O_2 . Posteriormente se digiere a 420 °C durante un tiempo que depende de la cantidad y tipo de muestra. Se sabe que la digestión ha terminado porque la disolución adquiere un color verde esmeralda característico.

El nitrógeno proteico es transformado en sulfato de amonio por acción del ácido sulfúrico en caliente. En la actualidad, para llevar a cabo este proceso se utilizan digestores automáticos que son capaces de digerir un número determinado de muestras al mismo tiempo (imagen 1).



Imagen 1. Unidad de digestión

- (b) Etapa de destilación (imagen 2): se alcaliniza la muestra digerida y el nitrógeno se desprende en forma de amoníaco (ecuación 2). El amoníaco destilado se recoge sobre un exceso conocido de ácido clorhídrico (ecuación 3) o sulfúrico (ecuación 4).



Procedimiento: Después de enfriar se adicionan al tubo de digestión 50 mL de agua destilada, se pone en el soporte del destilador y se adiciona una cantidad suficiente de hidróxido sódico 10 N, en cantidad suficiente (50 mL aprox.) para alcalinizar fuertemente el medio y así desplazar el amoníaco de las sales amónicas. El amoníaco liberado es arrastrado por el vapor de agua inyectado en el contenido del tubo durante la destilación, y se recoge sobre un exceso de una disolución valorada de ácido clorhídrico o sulfúrico.



Imagen 2. Unidad de destilación

- (c) Etapa de valoración:

La cuantificación del nitrógeno amoniacal se realiza por medio de una volumetría ácido-base usando como indicador una disolución alcohólica de una mezcla de rojo de metilo y azul de metileno. Se valora el ácido sulfúrico o



clorhídrico sobrante con una disolución de hidróxido sódico valorada (ecuación 5 y 6, respectivamente).



4.2 Cálculos

De la valoración se puede calcular el número de equivalentes de nitrógeno recogidos, y con éste dato se obtiene el porcentaje de nitrógeno en la muestra. Para calcular el porcentaje de proteína basta con multiplicar por un factor de conversión el % de nitrógeno calculado. Este factor de conversión está tabulado para cada grupo de alimentos. En la tabla 1 se recogen los factores para algunos alimentos.

Alimentos	Factor
Harina de trigo	5,70
Trigo, centeno, cebada	5,83
Arroz	5,95
Cacahuetes	5,46
Almendras	5,18
Soja	5,71
Semillas oleaginosas	5,30
Leche y derivados	6,38
Carne y derivados	6,25
Clara de huevo	6,70
Yema de huevo	6,62
Huevo entero	6,68
Gelatina	5,55
Vegetales	6,25

Tabla 1. Factor de conversión para obtener la tasa de proteína bruta a partir del nitrógeno total.



4.3 Ejemplo resuelto

Se analizó por el método Kjeldahl una muestra de 7.121 g de harina de trigo. El amoníaco que se formó por la adición de una base concentrada, después de la digestión con H_2SO_4 , se destiló sobre 25 mL de HCl 0.4977 N. El exceso de HCl se tituló por retroceso con 3.97 mL de NaOH 0.4012 N. Calcular el porcentaje de proteína de la harina.

- Equivalentes de HCl _{exceso} : $25 \times 10^{-3} \text{ L HCl} \times 0.4977 \text{ N HCl} = 12.443 \times 10^{-3}$
- Equivalentes de HCl _{sobrante} = equivalentes de NaOH: $3.97 \times 10^{-3} \text{ L NaOH} \times 0.4012 \text{ N NaOH} = 1.593 \times 10^{-3}$
- Equivalentes de N = Equivalentes de HCl _{reaccionan} = Equivalentes de HCl _{exceso} - Equivalentes de HCl _{sobrante} = $12.443 \times 10^{-3} - 1.593 \times 10^{-3} = 10.85$

$$g \text{ N} = (10.85 \text{ equiv N} \times 14 \text{ g/equiv}) = 0.77 \text{ g}$$

$$\% \text{ N} = (g \text{ N} / g \text{ muestra}) \times 100 = (0.77 \text{ g N} / 7.121 \text{ g muestra}) \times 100 = 10.81\%$$

Para pasar a contenido de proteínas corregir por el factor adecuado según la naturaleza de la muestra (para la harina de trigo = 5.70, tabla 1).

$$\% \text{ Proteínas} = 2.13\% \text{ N} \times 5.70 = 12.16\%$$

5 Cierre

A lo largo de este objeto de aprendizaje se ha descrito el método Kjeldahl para la determinación de proteínas de un alimento a partir de la cuantificación del nitrógeno, empleando ácido clorhídrico o sulfúrico como medio para atraparlo e hidróxido sódico para su valoración. Además se han expuesto los cálculos necesarios para obtener el porcentaje de proteína a partir del contenido en nitrógeno de la muestra y se ha ejemplificado el procedimiento con un caso real.

6 Bibliografía

[1] AOAC International: "Official Methods of Analysis". 17ªed. Gaithersburg, USA, 2000.

[2] Skoog, D.A.; West, D.M.: "Química analítica". 4ªed, McGraw-Hill, 1989, pág. 231.

[3] Adrian, J.; Potus, J.; Poiffait, A.; Dauvillier, P.: "Análisis nutricional de los alimentos", Ed. Acribia, 2000, pág. 41-43.



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

[4] Nielsen, S.: "Food Analysis", Ed. Kluwer Academic/Plenum Publ, 2003, pág. 131-142.

[5] García-Martínez, E.; Fernández-Segovia, I.: "Determinación de proteínas de un alimento por el método Kjeldahl. Valoración con un ácido fuerte", Ed. Universidad Politècnica de Valencia, 2013. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10251/16338>.