

DETERMINACION DE NITROGENO EN VARIAS FUENTES ALIMENTICIAS, UTILIZANDO LOS METODOS DE MACRO Y MICRO-KJELDAHL*

Javier Parrado**
Handal Dorsant
Aurora Cuesta
Max Alberto Laredo C.

1. RESUMEN

El estudio experimental se realizó en el Laboratorio de Nutrición Animal del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), situado en el Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Tibaitatá.

Se estudió la repetibilidad de los contenidos de nitrógeno de diferentes fuentes alimenticias, utilizando el método macro y micro-kjeldahl.

Se utilizaron alimentos de un amplio rango de contenido de nitrógeno. El método de determinación fue el descrito por la AOAC.

La variación en el contenido de nitrógeno en gramineas, leguminosas, oleaginosas, cereales, concentrado y productos de origen animal fue de 1, 1, 3, 1,1 y 1% respectivamente.

El coeficiente de variación fue bajo para todos los alimentos determinados, correspondiendo el más alto (7,47%) a los concentrados y el más bajo (0,15%) a productos de origen animal.

La cantidad de reactivos utilizados para el micro fue 10 veces menos que el macro, y el costo fue 8,85 veces menor que el macro. El manipuleo de muestras, cantidad, tiempo de digestión y destilación fue marcadamente menor con el método micro-kjeldahl.

2. INTRODUCCION

Las proteínas constituyen, junto con los carbohidratos y las grasas, los tres principales componentes orgánicos de la materia viva, y están formadas principalmente por carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno.

El nitrógeno representa, en la mayoría de las sustancias proteicas, un porcentaje relativamente constante (16%). Siendo entonces el nitrógeno el factor determinante del contenido de proteína, su determinación tiene una vital importancia en la calidad de un alimento.

Tradicionalmente se usa el método Kjeldahl para esta evaluación, el cual presenta las variantes macro, semi-micro y micro; el primero y el segundo, comparados con el micro, emplean grandes cantidades de reactivos y de muestra, de acuerdo con las técnicas estandarizadas y recomendadas por los métodos de análisis de la Asociación Oficial de Análisis Químicos (AOAC).

Por lo anterior, y debido a los elevados costos de los reactivos y a los problemas de toxicidades, se proyectó el estudio comparativo de dos métodos en diferentes grupos de alimentos.

Los objetivos fueron:

- Estandarizar, una vez realizado el estudio, el método micro-kjeldahl para la determinación de nitrógeno orgánico total.

Comparar los resultados de nitrógeno, obtenidos por los métodos macro y micro-kjeldahl.

- Evaluar el tiempo requerido para cada determinación y el costo de cada análisis.

3. REVISION DE LITERATURA

La determinación cuantitativa del nitrógeno orgánico total en alimentos y materiales biológicos esti-

* Contribución del Programa Nacional de Nutrición Animal, División de Ciencias Animales, Instituto Colombiano Agropecuario. ICA - Tibaitatá.

** Respectivamente: Técnicos Químicos, Escuela de Químicos Gran Colombiano; Bióloga M.S. Programa Nacional de Nutrición Animal; Ingeniero Agrónomo, Ph. D. Director Programa Nacional de Nutrición Animal. ICA - Tibaitatá. Apartado Aéreo 151123 Eldorado, Bogotá - Colombia.

ma el contenido de proteína total, la cual incluye polipéptidos, aminoácidos y otros componentes nitrogenados tales como ácidos nucleicos, carbohidratos, alcaloides, lípidos y pigmentos, las proteínas más deseadas en alimentos son las que suministran los llamados aminoácidos esenciales.

Las principales bases para la determinación del nitrógeno orgánico total en alimentos dependen de la completa conversión de sus formas nativas de nitrógeno, en nitrógeno gaseoso elemental o en una sal inorgánica de amonio y finalmente, la determinación precisa y exacta de uno u otro de estos productos.

Tres métodos principales han sido desarrollados para la determinación cuantitativa de nitrógeno gaseoso o amoniacal: (6).

- El método de Dumas (1931), introducido en Francia.
- El método de Kjeldahl (1893), desarrollado en Dinamarca.
- El método de Ter Menlen's (1924), diseñado en Holanda.

El método de Kjeldahl, descrito y recomendado en los métodos de análisis de la Asociación Oficial de Análisis Químicos (AOAC), tiene características de sencillez, exactitud y reproducibilidad que lo han hecho el preferido para determinar el nitrógeno en compuestos biológicamente importantes y escogido para el chequeo y comprobación de resultados obtenidos por otros métodos.

El principio del método ha sido descrito en detalle por muchos autores (3, 2). Un factor muy importante en estas determinaciones es la cantidad de ácido, que varía de 7,3 g. para 1 g. de carbohidrato a 17,8 g. de grasa. 6,7 g. del ácido van a formar el sulfato ácido con 10 g. de potasio (4).

La adición de sal en la digestión eleva el punto de ebullición del ácido sulfúrico en la mezcla, dando una mejor conversión del nitrógeno orgánico a amoníaco (3, 6).

La presencia de catalizador acelera la descomposición de la muestra y permite la recuperación cuantitativa del nitrógeno a bajas temperaturas. El óxido de mercurio es el catalizador más conocido y usado para la digestión de proteínas (4, 2, 5), aunque hay otros tipos de catalizadores tales como selenio (3, 8, 5), óxido de selenio, selenato de sodio, oxiclórico de selenio, telurio, sulfato de cobre (3), dióxido titanio (5), que también han demostrado ser efectivos. Sin embargo, Willys *et al.* (11) consideran que el uso de Selenio como catalizador puede causar pérdidas de nitrógeno.

Ogg *et al.* (9), trabajando con diferentes sales y tiempos de digestión en los métodos macro y micro-kjeldahl demuestran la estrecha relación entre la cantidad de sal añadida y el nitrógeno recuperado, los cuales a su vez están relacionados inversamente con la temperatura de digestión.

Willys *et al.* (12) encontraron que el método micro-kjeldahl es tan preciso como el micro-kjeldahl, aunque recomiendan precaución en su uso cuando se trata de compuestos nitrogenados del tipo N-N, NO y NO₂

Estos mismos autores, estudiando el efecto de diferentes factores sobre el contenido de nitrógeno en bencil-iso-tiourea, encontraron valores semejantes por el método micro y semimicro (13,81% vs. 13,76%. En este mismo trabajo muestran que la digestión de 30 minutos proporciona valores semejantes a la digestión en una hora (13,73% vs. 13,80%) (11).

Ogg (10) introdujo algunas modificaciones al sistema micro-kjeldahl con el objeto de hacerlo aplicable a un amplio rango de compuestos nitrogenados, especialmente aquellos que no tienen y tiene ligaduras N-N o N-O. Los rendimientos muestran una gran confiabilidad (desviación estándar = 0,03%).

4. MATERIALES Y METODOS

El estudio experimental se realizó en el Laboratorio Nacional de Nutrición Animal del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), situado en el Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias de Tibaitá (Mosquera).

La selección de material se hizo teniendo en cuenta que los grupos fueran representativos de los alimentos usados para la nutrición de las diferentes especies animales tales como aves, cerdos, ganado de leche, ganado de carne, ovinos y especies menores (Tabla 1).

Para los materiales con alto contenido de agua se hizo un secado previo a 60°C hasta peso constante.

Una vez obtenida por cuarteo una muestra representativa del material total, se procedió a prepararlo para los respectivos análisis químicos.

Se tomó la porción de cada una de las muestras y se molió hasta que el 95% de la misma pasó a través de un tamiz de 1 mm de malla; lo retenido en el tamiz se incorporó y homogenizó y se guardó en frascos de vidrio.

Con 24 horas de anticipación al análisis se tomó una porción de esta muestra en cápsula de aluminio y se hizo un secado de 60°C para eliminar la humedad restante y obtener materia seca.

El proceso seguido fue el recomendado por AOAC (1), lo mismo que los reactivos usados y su concentración.

4.1. PROCEDIMIENTO MACRO-KJELDAHL

Se pesó exactamente en balones Kjeldahl para digestión de 800 ml de capacidad 1.0 gramos de muestra sobre un papel de filtro Whatman número 1, se adicionaron 16 gramos de catalizador y 25 ml de ácido sulfúrico concentrado. Se dejaron transcurrir 30 minutos después de que la solución se aclaró. Una vez fría la solución, se añadieron 400 ml. de agua destilada antes de que las sales se precipitaran.

TABLA 1. Nombres comunes y científicos por Grupos de Alimentos usados en Nutrición Animal.

Grupo	Nombre Común	Nombre Científico
Cereales	Arroz: salvado de Arroz: harina de Sorgo molido	<i>Oriza sativa</i> <i>Oriza sativa</i> <i>Sorghum vulgare</i> , Pers.
Leguminosas	Alfalfa Kudzú	<i>Medicago sativa</i> <i>Pueraria phaseoloides</i>
Gramíneas	Raigrás tetrelite Raigrás manawa Kikuyo Braquiaria Carimagua-1 (rojo) Carimagua-1 (verde)	<i>Lolium hybridum</i> <i>Lolium multiflorum</i> <i>Pennisetum clandestinum</i> <i>Brachiaria decumbens</i> <i>Andropogon gayanus</i> <i>Andropogon gayanus</i>
Oleaginosas	Algodón: torta de Ajonjolí: torta de Soya: torta de	<i>Gossypium Spp.</i> <i>Sesamun indicum</i> <i>Glicine max.</i> L.
Concentrados	Cerdos cría Pollos crecimiento Ganado de leche	
Productos de origen animal	Carne, harina de Pescado, harina de	

En un erlemeyer de 500 ml se depositaron 50 ml de la solución de ácido bórico. Se añadió a los balones Kjeldahl una granalla de zinc y 75 ml de la solución de hidróxido de sodio, teniendo cuidado de agregarle lentamente por el cuello del balón. Se recogieron aproximadamente 250 ml de destilado. Se tituló la solución con ácido clorhídrico estandar hasta obtener un cambio de color azul a rosado.

4.2. PROCEDIMIENTO MICRO KJELDAHL

El peso de la muestra osciló entre 50 a 100 mg, según el contenido de nitrógeno. La muestra exactamente pesada se introdujo cuantitativamente en balón micro-kjeldahl de 50 ml de capacidad, se adicionaron 1,6 gramos de catalizador y 2,5 ml de ácido sulfúrico concentrado. Después de aclarar la solución se continuó durante 15 minutos más de digestión.

Una vez fría la solución, se adicionaron 30 ml de agua destilada. Se añadieron 5 ml de la solución de ácido bórico a erlemeyers de 50 ml de capacidad, para recibir el destilado. Se adicionaron a los balones kjeldahl una granalla de zinc y 8 ml de la solución de hidróxido de sodio. Se destilaron 25 ml de solución aproximadamente y se tituló con ácido clorhídrico estandar hasta el cambio del color azul al rosado.

4.3. BLANCO DE REACTIVOS

Para reducir la contaminación de nitrógeno proveniente de los reactivos, se elaboraron blancos, siguiendo los pasos de cada una de las técnicas.

Cálculos:

$$\% \text{ Nitrógeno total} = \frac{(V_1 - V_2) \times N \times 0,014 \times 100}{M}$$

En donde:

V_1 = Volumen de ácido gastado en la titulación de la muestra

V_2 = Volumen de ácido gastado en la titulación del blanco

N = Normalidad del ácido

0,014 = Peso de un miliequivalente de nitrógeno en gramos

M = Peso de la muestra en gramos

$\% \text{ Proteína total} = \% \text{ Nitrógeno total} \times 6,25$

6,25 = Factor que representa al 16% de nitrógeno de las proteínas

Se hicieron las pruebas de t de "student" y "F" para observar las variaciones entre promedios y homogeneidad de varianzas usando la prueba de Bartlett, respectivamente.

5. RESULTADOS Y DISCUSION

En la Tabla 2 se muestran los valores para nitrógeno y proteína, obtenidos con cada uno de los métodos ensayados. Allí mismo se ve que a pesar de tener diferentes alimentos cuyas riquezas de nitrógeno presentan variaciones grandes, no se encontraron diferencias significativas entre métodos; así por ejemplo, el pasto braquiaria que fue el que menor valor de nitrógeno presentó, no mostró variación entre las técnicas (0,78% vs. 0,80%). El más alto fue la harina de pescado que tampoco arrojó diferencias significativas (11,27% vs. 11,29%). Los anteriores resultados muestran que es posible utilizar el método micro-kjeldahl, con un gran margen de confiabilidad.

Observando los valores individuales de nitrógeno de los diferentes tipos de alimentos (Tabla 3 y Figura 1), se encuentra que la técnica de micro-kjeldahl permite obtener información válida sobre el contenido de proteína bruta de un rango muy amplio de fuentes nitrogenadas.

En la Tabla 4 se presenta la desviación estandar (D.S.) y pruebas de F y "t" en los distintos grupos.

En las pruebas de F y t para determinar la homogeneidad se observó que la F y la t presentan valores calculados menores que los tabulados, lo cual significa que las varianzas de las técnicas son tan homogéneas como los promedios de los mismos en los grupos de alimentos estudiados respectivamente.

El coeficiente de variación para cada grupo de alimentos fue bajo siendo el valor más alto para concen-

trados (7,47%) y el más bajo para los alimentos de origen animal (0,15%).

Es necesario enfatizar que el uso de los diferentes métodos técnicos en la determinación de nitrógeno dependen más de la preparación de las muestras (secado, molido, alícuota representativa de la muestra, etc.) antes que los métodos usados.

Este experimento muestra que teniendo cuidado con los puntos anteriores, se pueden obtener resultados confiables de nitrógeno de una gran gama de alimentos.

5.1. COSTOS DE ANALISIS

Para evaluar los costos involucrados en los análisis se tuvo en cuenta el promedio de reactivos gastados para la determinación en cada uno de los métodos empleados. En la Tabla 5 se muestran las cantidades de reactivos y el costo individual en la determinación macro.

La Tabla 6 presenta los reactivos y los precios para la determinación por el método micro. (\$11,70). En las Tablas 5 y 6 se muestra que con el costo del método macro-kjeldahl se pueden realizar aproximadamente 10 determinaciones micro. Lo anterior no solo significa una gran economía, sino una gran facilidad en la manipulación de equipos y reactivos, y lo que es más importante, se reduce drásticamente el efecto contaminante del catalizador usado en estos métodos.

TABLA 2. Valores de nitrógeno y proteína en las muestras analizadas Base seca. Tibaitatá, 1971.

Muestra	Macro		Micro	
	Nitrógeno %	Proteína %	Nitrógeno %	Proteína %
Harina de arroz	2,69	16,84	2,72	17,00
Salvado de arroz	0,99	6,19	0,98	6,17
Sorgo molido	1,31	8,24	1,35	8,47
Alfalfa	6,00	37,55	5,94	37,14
Kudzu	3,32	20,79	3,30	20,66
Carimagua-1 (rojo)	1,03	6,45	0,95	5,95
Carimagua-1 (verde)	1,37	88,57	1,31	8,22
Brachiaria	0,78	4,93	0,80	5,00
Raygrass (30 días)	5,09	31,86	4,74	29,66
Raygrass (40 días)	3,64	22,78	3,55	22,19
Kikuyo (35 días)	3,93	24,59	3,96	24,77
Torta de algodón	7,61	47,59	7,70	48,12
Torta de ajonjolí	8,05	50,32	7,87	49,22
Torta de soya	8,27	51,69	8,28	51,75
Cría de cerdos (concentrado)	2,54	15,93	2,47	15,49
Ganado de leche (concentrado)	3,21	20,09	3,35	20,94
Pollos crecimiento (concentrado)	2,73	17,11	2,75	17,19
Harina de carne	10,15	63,47	10,10	63,17
Harina de pescado	11,27	70,44	11,19	69,97

TABLA 3. Valores Medios de nitrógeno y proteína en los Grupos de Alimentos. Tibaitatá, 1981.

Grupos de Alimentos	Macro		Micro		V %
	Nitrógeno %	Proteína %	Nitrógeno %	Proteína %	
Cereales	1,66	10,42	1,68	10,97	1
Concentrados	2,83	17,71	2,86	18,28	1
Gramíneas	2,64	16,50	2,55	15,96	3
Leguminosas	4,66	29,12	4,62	28,87	1
Oleaginosas	7,97	49,87	7,95	49,69	1
Productos de origen animal	10,71	66,96	10,65	66,57	1

* Promedios de tres determinaciones.

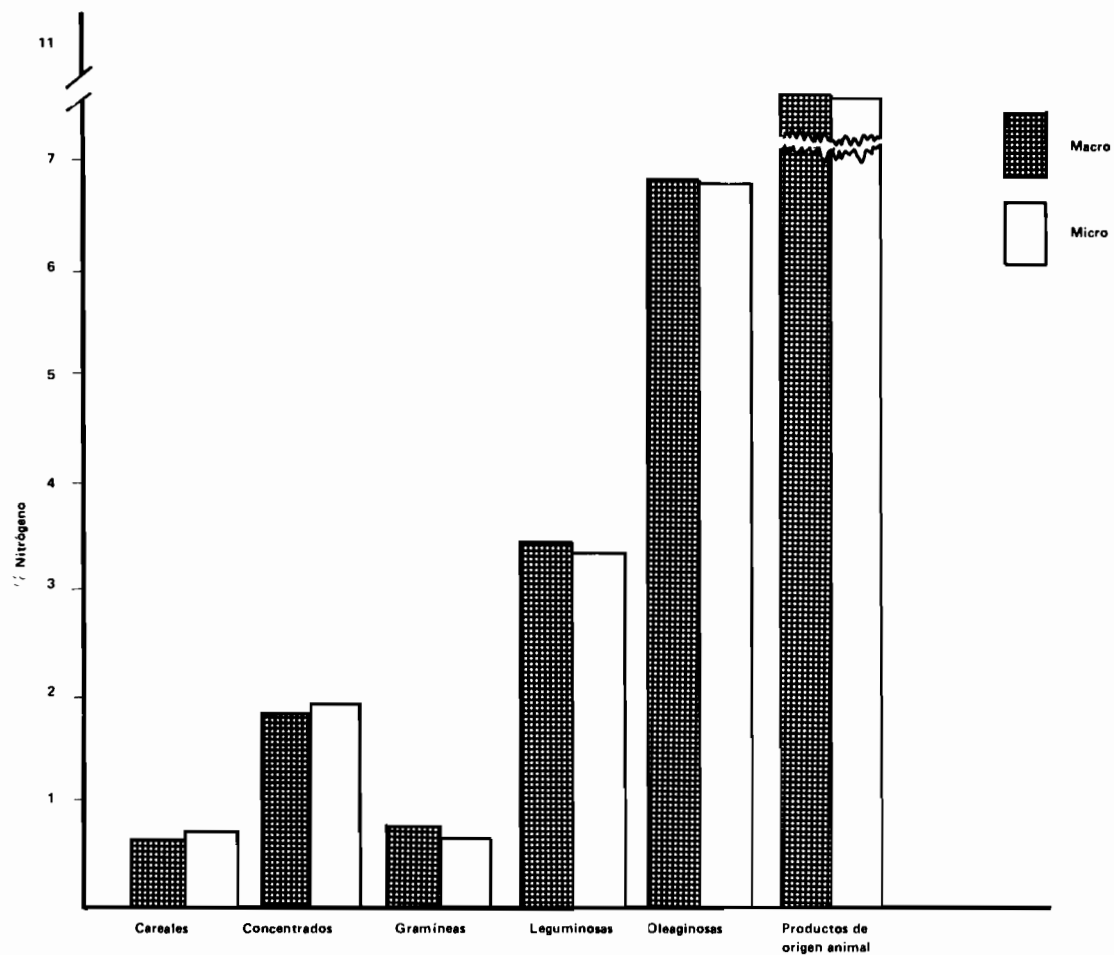


FIGURA 1. Comparación de los contenidos de nitrógeno por los métodos macro y micro Kjeldahl.

TABLA 4. Desviación estándar y valores de F y t en grupos de alimentos.

Grupo de Alimentos	Desviación estándar			Valores			
	Macro	Micro	C.V. %	F		t	
				Cal	Tab.	Cal.	Tab.
Cereales	1,81	0,92	7,29	1,29	9,28	0,10	3,18
Concentrados	0,31	0,50	7,47	2,64	9,28	0,22	3,18
Gramíneas	1,35	1,40	3,36	1,08	6,39	0,20	2,78
Leguminosas	1,16	1,18	3,77	1,01	6,39	0,20	2,78
Oleaginosas	0,30	0,27	1,69	0,79	9,28	0,10	3,18
Productos de origen animal	0,64	0,63	0,15	0,96	19,00	0,10	4,30

TABLA 5. Costo de reactivos para la determinación macro-kjeldahl.

Reactivos	Cantidad	Valor* \$
Oxido de mercurio rojo	1,045 g	17,60
Sulfato de potasio	14,95 g	13,96
Acido sulfúrico	25 cc	27,47
Hidróxido de sodio	45 g	32,80
Acido bórico	2 g	4,56
Tiosulfato de sodio	6 g	4,18
Zinc metálico	0,4295 g	1,57
Indicador mixto	trazas	1,15
Acido clorhídrico 37%	0,36 ml	0,28
TOTAL		103,57

* Tomado del catálogo de precios de la Merck, 1980.

TABLA 6. Costos de reactivos para la determinación de micro-kjeldahl.

Reactivos	Cantidad	Valor \$
Oxido de mercurio rojo	0,105 g.	1,76
Sulfato de potasio	1,50 g.	1,40
Acido sulfúrico concentrado	2,5 c.c.	2,44
Hidróxido de sodio	4,8 g.	3,49
Acido bórico	2,0 g.	0,45
Tiosulfato de sodio	0,64 g.	0,44
Zinc metálico	0,4295 g.	1,57
Indicador mixto	trazas	0,12
Acido clorhídrico 37%	0,04 ml.	0,03
Total:		11,70

6. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos se puede concluir:

- No hubo diferencia significativa entre los métodos en ninguno de los grupos de alimentos, lo cual garantiza la eficiencia de las determinaciones.
- De acuerdo con los procedimientos para cada uno de los métodos, la economía de tiempo para la determinación fue de 60 minutos por muestra, comparado con el macro-kjeldahl.
- El costo para la determinación de nitrógeno por el método micro-kjeldahl fue de 8,85 veces menor, en comparación con el macro-kjeldahl (\$103,57 vs. 11,70).
- Debido a las pequeñas cantidades de óxido de mercurio usadas en el método micro-kjeldahl, los efectos contaminantes se reducen drásticamente.

7. SUMMARY

Macro and micro-kjeldahl techniques for nitrogen determination in several foodstuffs.

The experiment was carried out in the Animal Nutrition Laboratory at the Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), situated at the National Research Center, Tibaitatá.

Was studied the repetibility of the micro and macro kjeldahl techniques in nitrogen determinations in different foods. Foods with wide range of nitrogen content was used.

The variations of nitrogen content in grasses, legumes, oleaginous, cereals, concentrates and animal products were: 1, 1, 3, 1, and 1% respectively. The variation coefficient was low in all the foods, the concentrates showed the highest values (7,47%) and the animal food the lowest values (0,15%).

The chemical, used in micro kjeldahl determinations was 10 times less when was compared with the macro kjeldahl determination and the cost was 8,85 times less than the macro system. Finally the time spend on digestion, destillation was drastically less using the micro kjeldahl technique.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. ASSOCIATION OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 14 th. Washington D.C. 1975. 904 p.
2. BLAEDEL, W. J. and MELOCHE, V. W. Elementary Quantitative Analysis. 2th. ed. Harper and Row. New York. 1970.
3. JACOBS, S. The Determination of Nitrogen in Biological Materials. Methods of Biological Analysis. 13:241-263. 1967.
4. KIRK, P. L. Kjeldahl Method for total Nitrogen. Analytical Chemistry. 22(2):354-358. 1950.
5. LAREDO, M.A. y S. H. Torres. Efecto del catalizador en la determinación de nitrógeno en material vegetal. Revista ICA. 14(4):215-220. 1979.
6. LILLEVICK, H. A. The determination of total organic Nitrogen. In: MAYNARD, A. J. Methods in Food Analysis. 1970. p. 601-615.
7. LITTLE, J. M. y HILLS, J. Métodos Estadísticos para la Investigación en la Agricultura. Trillas S.A. México. 1978. 270 p.
8. MARSHALL, M. C. and WALKER, A. F. Comparison of Short Method for Kjeldahl Digestion Using a trace of selenium as catalyst, with other Methods. Journal Science Food Agricultural. 1978. Tomo 29. p. 940-942.
9. OGG, C. L. and WILLITS, C. O. Boiling Temperatures of Kjeldahl digestion mixtures. Journal of the Association Official Agricultural Chemist. 33(1):100-103. 1950.
10. OGG, C. L. Determinations of Nitrogen by the micro-kjeldahl method. Journal of the Association Official Agricultural Chemists. 43(3):689-693. 1960.
11. WILLITS, C.O.; COE, M.R. and OGG, C.L. Kjeldahl determination of nitrogen in refractory materials. Journal of the AOAC. 32(1). 118-126. 1949.
12. WILLITS, C.O. and OGG, C.L. Report on standardization of microchemical methods micro-kjeldahl nitrogen determination. Journal of the AOAC. 33(2). 1950.
13. WILLITS, C.O. and OGG, C.L. Report on standardization of microchemical methods micro-kjeldahl determination of nitrogen. Journal of the AOAC. 34(3). 607-620. 1951.