



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DEL ESTADO DE HIDALGO**

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

**CORRELACIÓN DEL MÉTODO KJELDAHL
CON EL MÉTODO DE COMBUSTIÓN
DUMAS AUTOMATIZADO PARA
DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA EN
ALIMENTOS**

T É S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN QUÍMICA EN ALIMENTOS**

PRESENTA:

Ana Laura Cruz Lugo

ASESORES:

**DRA. EVA MARÍA SANTOS LÓPEZ
DRA. ALMA DELIA ROMÁN GUTIÉRREZ**

QA
QUÍMICA EN ALIMENTOS

PACHUCA DE SOTO, HIDALGO, 2007.



QA

QUÍMICA EN ALIMENTOS

El presente trabajo se publicó en el siguiente foro científico:

VIII Congreso Nacional de Ciencia de Alimentos y IV Foro de Ciencia y Tecnología de Alimentos llevado a cabo los días 1 y 2 de Junio del 2006, expuesto en la sesión de trabajos libres en la modalidad cartel con el título: **“Correlación del método Kjeldahl tradicional con el método Dumas automatizado para la determinación de proteína en granos”**



El presente trabajo se realizó en las instalaciones del Centro de Investigaciones Químicas (CIQ) de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

A mis padres y hermanos . . .

Hay hombres que luchan un día y son buenos. Hay otros que luchan un año y son mejores. Hay quienes luchan muchos años, y son muy buenos. Pero hay los que luchan toda la vida, esos son los imprescindibles... Bertolt Brecht.

Gracias papá por tu confianza y por darme los valores más importantes de la vida: trabajo y honradez. Gracias por ayudarme a alcanzar este sueño y por darme la fortaleza en esos momentos difíciles.

Mamá, gracias por tu apoyo, por tus consejos, por tu confianza, por tu sacrificio, por tu compañía y tus enseñanzas, pero sobre todo, gracias... por ser mi mamá.

Omar, gracias por tu compañía, por tu nobleza y tu sinceridad por ser cómplice y confidente, gracias por ser como eres.

Víctor gracias por tu apoyo incondicional por estar ahí aún en los momentos más difíciles, por tu paciencia y por todos estos años juntos.

Alí por una de las enseñanzas más grandes: enfrentar la adversidad con optimismo... me contagias día a día tus ganas de vivir y tu alegría, cuando miro tus ojos y tu sonrisa mi mundo se ilumina, eres el regalo más bello que la vida me ha dado.

Alejandro y Miguel, gracias, por enseñarme el valor de confianza y fortaleza.

A Dios por todas las bendiciones recibidas y por darme la familia a la que pertenezco

Agradezco a la Dra. Eva María Santos López, por haber compartido una parte de su conocimiento y tiempo conmigo, por los desayunos y las pláticas, por los consejos y por siempre estar ahí cuando surgía alguna duda.

Dra. Alma Delia Román Gutiérrez, gracias por todo su apoyo y consejos, por su paciencia y por su tiempo.

Agradezco a los miembros del jurado: Dra. Armida Zúñiga Estrada, Dr. Ernesto Alanís García, Dr. Otilio Arturo Acevedo Sandoval, M. en C. Iraís Sánchez Ortega y Q. A. Israel Oswaldo Ocampo Salinas.

Agradecimiento especial al Biol. Enrique Cruz Chávez y ala Quím. Cliseria Martínez Sánchez por el apoyo recibido en la parte experimental.

Ana Karina y Haydee, gracias por todos los momentos gratos y no gratos, pero sobre todo gracias ser mis amigas

Gracias a todos mis compañeros de generación y a todos mis catedráticos por recorrer este camino juntos.

ÍNDICE

ÍNDICE	i
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Definición y clasificación de proteínas	3
2.1.1 Clasificación según su función biológica	4
2.1.2 Clasificación según sus productos de hidrólisis	7
2.2 Aminoácidos	8
2.3 Enlace peptídico	11
2.4 Estructura proteínica	13
2.4.1 Estructura primaria	13
2.4.2 Estructura secundaria	14
2.4.2.1 Conformación α hélice	15
2.4.2.2 Conformación hoja plegada β	16
2.4.3 Estructura terciaria	17
2.4.4 Estructura cuaternaria	20
2.4.5 Estructuras supramoleculares	21
2.5 Desnaturalización de proteínas	21
2.6 Agentes desnaturalizantes	23
2.6.1 Efecto de la polaridad del disolvente	23
2.6.2 Efecto de la fuerza iónica	23
2.6.3 Efecto del pH	24
2.6.4 Efecto de la temperatura	24
2.7 Calidad nutricional de las proteínas	25
2.8 Valor biológico de las proteínas	28
2.9 Valor proteico de los alimentos	29
2.10 Balance de nitrógeno	31
2.11 Efecto de la deficiencia de proteína	33
2.12 Determinación analítica de las proteínas	34
2.12.1 Método Dumas	37
2.12.2 Método Kjeldahl	38
2.13 Teoría de operación del determinador de nitrógeno/proteína	42

LECO FP-528®.	
2.13.1 Pesada	43
2.13.2 Ciclo de análisis	44
2.13.3 Informe de resultado	47
2.14 Características de equipo LECO FP-528	48
3. OBJETIVOS	49
4. MATERIALES Y MÉTODOS	51
4.1 Equipo	51
4.2 Reactivos	52
4.3 Muestreo	53
4.4 Determinación de nitrógeno y proteína por el método Kjeldahl	57
4.4.1 Digestión	57
4.4.2 Destilación	60
4.4.3 Titulación	61
4.5 Determinación de nitrógeno y proteína por medio del método Dumas automatizado	65
4.6 Análisis estadístico	69
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	71
5.1 Legumbres y cereales	71
5.2 Productos lácteos	77
5.3 Productos cárnicos	81
5.4 Comparación de métodos	84
6. CONCLUSIONES	93
7. BIBLIOGRAFIA	95

1. INTRODUCCIÓN

El alimento es la sustancia normalmente ingerida por seres vivos. El término alimento incluye también bebidas líquidas. La comida es la principal fuente de energía y nutrición de animales, y es generalmente de origen animal o vegetal.

Los macronutrientes son nutrientes que aportan la energía necesaria para la supervivencia de un organismo. Existen tres categorías de macronutrientes: Carbohidratos, proteínas y grasas. Conocer la cantidad de estos tres componentes, así como de otros como sales minerales y humedad determinar la cantidad y proporciones de estos compuestos es básico para conocer que tan nutritivo es un alimento. A dicha determinación se le denomina análisis proximal.

La determinación de proteína total es una de las fases esenciales del análisis proximal de alimentos debido a su importancia tanto fisiológica como de composición. El método Kjeldahl actualmente sigue siendo la técnica más utilizado para la determinación de nitrógeno orgánico. Como consecuencia, los resultados obtenidos por Kjeldahl se han utilizado para calibrar métodos automáticos. Otro método para la determinación de proteína bruta es el método de análisis por combustión o método Dumas, basado en la conversión de los gases de combustión. La compañía LECO (St. Joseph, Michigan) tiene en el mercado el analizador de nitrógeno/proteína FP-528 que cuantifica el nitrógeno de forma sistematizada y automatizada basándose en el método de combustión Dumas (AOAC 990.03).

Debido a la necesidad de incrementar la velocidad de los análisis que se llevan a cabo en los alimentos, se ha optado por introducir el uso de este equipo en los análisis rutinarios del Centro de Investigaciones Químicas (CIQ) en la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, por ello, es importante conocer el nivel de correlación existente entre el uso de dicho equipo y el método Kjeldahl.

En el presente trabajo se analizaron cuatro grupos de alimentos de distintos porcentajes de proteína. Los resultados obtenidos, nos darán la pauta para comparar y decidir qué método aplicar a cada muestra, tomando en cuenta que el uso de cualquier método nos proporcione los datos correctos.

2. ANTECEDENTES

El término proteína fue utilizado por primera vez por el químico alemán Gerardus Johannes Mulder, en 1838, para nombrar a un grupo específico de sustancias muy abundantes en todas las plantas y animales. Mulder pronosticó correctamente la importancia de las proteínas; tomó este nombre del vocablo griego *proteios* que significa primordial o de nivel primario (Boyer, 2000).

2.1. DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Las proteínas son macromoléculas complejas que pueden constituir el 50% o más del peso seco de las células vivas y tienen un papel fundamental en la estructura y función de las mismas.

La masa molar de las proteínas varía de unos 5,000 a varios millones de Daltons y están constituidas de carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno y algunas veces por azufre. Son base de los procesos fisiológicos celulares ya que a partir de ellas se regulan la mayoría de los procesos metabólicos (Boyer, 2000).

Las proteínas se caracterizan por su función y mecanismo de acción, independientemente de sus propiedades generales, tales como tamaño, forma, comportamiento anfólico, solubilidad, etc. Dichas funciones dependen por completo de la secuencia de los aminoácidos que la componen y es definida para cada proteína.

Sí se cambiase un solo aminoácido de la secuencia, es considerablemente probable que la proteína pierda actividad biológica, dicha secuencia aminoacídica en las proteínas está definida por una secuencia de bases en el ADN que forma los genes (Bohinski, 1991).

Los aminoácidos se unen entre sí a través de un único tipo de enlace, el *enlace peptídico*. Al formarse las uniones peptídicas la mayor parte de los grupos ionizables de los aminoácidos se neutralizan entre sí lo que confiere a la molécula en general propiedades anfólicas (Boyer, 2000).

La solubilidad de las proteínas depende de las características estructurales y del medio en que se encuentran, a sí pues, ciertas proteínas de tipo fibroso son insolubles en agua y en los medios acuosos comunes en los seres vivos.

La mayoría de las proteínas son solubles en las condiciones de las células. La solubilidad es mínima en el punto isoelectrico y también depende de la fuerza iónica de la solución (Dominic *et* Wong, 1995).

2.1.1 Clasificación según su función biológica

Las proteínas se sintetizan en las células a partir del ARN (ácido ribonucleico) mensajero mediante procesos de transcripción.

El ARN mensajero y un ARN transferente unido a un aminoácido, forman las cadenas de proteínas constituidas por secuencia de aminoácidos, que determinan la estructura espacial tridimensional y por tanto, la actividad biológica de las proteínas, según Bohinski (1991) las proteínas se clasifican en:

- **Proteínas con actividad enzimática.**

Estas proteínas regulan todos los procesos metabólicos actuando como catalizadores de reacción, mediante la presencia de centros activos que permiten regular la mayoría de las reacciones bioquímicas. Ello hace que sean esenciales para los procesos de metabolización de hidratos de carbono, ácidos grasos y proteínas (Morrison *et* Boyd, 1998).

La existencia de un centro activo, hace que las moléculas orgánicas experimenten reacciones de descarboxilación, carboxilación, fosforilación, desaminación y esterificación.

- **Proteínas con actividad estructural**

Este tipo de proteínas determinan la estructura y actividad de músculos, piel, ojos, cornea, etc.

Las proteínas que forman parte del cabello (queratina), uñas, estructuras córneas, óseas o piel, determinan la forma física final de cada órgano, siendo el colágeno esencial para la estructura del manto hidrolipídico y la formación de las estructuras óseas.

Las proteínas también forman parte de las estructuras de las membranas celulares, las cuales, junto con los lípidos, establecen las condiciones de barrera de permeabilidad selectiva.

- **Proteínas con actividad inmune**

Un ejemplo claro de este tipo de proteínas son las inmunoglobulinas, que forman los anticuerpos en que se basan las defensas animales contra los microorganismos invasores.

- **Proteínas con actividad transportadora**

Las proteínas de este tipo tienen como actividad principal el facilitar la distribución en el organismo de elementos orgánicos, son esenciales para el transporte de ácidos grasos en forma de lipoproteínas y de elementos minerales.

Cuando algunas proteínas se encuentran unidas a un grupo hemo, en forma de hemoglobina y mioglobina, permiten el transporte y regulación de oxígeno a través del sistema circulatorio.

● **Proteínas con actividad regulatoria del sistema circulatorio**

Estas proteínas actúan como precursores de proteínas activas que realizan funciones esenciales en los procesos de coagulación. Para que la coagulación se lleve a cabo se producen agregados de fibrina que forman los coágulos e impiden la existencia de hemorragias.

La eficacia del proceso es consecuencia de un conjunto de reacciones incluyéndose procesos de síntesis proteolítica en donde la trombina es capaz de inducir su propia síntesis.

● **Proteínas con actividad hormonal**

Las proteínas con actividad hormonal regulan procesos fisiológicos esenciales, tales como funciones del sistema nervioso, actividad fisiológica sexual, reproducción celular o procesos glucémicos.

Como ejemplo de este tipo de proteínas, tenemos a la paratormona y calcitonina que regulan la actividad de las glándulas paratiroides y las células foliculares, las cuales a su vez controlan el metabolismo del calcio en el organismo.

Las principales hormonas de naturaleza proteica tienen un origen pancreático, tal es el caso de la síntesis de insulina y glucagón responsables de la regulación de los procesos glucémicos.

Existen glucoproteínas con función estimulante que actúan directamente sobre el timo y el tiroides y proteínas simples como prolactina y hormonas del crecimiento que determinan la evolución del organismo en las etapas de desarrollo.

● Proteínas con actividad nutritiva

Este grupo está constituido por aquéllas que tienen una función nutritiva, bien por transmisión de nutrientes como es la caseína de la leche en la lactancia, o por almacenamiento de nutrientes para ser utilizados por un embrión.

En el caso de las semillas de los vegetales o del huevo en las aves, las características físicas de la proteína tienen menor importancia que su composición química global.

2.1.2 Clasificación según los productos de hidrólisis

Según los productos que originan al hidrolizarse, las proteínas se dividen en dos grupos: las simples o naturales que, por hidrólisis, dan α -aminoácidos o derivados de éstos, y los proteídos, que, aparte de formar aminoácidos en la hidrólisis también se desdoblan a grupos no peptídicos llamados grupos prostéticos mostrados en la tabla 1.

Tabla 1. Clasificación de las proteínas según sus productos de hidrólisis (Cheftel *et al.*, 1989).

	Nombre	Grupo prostético
Proteínas simples	Albúminas	
	Globulinas	
	Escleroproteínas	
	Cromoproteídos	Componente de color
	Glucoproteínas	Carbohidrato
Proteídos	Metaloproteínas	Ión metálico
	Hemoproteínas	Grupo Hemo
	Flavoproteínas	Flavina
	Lipoproteínas	Lípido
	Fosfoproteídos	Fosfato
	Nucleoproteídos	Nucleótido

2.2 AMINOÁCIDOS

Las proteínas, al estar formadas por aminoácidos, hace que éstos sean esenciales para el organismo, ya que de sufrir una carencia representaría una alteración en los procesos de biosíntesis proteica y por lo tanto una serie de alteraciones fisiológicas.

Los aminoácidos que forman parte de las proteínas son un grupo que se limita a 20, de los cuales, ocho son esenciales: treonina, metionina, lisina, valina, triptófano, leucina, isoleucina, fenilalanina, hidroxiprolina e hidroxilisina (además puede añadirse la histidina como esencial durante el crecimiento, pero no para el adulto).

Se denominan esenciales debido a que el organismo humano no puede sintetizarlos por ello es necesario ingerirlos en la dieta, en forma de alimentos proteicos tales como: ovoproductos, carnes, pescados, lácteos, cereales y legumbres (Cheftel *et al.*, 1989).

Los aminoácidos son metabolizados y transformados en el organismo para facilitar su digestión, para ello, los procesos de digestión y absorción permiten que mediante la acción de enzimas proteolíticas las proteínas se hidrolicen liberando los aminoácidos que las forman y que estos se asimilen a través de las microvellosidades de las células intestinales. (Bohinski, 1991).

Las células intestinales, mediante aminopeptidasas, catalizan la hidrólisis de péptidos que contienen un pequeño número de aminoácidos, los cuales se hidrolizan en el citoplasma de la célula mediante la acción de peptidasas intracelulares.

Para que éste proceso aporte el máximo rendimiento, es necesario que exista una buena actividad hepática y pancreática así como digestiva. Ello facilita que el organismo asimile todo el conjunto de aminoácidos los cuales pasan al interior de la célula mediante diferentes mecanismos fisiológicos. (Dominic *et Wong*, 1995).

Los aminoácidos asimilados son transportados por el sistema circulatorio a los diferentes órganos y tejidos, en cuyas células se producen todo el conjunto reacciones metabólicas que conducen a la síntesis endógena de proteínas con actividad fisiológica, incluidas las enzimas y a la producción de energía.

Los aminoácidos son los elementos esenciales de anclaje para la formación de nuevas secuencias de proteínas las cuales, en función del perfil de aminoácidos que la formen, va a determinar su actividad biológica, siendo dicha síntesis, específica para cada molécula (Boyer, 2000).

Todos los aminoácidos presentes en las proteínas, excepto dos (prolina e hidroxiprolina), responden a la misma fórmula general (figura 1) en donde se observa que contienen por lo menos un grupo amino primario ($-\text{NH}_2$) y un grupo carboxílico ($-\text{COOH}$).

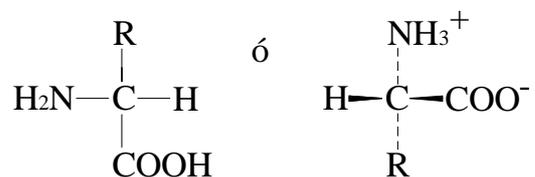
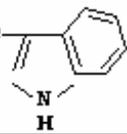
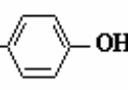
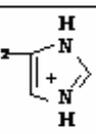
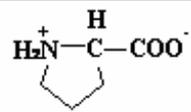
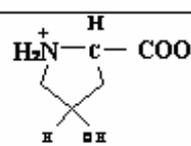


Figura 1. Fórmula general de los aminoácidos (Cheftel *et al.*, 1989).

La fórmula general muestra los grupos amino y carboxilo en sus estados ionizados, dando un ión anfótero, zwitterion, que es la forma prevalente a pH isoeléctrico (Morrison *et Boyd*, 1998).

La letra R representa una cadena lateral de composición variable que tiene influencia sobre el comportamiento fisicoquímico a nivel molecular además de ser característica para cada uno de los 20 aminoácidos (tabla 2).

Tabla 2. Cadenas laterales (R) de los aminoácidos (Cheftel et al., 1989).

ácido L - aspártico	$-\text{CH}_2\text{COO}^-$	L - arginina	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}(\text{H})-\text{C}(\text{NH}_2)=\text{NH}_2^+$
ácido L - glutámico	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-$	L - triptófano	$-\text{CH}_2-$ 
L - tirosina	$-\text{CH}_2-$ 	L - glicina	$-\text{H}$
L - cisteína	$-\text{CH}_2\text{SH}$	L - alaina	$-\text{CH}_3$
L - asparagina	$-\text{CH}_2\text{CONH}_2$	L - fenilalanina	$-\text{CH}_2-$ 
L - glutamina	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}_2$	L - valina	$-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$
L - serina	$-\text{CH}_2\text{OH}$	L - leucina	$-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$
L - treonina	$-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$	L - isoleucina	$-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$
L - histidina	$-\text{CH}_2-$ 	L - metionina	$-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_3$
L - lisina	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$	L - prolina	
L - hidroxilisina	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{NH}_3^+$	L - hidroxiprolina	

Como se puede observar los aminoácidos L-prolina y L-hidroxiprolina no son estrictamente aminoácidos, más bien, iminoácidos, puesto que su átomo de nitrógeno se encuentra unido a dos átomos de carbono, el segundo de los cuales es, de echo, el último de la cadena lateral que se ha plegado sobre sí mismo y se ha unido al nitrógeno para formar un anillo (Boyer, 2000).

El carbono central, al que se une la cadena lateral, el grupo carboxilo y el grupo amino se conoce como carbono α . Exceptuando a el aminoácido glicina, donde la cadena lateral es hidrógeno, los cuatro grupos unidos al carbono α son distintos entre sí, es decir, el carbono α está asimétricamente sustituido, lo cual significa que los aminoácidos poseen actividad óptica y por tanto la capacidad para desviar la luz polarizada dando lugar a la existencia de L- y D-aminoácidos.

En todos los seres vivos los aminoácidos presentes en las proteínas pertenecen a la serie L, sin embargo, en la naturaleza se pueden encontrar aminoácidos D, se hallan en la pared celular de las bacterias y en ciertos antibióticos (Morrison *et* Boyd, 1998).

2.3 ENLACE PEPTÍDICO

Como se mencionó anteriormente, los péptidos están formados por la unión de aminoácidos mediante un enlace peptídico (figura 2), enlace covalente que se establece entre el grupo carboxilo de un aminoácido y el grupo amino del siguiente, dando lugar al desprendimiento de una molécula de agua. Dicho enlace tiene un comportamiento similar al de un enlace doble, es decir, presenta una cierta rigidez que inmoviliza en un plano a los átomos que lo forman. (Boyer, 2000).

Si el número de aminoácidos que forman la molécula no es mayor de diez unidades, se denomina oligopéptido, si es mayor de diez unidades se denomina polipéptido, y si el número

de unidades es superior a cincuenta, se habla de ya de la formación de una proteína (Morrison *et Boyd*, 1998).

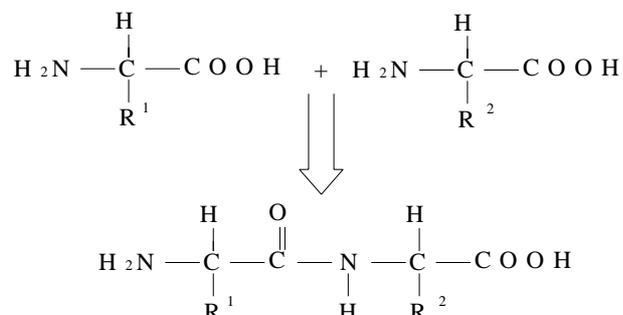


Figura 2. Reacción de la formación de un enlace peptídico (Morrison *et Boyd*, 1998).

El mecanismo enzimáticamente catalizado de la reacción que observamos en la figura 2, es mucho más complejo que lo que parece implicar una simple flecha. Los electrones del grupo carbonilo se encuentran deslocalizados, dando al enlace C–N un carácter de doble enlace.

La presencia de dicho carácter impide que exista rotación entorno a dicho enlace y por lo tanto los seis átomos se encuentran en un “plano amida”. La figura 3 muestra una cadena polipeptídica larga como una serie de planos amida unidos por los átomos de carbono α de sucesivos restos de aminoácidos. (Morrison *et Boyd*, 1998).

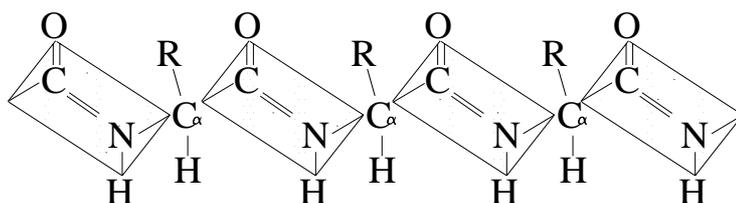


Figura 3. Planos amida de la cadena polipeptídica (Cheftel *et al.*, 1989).

Esta cadena se ha dibujado sin prestar atención a la distribución tetraédrica de los enlaces de los átomos de carbono α . De hecho, la cadena adopta una disposición más compacta que la que puede definirse por los ángulos de rotación entorno a los enlaces $\text{C}_\alpha\text{-N}$ y $\text{C}_\alpha\text{-C}$.

Cuando un determinado par de ángulos de este tipo se repite, en sucesivos átomos de carbono α , la cadena polipeptídica adopta una forma visiblemente regular, y que habitualmente es una hélice (Cheftel *et al.*, 1989).

2.4 ESTRUCTURA PROTEÍNICA

Es de suma importancia conocer la estructura de las proteínas debido a que ha permitido, en gran parte, entender sus funciones, particularmente a nivel molecular.

Las proteínas, a pesar de su gran tamaño, mantienen en los organismos vivos una estructura tridimensional precisa. La organización espacial se encuentra bien definida y se conoce como conformación nativa.

La conformación nativa presenta un arreglo tridimensional de los átomos de cada proteína en su estado natural, compatible con su función y, además, la conformación termodinámicamente más estable, con menor requerimiento de energía para adoptarse y menos cantidad de energía almacenada (Bohinski, 1991).

2.4.1 Estructura primaria

Cuando una proteína cuenta con una secuencia de aminoácidos unidos entre sí por uniones peptídicas, sin intervención de algún otro enlace, entonces estamos hablando de un arreglo espacial lineal al cual se le llama estructura primaria.

En las células el orden queda determinado por la información contenida en los genes, lo que da origen a una secuencia lineal y repetitiva de los átomos N, C, C, N, C, C, N.

A esta secuencia lineal se le llama columna vertebral, de donde sobresalen las cadenas laterales (R) de los aminoácidos. De la secuencia de los aminoácidos se deriva el resto de la conformación de la proteína (Lehninger, 1982).

La primera proteína de la que se conoció la estructura primaria fue la insulina, estudiada por Sanger (1953). Ahora se conoce la secuencia completa de más de 2000 proteínas (López, 2005).

2.4.2 Estructura secundaria

Según Stryer (1988) la estructura planar del enlace peptídico restringe las posibilidades del arreglo espacial de la columna vertebral de los polipéptidos.

Cada enlace peptídico planar forma un ángulo en relación al siguiente enlace, también planar, y se desplaza en relación al carbono α de cada uno de los aminoácidos, lo que influye en el plegamiento de la columna vertebral de los polipéptidos.

El plegamiento tiende a alcanzar la forma más estable, en la que ocurren menos modificaciones espontáneas.

Los tipos de arreglo presentes son los de α -hélice y los de hoja plegada β , formas dominantes de la estructura secundaria de las proteínas estabilizadas, en gran parte, por puentes de hidrógeno entre nitrógeno y oxígeno (figura 4).

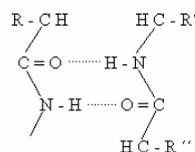


Figura 4. Puentes de hidrógeno (Morrison *et* Boyd, 1998).

2.4.2.1 Conformación α -hélice

En la conformación α -hélice, la columna vertebral de la cadena gira sobre un eje para dar una estructura helicoidal, como se muestra en la figura 5.

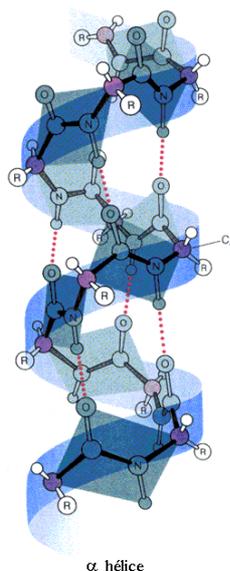


Figura 5. Representación de la conformación α -hélice en la estructura secundaria de las proteínas (Sayle, 1994)

En la conformación α hélice la columna vertebral, formada por series CCN, da vuelta en sentido de las manecillas del reloj, en su desarrollo de arriba hacia abajo. En la figura 5, están representadas las cadenas laterales con una R.

La dimensión de cada segmento CCNC, es de cerca de 0.15 nm, el ángulo entre cada uno de los segmentos es de 100° y por la parte externa de cada ángulo salen las cadenas laterales de los aminoácidos.

Caben 3.6 residuos de aminoácidos en cada vuelta que ocupa 0.54 nm, cuando se forman varias vueltas, la estructura total semeja a un cilindro o tubo del que sobresalen las cadenas laterales de los aminoácidos (Stryer, 1988).

2.4.2.2 Conformación hoja plegada β

La forma β es una conformación simple formada por dos o más cadenas polipeptídicas paralelas, que corren en el mismo sentido, o antiparalelas, que corren en direcciones opuestas, y se adosan estrechamente por medio de puentes de hidrógeno.

Esta conformación tiene una estructura laminar y plegada a manera de un acordeón (Cheftel *et al.*, 1989).

En la figura 6 se observa el esquema que corresponde a la disposición de una lámina de arreglo paralelo.

Debido a los ángulos entre C y N de la columna vertebral, la forma real es la de una lámina que se dobla en zig-zag. La zona punteada corresponde al puente de hidrógeno. La estabilidad es mayor cuando se presenta la conformación antiparalela, la más frecuente en las proteínas naturales, incluso más frecuente que la α -hélice (Stryer, 1988).

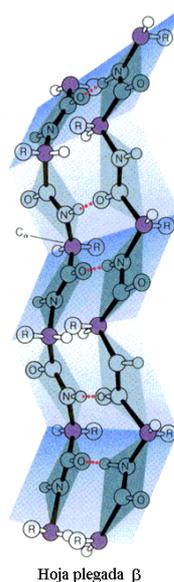


Figura 6. Configuración β de las cadenas polipeptídicas en las proteínas fibrosas (Sayle, 1994).

2.4.3 Estructura terciaria

Cuando se habla de una estructura terciaria en las proteínas, se está refiriendo a un arreglo tridimensional, formado por diversos repliegues específicos y fijos para un determinado orden de aminoácidos.

La disposición final de las proteínas depende de los distintos residuos de aminoácidos vinculados entre sí por ciertas uniones, de las cuales predominan las mostradas en la figura 7 (Cheftel *et al.*, 1989).

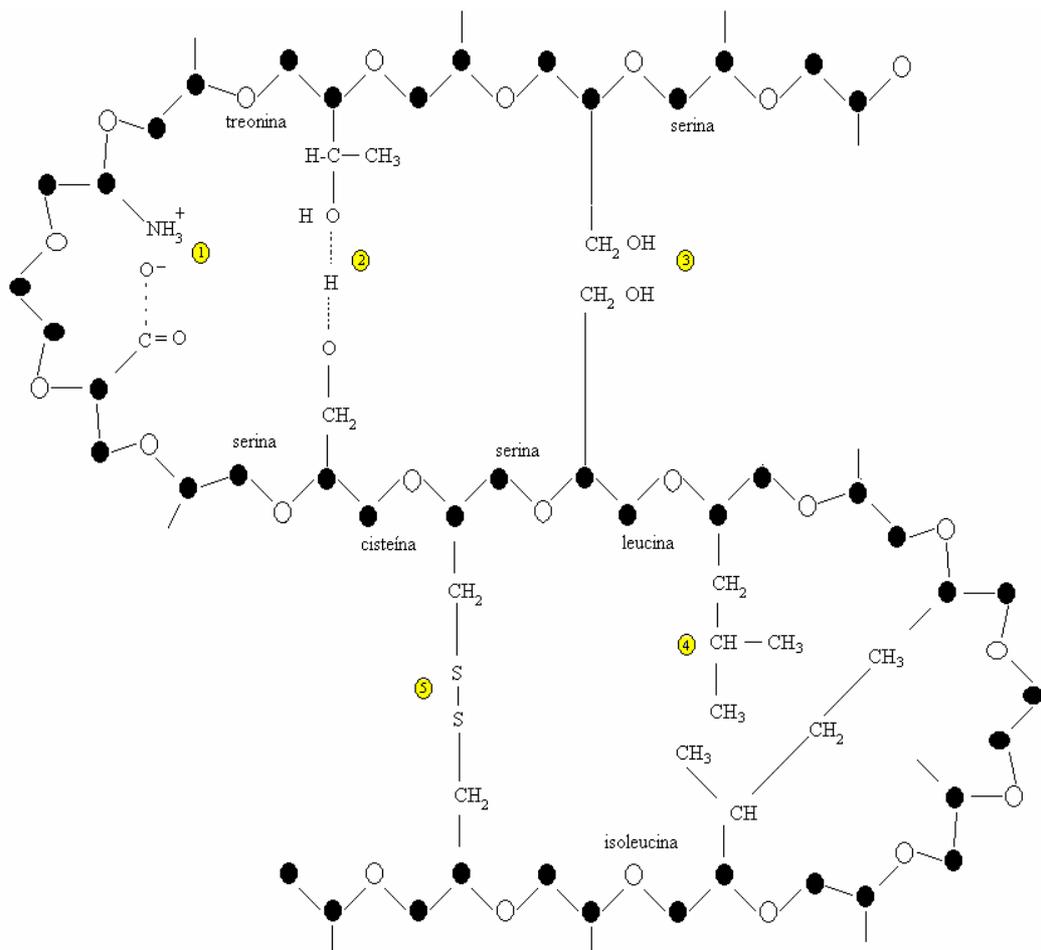


Figura 7. Tipo de uniones que estabilizan el plegamiento de las proteínas (Lehninger, 1989).

De acuerdo a la figura 7, se tienen cinco tipos de uniones que estabilizan el plegamiento de las proteínas, que son:

1. Uniones de tipo atracción electrostática

Se trata de la formación de una unión tipo electrostática por la presencia de un grupo -COO^- y otro -NH_3^+ de los residuos correspondientes, tipo glutamato o aspartato, y lisina o arginina, respectivamente.

2. Puentes de hidrógeno

Se establecen entre grupos carboxilato, grupos hidroxilo o los propios carboxilos de las uniones peptídicas, se consideran como una fuerza de unión importante debido a que en la molécula de proteína son muy numerosos.

3. Interacción de cadenas no polares

En este caso ocurre el acercamiento de residuos no polares parecidos, como los grupos aromáticos de la fenilalanina o los no aromáticos de la alanina y la isoleucina.

En especial, en éste tipo de interacciones debe tomarse en cuenta el papel del agua como solvente natural de las proteínas. Dada la estructura química del agua, al quedar excluida de los residuos no polares se favorece la interacción de dichos residuos entre los segmentos polipeptídicos de las proteínas disueltas en agua.

4. Fuerzas de Van der Waals

Cuando los residuos son idénticos, ocurre la atracción de especies moleculares iguales a través de las llamadas fuerzas de Van der Waals, dos residuos similares, metilos de la alanina o hidroximetilos de la serina, producen este efecto.

5. Puentes de disulfuro

Son uniones covalentes entre dos partes de la cadena, que ocurre entre dos cisteínas, cuyo grupo activo es $-SH$, para formar puentes disulfuro $-S-S-$ estableciendo firmes uniones entre cadenas vecinas.

El resultado entre las distintas uniones descritas, es una estructura terciaria de gran estabilidad.

Existen dos factores más para que se produzca la conformación final, que son las interacciones hidrofóbicas y los residuos de aminoácidos polares con tendencia a quedar en la periferia de la molécula en interacción con el agua. Los residuos de los aminoácidos no polares se sitúan preferentemente en el seno de la molécula (Morrison *et Boyd*, 1998)

Las cadenas hidrófobas tienden a orientarse de modo que sus interacciones con el entorno acuoso de la proteína se minimicen, es por esta razón que dichos residuos suelen proyectarse hacia el centro de la molécula plegada, donde se reúnen con otros residuos apolares.

La tendencia de estos aminoácidos a comportarse de la manera antes descrita es un factor de suma importancia para mantener correctamente plegada la cadena polipeptídica.

Las estructuras terciarias de las proteínas permiten agruparlas en familias y subfamilias; por ejemplo, proteínas fibrosas de forma alargada y proteínas globulares de forma esférica (Cheftel *et al.*, 1989).

La mioglobina (figura 8), proteína globular de los músculos de mamíferos, fue la primera proteína cuya estructura terciaria se conoció por análisis con rayos X. Alrededor de 70% de sus aminoácidos se disponen en 8 segmentos lineales de α hélice de longitud variable desde 7 hasta 23 aminoácidos.

Aún cuando su estructura parece irregular asimétrica, no se establece al azar; todas las moléculas de mioglobina son iguales y tan compactas que sólo pueden penetrar a su interior cuatro moléculas de agua que se adosan a aminoácidos polares internos (Stryer, 1988).

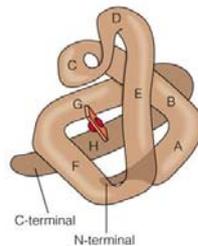


Figura 8. Esquema de la estructura terciaria de una molécula de mioglobina (Sayle, 1994).

2.4.4 Estructura Cuaternaria

Por estructura cuaternaria se entiende el agrupamiento de varias cadenas polipeptídicas, iguales o diferentes, para formar estructuras más complejas.

La estructura cuaternaria estudiada por primera vez fue la de la hemoglobina del ser humano adulto (figura 9).

Como resultado de más de 25 años de investigación, se encontró que, cada cadena polipeptídica posee un grupo heme que reacciona directamente con el oxígeno para transportarlo (Cheftel *et al.*, 1989).

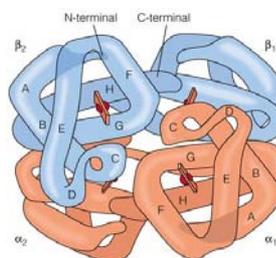


Figura 9. Esquema de la hemoglobina, ejemplo de una estructura cuaternaria de las proteínas (Sayle, 1994).

En la figura 9 se aprecia el esquema de la disposición de cuatro subunidades de una molécula de hemoglobina, formada por dos cadenas α en la parte inferior de la figura y dos β en la parte superior.

2.4.5 Estructuras supramoleculares

En ocasiones, las proteínas asociadas a otras moléculas se ensamblan formando estructuras más complejas denominadas supramoleculares, con la ventaja de constituir una unidad funcional, con una complejidad intermedia entre la conformación cuaternaria de las proteínas oligoméricas, por un lado, y los organelos subcelulares como los lisosomas o las mitocondrias por otro. Ejemplos típicos son el complejo de la sintetasa de los ácidos grasos, los virus y los ribosomas.

Las estructuras supramoleculares habitualmente se ensamblan por un fenómeno de cooperatividad estructural: dos macromoléculas unidas ofrecen mayor superficie y favorecen el ensamble de una tercera macromolécula estas tres, a su vez, facilitan el de una cuarta, y así sucesivamente (Cheftel *et al.*, 1989).

2.5 DESNATURALIZACIÓN DE PROTEÍNAS

Cualquier factor que modifique la interacción de la proteína con el disolvente disminuirá su estabilidad en disolución y provocará la precipitación.

La desaparición total o parcial de la envoltura acuosa, la neutralización de las cargas eléctricas de tipo repulsivo o la ruptura de los puentes de hidrógeno, facilitará la agregación intermolecular y provocará la precipitación. La precipitación suele ser consecuencia del fenómeno llamado desnaturalización (Lehninger, 1982).

Se llama desnaturalización de las proteínas a la pérdida de las estructuras de orden superior (secundaria, terciaria y cuaternaria), quedando la cadena polipeptídica reducida a un polímero estadístico sin ninguna estructura tridimensional fija (Lehninger, 1982).

Cuando la proteína no ha sufrido ningún cambio en su interacción con el disolvente, se dice que presenta una estructura nativa. Cualquier alteración de la estructura nativa que modifique su interacción con el disolvente y que provoque su precipitación dará lugar a una estructura desnaturalizada.

En una proteína cualquiera, la estructura nativa y la desnaturalizada tan sólo tienen en común la estructura primaria, es decir, la secuencia de aminoácidos que la componen. Los demás niveles de organización estructural desaparecen en la estructura desnaturalizada (Lehninger, 1982).

La desnaturalización provoca diversos efectos en la proteína:

1. Cambios en las propiedades hidrodinámicas de la proteína: aumenta la viscosidad y disminuye el coeficiente de difusión.
2. Drástica disminución de su solubilidad, ya que los residuos hidrofóbicos del interior aparecen en la superficie.
3. Pérdida de las propiedades biológicas.

Una proteína desnaturalizada cuenta únicamente con su estructura primaria, por este motivo, en muchos casos, la desnaturalización es reversible. El proceso mediante el cual la proteína desnaturalizada recupera su estructura nativa se llama renaturalización.

Esta propiedad es de gran utilidad durante los procesos de aislamiento y purificación de proteínas, ya que no todas las proteínas reaccionan de igual forma ante un cambio en el medio donde se encuentra disuelta (Lehninger, 1982).

En algunos casos, la desnaturalización conduce a la pérdida total de la solubilidad, con lo que la proteína precipita. La formación de agregados fuertemente hidrofóbicos impide su renaturalización y hacen que el proceso sea irreversible (Cheftel *et al.*, 1989).

2.6 AGENTES DESNATURALIZANTES

Los agentes que provocan la desnaturalización de una proteína se llaman agentes desnaturalizantes. Se distinguen agentes físicos (calor, pH, fuerza iónica) y químicos (detergentes, disolventes orgánicos).

2.6.1 Efecto de la polaridad del disolvente

La polaridad del disolvente disminuye cuando se le añaden sustancias menos polares que el agua como el etanol o la acetona. Con ello disminuye el grado de hidratación de los grupos iónicos superficiales de la molécula proteica, provocando la agregación y precipitación.

Los disolventes orgánicos interaccionan con el interior hidrofóbico de las proteínas y desorganizan la estructura terciaria, provocando su desnaturalización y precipitación. La acción de los detergentes es similar a la de los disolventes orgánicos (Stryer, 1988).

2.6.2 Efecto de la fuerza iónica

Un aumento de la fuerza iónica del medio (por adición de sulfato amónico, urea o hidrocloreuro de guanidinio, por ejemplo) también provoca una disminución en el grado de hidratación de los grupos iónicos superficiales de la proteína, ya que estos solutos compiten por el agua y rompen los puentes de hidrógeno o las interacciones electrostáticas, de forma que las moléculas proteicas se agregan y precipitan.

En muchos casos, la precipitación provocada por el aumento de la fuerza iónica es reversible. Mediante una simple diálisis se puede eliminar el exceso de soluto y recuperar tanto la estructura como la función original, a veces es una disminución en la fuerza iónica la que provoca la precipitación, así, las proteínas que se disuelven en medios salinos pueden desnaturizarse al dializarlas frente a agua destilada, y se renaturalizan cuando se restaura la fuerza iónica original (Stryer, 1988).

2.6.3 Efecto del pH

Los iones H^+ y OH^- del agua provocan efectos parecidos a lo que sucede con la fuerza iónica, pero además de afectar a la envoltura acuosa de las proteínas también afectan a la carga eléctrica de los grupos ácidos y básicos de las cadenas laterales de los aminoácidos esta alteración de la carga superficial de las proteínas elimina las interacciones electrostáticas que estabilizan la estructura terciaria lo que provoca su precipitación. La solubilidad de una proteína es mínima en su punto isoeléctrico, ya que su carga neta es cero y desaparece cualquier fuerza de repulsión electrostática que pudiera dificultar la formación de agregados (Stryer, 1988).

2.6.4 Efecto de la temperatura

Cuando la temperatura es elevada aumenta la energía cinética de las moléculas con lo que se desorganiza la envoltura acuosa de las proteínas, y se desnaturizan; así mismo un aumento de la temperatura destruye las interacciones débiles y desorganiza la estructura de la proteína, de forma que el interior hidrofóbico interacciona con el medio acuoso y se produce la agregación y precipitación de la proteína desnaturizada.

El papel biológico de una proteína, depende siempre del plegamiento de su esqueleto de forma adecuada para mantener relaciones espaciales correctas entre las cadenas laterales de sus aminoácidos.

En algunos casos, las proteínas purificadas pueden recuperar su estructura nativa tras la desnaturalización, pero en los alimentos es sumamente raro que esto ocurra. Es mucho más probable que las proteínas desplegadas formen nuevas interacciones entre sí, lo que conduce a la precipitación, la solidificación o la formación de geles.

Contrario a lo que se supone, la desnaturalización de las proteínas en los alimentos no siempre es perjudicial, por ejemplo, las hortalizas se escaldan en agua hirviendo o al vapor, antes de su congelación para inactivar ciertas enzimas, en especial la lipooxigenasa (Stryer, 1988).

2.7 CALIDAD NUTRICIONAL DE LAS PROTEÍNAS

Las proteínas en los alimentos proporcionan los aminoácidos con los que se sintetizan las nuestras, bajo la acción de las enzimas hidrolíticas, en el estómago y en el intestino delgado, las proteínas de los alimentos se degradan para liberar sus aminoácidos constitutivos. Absorbidos al torrente circulatorio, pasan a formar parte de una reserva llamada "lábil" de aminoácidos de nuestro organismo (Madl, 1993).

La degradación de las proteínas tisulares contribuye de igual manera a ese lábil, el cual es utilizado, no solo para la síntesis de proteína, si no también para proporcionar las materias primas precisas para la síntesis de purinas, pirimidinas, porfirinas y otras sustancias (Osborne *et Voogt*, 1990).

Equilibrar la composición del suministro de aminoácidos y las necesidades para la síntesis es una de las funciones más importantes del hígado. En términos ideales, la proteína de la dieta debería proporcionar aminoácidos en las mismas proporciones relativas en que son necesarios para la síntesis de las proteínas corporales, pero esta situación ideal no se da nunca (Osborne *et Voogt*, 1990).

La cantidad excedente de un determinado aminoácido se degrada; los esqueletos carbonados se oxidan para producir energía o para su almacenamiento en forma de grasa. El nitrógeno o se excreta como urea o se utiliza en la síntesis de los aminoácidos no esenciales suministrados en cantidades deficitarias.

La falta de un solo aminoácido concreto detendría la síntesis proteica ya que casi todas las proteínas tienen por lo menos una molécula de todos y cada uno de los aminoácidos que aparecen en la tabla 2, con excepción de la hidroxiprolina y de la hidroxilisina (Osborne *et Voogt*, 1990).

La dieta de una persona de un país desarrollado, suele asegurar un suministro abundante de proteína total y de todos los aminoácidos esenciales, pero la mayoría de la población de países en desarrollo, consume dietas inadecuadas, tanto en términos de proteína total como de riqueza de aminoácidos esenciales.

Suárez *et al.* (2006) exponen que las proporciones entre distintos aminoácidos requeridos en la infancia se aproximan mucho a la composición aminoacídica de la leche humana, de modo que se ha aceptado esta como el estándar para juzgar el valor biológico de las proteínas de otros alimentos.

Dicha comparación ha revelado que la composición aminoacídica de los alimentos procedentes de los más diversos orígenes es similar, lo que es lógico dada la diversidad de los papeles que las diferentes cadenas laterales de los aminoácidos juegan en el mantenimiento de la estructura proteica. Los alimentos proteicos de origen animal como son, huevo, leche y carne, no difieren significativamente en lo que a su composición aminoacídica se refiere de la leche humana (Keller *et Neville*, 1986).

Los alimentos proteicos de origen vegetal presentan algunos problemas, por ejemplo: la baja proporción de lisina en la proteína de trigo, reduce su eficacia como fuente de proteína. Una determinada cantidad de proteína de trigo que proporcione niveles adecuados de lisina

proporcionara cantidades sobrantes, y por lo tanto desaprovechadas de otros aminoácidos. (Suárez *et al.*, 2006).

Las leguminosas, como son el haba y el garbanzo, proporcionan grandes cantidades de lisina, pero son deficientes en metionina, de modo que resultan fuentes proteínicas inadecuadas.

Una dieta constituida por una mezcla de cereales y leguminosas será mucho más eficaz como fuente de proteínas que una constituida solamente por cereales o por leguminosas (Olivares *et al.*, 1989; Osborne *et Voogt*, 1990).

Las determinaciones experimentales de la eficacia expresada en términos de proporción de nitrógeno proteínico dietético utilizado por el organismo, demuestran que nunca se alcanzan los niveles adecuados teóricos, esto debido a la deficiencia del sistema digestivo y a los efectos del cocinado (Darragh *et Hodgkinson*, 2000).

Aunque las proteínas vegetales sean menos eficaces que las proteínas animales, hay que tomar en cuenta que la obtención de proteínas vegetales, en términos agrícolas, es mucho más productiva que la proteína animal (Osborne *et Voogt*, 1990).

El problema que supone el bajo contenido de lisina y metionina, en proteínas que serian ideales, se exagera por la tendencia de estos dos aminoácidos a sufrir, durante el almacenamiento y el procesado de los alimentos, reacciones que destruyen o merman su valor biológico (Suárez, *et al.* 2006).

La reacción de Maillard entre los grupos amino de la lisina y los azúcares reductores es la más importante, pero esta reacción no es la única ruta de pérdida de lisina, durante el tratamiento a elevadas temperaturas, especialmente en condiciones alcalinas.

Las cadenas laterales de la lisina pueden formar enlaces cruzados con otras cadenas aminoacídicas, lo que conlleva a reducir el número de restos de lisina disponibles y además, a impedir la asimilación de gran parte del resto de la molécula proteínica, puesto que dificulta el desplegamiento y, por ende, impide el acceso a las enzimas proteolíticas (Osborne *et Voogt*, 1990).

Cuando la dieta contiene suficientes carbohidratos y grasas, la mayor parte de los requerimientos energéticos se obtienen de éstas fuentes y la cantidad de proteína degradada con fines energéticos es menor, por lo tanto, la proteína ingerida se utiliza en mayor proporción en la síntesis de tejido, este efecto es denominado ahorro de proteína (Llorente *et al.*, 2005).

2.8 VALOR BIOLÓGICO DE LAS PROTEINAS

La digestibilidad de las proteínas es la relación entre la cantidad de proteínas ingeridas y la de las proteínas absorbidas una vez digeridas (Darragh *et Hodgkinson*, 2000).

La utilización de las proteínas representa su capacidad para la síntesis de nuevas proteínas propias de cada organismo; esto representa el valor biológico y se expresa como sigue:

$$\text{Valor biológico} = (\text{N dietético retenido} / \text{N dietético absorbido}) \times 100$$

Mientras más nitrógeno se retiene en comparación con el absorbido, más alto es el valor biológico de la proteína en cuestión. También es posible expresar el valor biológico de una proteína en función de su valor químico, que se obtiene de la concentración de cada aminoácido esencial comparado con la presente en la proteína del huevo entero (Suárez *et al.*, 2006).

Los valores químicos son comparables a los valores biológicos derivados de los estudios de balance nitrogenado (Osborne *et Voogt*, 1990).

2.9 VALOR PROTEICO DE LOS ALIMENTOS

El valor proteico de un alimento corresponde a su capacidad para satisfacer las necesidades del organismo en nitrógeno y aminoácidos y asegurar así un crecimiento y mantenimiento convenientes, para considerar el valor proteico de los alimentos es necesario tomar en cuenta diversos factores (Osborne *et Voogt*, 1990).

2.9.1 Contenido en proteína

La mayoría de los alimentos de origen vegetal como los tubérculos (papa, zanahoria) contienen menos del 3% de proteína no satisfaciendo las necesidades proteicas del cuerpo humano, salvo que se ingieran en cantidades que sobrepasen las necesidades calóricas (Keller *et Neville*, 1986).

Un régimen de cereales y oleaginosas (con un contenido de 3 a 10% en proteína), asegura las necesidades calóricas. Esto explica, probablemente, que en los países en vías de desarrollo la malnutrición mixta proteica y calórica enfermedad conocida como marasmo, es más común que la malnutrición debida solamente a una deficiencia proteica, enfermedad conocida como kwashiorkor (Olivares *et al.*, 1989).

2.9.2 Calidad de las proteínas

La calidad de una proteína alimenticia depende de la naturaleza y la cantidad de aminoácidos contenidos (Suárez *et al.*, 2006), lo que representa una medida de la eficacia de cómo el organismo puede utilizar esa proteína.

Una proteína de alta calidad contiene los aminoácidos indispensables en proporciones correspondientes a las necesidades del organismo. En general, las proteínas de origen animal, son de mejor calidad que las vegetales (Madl, 1993).

2.9.3 Disponibilidad de aminoácidos

Los aminoácidos presentes en las proteínas de los alimentos no están siempre disponibles, debido a que la digestión de la proteína o la absorción de los aminoácidos liberados no son completas (Osborne *et Voogt*, 1990).

Generalmente los aminoácidos de las proteínas animales se digieren y absorben en una proporción del 90%, mientras que los de algunas proteínas vegetales sólo pueden ser liberados y absorbidos en un 60 a 70%.

Esta deficiente utilización de ciertas proteínas, puede deberse a varios factores:

- **Conformación de la proteína**

Las proteasas atacan más lentamente a las proteínas fibrosas, insolubles, que a las globulinas, que son solubles. Sin embargo, frecuentemente, la desnaturalización proteica por medio de un calentamiento moderado aumenta la digestión.

- **Fijación**

Existen fijaciones a las proteínas de metales, lípidos, ácidos nucleicos, celulosas y otros polisacáridos que pueden reducir parcialmente la digestión.

- **Presencia de factores antinutricionales**

Ejemplos de estos factores son: los inhibidores trópicos y quimotrópicos que disminuyen la digestión de las proteínas lo que conlleva a una disminución en la absorción de aminoácidos.

- Tamaño y extensión de la superficie de las partículas proteicas

Cuando las partículas son más pequeñas existe mayor exposición de superficie de los aminoácidos y por tanto una mayor liberación de éstos.

- Tratamientos térmicos

Factores fisicoquímicos extremos como pH alcalinos, altas temperaturas o glúcidos reductores, disminuyen la digestibilidad proteica y disponibilidad biológica de algunos aminoácidos, especialmente la lisina (Darragh *et* Hodgkinson, 2000; Osborne *et* Voogt, 1990).

- Diferencias biológicas

Existen diferencias biológicas entre individuos que determina en que grado se lleva a cabo la digestibilidad de las proteínas y la absorción de aminoácidos para el organismo en específico (Darragh *et* Hodgkinson, 2000).

La cronología de la liberación de un aminoácido resulta casi tan importante como el periodo de digestión, por que puede influenciar en el aprovechamiento de los mismos. Por ejemplo, una liberación y absorción rápidas, motivan una degradación acelerada en el hígado.

Sin embargo, tampoco se aconseja una liberación excesivamente lenta de aminoácidos en el sistema digestivo, debido a que en la parte inferior del intestino, donde la flora intestinal metaboliza los nutrientes residuales, no hay mecanismo de absorción para los aminoácidos (Llorente *et al.*, 2005).

2.10 BALANCE DE NITRÓGENO

El nitrógeno del alimento representa en gran proporción al nitrógeno proteínico. Por otro lado, la mayor parte del nitrógeno es excretado por la orina como urea, creatinina, amoníaco y ácido úrico. El nitrógeno de la materia fecale representa, en su mayor parte, un producto de descamación intestinal o de la flora bacteriana (Suárez *et al.*, 2006).

De la determinación del nitrógeno dietético, el nitrógeno urinario y fecal se deriva el concepto de balance de nitrógeno. En general, cuando un animal adulto excreta diariamente una cantidad de nitrógeno igual a la ingerida se dice que la digestibilidad es igual a 100 y el balance de nitrógeno está en equilibrio, es decir, no existe diferencia entre lo ingerido y lo excretado (Suárez *et al.*, 2006).

Para realizar dicho balance es necesario llevar a cabo un análisis cuantitativo de muestras de alimentos, orina y materia fecale (Darragh *et Hodgkinson*, 2000).

Cuando la ingestión de nitrógeno sobrepasa su excreción, existe balance nitrogenado positivo, esto sucede cuando se pierde tejido como cuando se lleva a cabo el proceso de crecimiento, en el embarazo y en la convalecencia de enfermedades causantes de pérdida de peso (Llorente *et al.*, 2005).

Cuando la excreción del nitrógeno por vía urinaria y fecal, excede a la ingestión dietética, existe balance nitrogenado negativo.

Esta situación se presenta en la inanición, en enfermos del aparato digestivo que absorben muy poco nitrógeno, cuando existe gran degradación tisular, como cuando ocurren fuertes infecciones, o cuando las pérdidas son muy abundantes, tal es el caso de madres lactantes que no ingieren suficiente alimento (Llorente *et al.*, 2005).

Experimentalmente se provoca balance nitrogenado negativo al suprimir determinados aminoácidos de las dietas o cuando la fuente de proteína es una proteína incompleta, como la gelatina o la zeína (proteína del maíz).

En esta situación el animal continúa degradando su propia proteína con un aumento en la excreción de nitrógeno, es decir, la cantidad proporcionada por la proteína incompleta más la proveniente de la degradación interna en los tejidos (Darragh *et Hodgkinson*, 2000).

Para los cálculos del requerimiento de proteínas, se acepta convencionalmente que están cubiertas las exigencias de carbohidratos y grasas, tanto por su efecto de ahorro, como por que su esqueleto de carbono es necesario para la formación de aminoácidos no esenciales, es indispensable contar por lo menos con 5 g de carbohidratos por cada 100 calorías de la dieta, para sostener el equilibrio nitrogenado (Osborne *et Voogt* 1990).

La necesidad de proteínas para el ser humano se puede medir a través del balance nitrogenado o por la observación del estado de salud. Así, es posible bajar la cantidad de proteína hasta llegar a una cifra causante de balance negativo. Esto se obtiene con 0.25 a 0.30 g de proteína por kilogramo de peso corporal.

Cuando un individuo se sostiene en estas situaciones marginales de ingestión de nitrógeno, su estado de salud es precario y no está en condiciones de enfrentarse a ciertas emergencias como infecciones o traumatismos (Kéller *et Neville*, 1986).

Las recomendaciones que se manejan actualmente por la FAO y la OMS son de cerca de 1 g de proteína completa por kilogramo de peso corporal para adultos y de 2 g para los niños, por día (Olivares *et al.*, 1989).

2.11 EFECTOS DE LA DEFICIENCIA DE PROTEÍNA

Como ya se ha mencionado, numerosas funciones del organismo se alteran en las deficiencias de proteínas: el crecimiento se retarda y en el individuo adulto la pérdida de peso es característica (Osborne *et Voogt* 1990).

En cuanto a la nutrición humana no es posible distinguir entre las deficiencias de proteínas puras y las deficiencias alimenticias en general (Keller *et Neville* 1986).

En realidad, como la proteína es más costosa, a menudo la carencia de proteína excede a la de calorías. Por razones socioeconómicas, con mayor frecuencia faltan proteínas completas de origen animal o leguminoso y el individuo consume alimentos con proteínas de bajo valor biológico (Pellet, 1987).

En patología infantil se refieren dos entidades clínicas por desnutrición proteica: el kwashiorkor, cuando el niño recién retirado de la lactancia recibe una dieta hipoproteica, y el marasmo cuya causa es la alimentación postlactancia hipocalórica e hipoproteica y se caracteriza por retardo del crecimiento, anemia, edema generalizado y alteraciones hepáticas (Mald, 1993).

Las proteínas no se almacenan como lo hacen los carbohidratos y las grasas. Sin embargo, existe una fracción de proteína (lábil), fácilmente utilizable para sintetizar, en casos de necesidad, proteínas fisiológicamente importantes, como la hemoglobina o las proteínas plasmáticas (Mald, 1993).

2.12 DETERMINACIÓN ANALÍTICA DE PROTEÍNA

La calidad de una proteína alimenticia, en términos nutritivos, sólo puede establecerse realmente mediante ensayos de la alimentación (Madl, 1993; Suárez *et al.*, 2006), pero hoy

se sabe lo suficiente con respecto a la digestión de las proteínas y a los efectos de las técnicas de procesado como para poder realizar experimentos bastante precisos. Para ello, es necesario conocer tanto el contenido proteínico total del alimento como la composición aminoacídica de su proteína (Madl, 1993).

Determinar el contenido proteínico total de los alimentos no es tan simple como se supone, a lo largo del tiempo, se han descrito numerosas reacciones coloreadas específicas para determinados aminoácidos, desafortunadamente pocas son cuantitativas y no pueden proporcionar el total de datos requeridos. Por ello, para la determinación de la composición aminoacídica de las proteínas, es necesario recurrir a técnicas cromatográficas.

Una de éstas técnicas es la cromatografía mono y bidimensional en papel, en las que la localización de los aminoácidos se efectúa por medio de la reacción de la ninhidrina, hidrato de tricetohidrideno, que da un color azul con todos los aminoácidos, excepto la prolina y la hidroxiprolina que dan un color amarillo (Kirk *et al.*, 2002).

Para el trabajo rutinario, la mayor parte de los laboratorios recurren a la cromatografía en columna de intercambio iónico.

Una vez que el hidrolizado se ha depositado en la resina intercambiadora de iones con la que se empaqueta la columna, se eluye con una serie de disoluciones de pH y concentración iónica creciente, que arrastran a los aminoácidos en una secuencia muy reproducible.

Aunque la separación de aminoácidos por intercambio iónico puede llevarse a cabo con los aparatos ordinarios de laboratorio, lo frecuente es utilizar “analizadores de aminoácidos”, en los que están automatizadas todas las operaciones, desde la aplicación de la muestra a la elución, la detección y la cuantificación por la reacción de la ninhidrina, a medida que van siendo eluidos de la columna.

Como etapa previa, se requiere la hidrólisis ácida, que inevitablemente convierte los aminoácidos glutamina y asparragina en sus correspondientes ácido, de modo que el contenido en estos cuatro aminoácidos se suele dar como ácido glutámico más glutamina y ácido aspártico más asparragina.

La hidrólisis ácida destruye además el triptófano, por lo que es necesario determinar el contenido en este aminoácido partiendo de un hidrolizado alcalino, mediante ensayos químicos específicos (Lees, 1984).

Prácticamente, cualquier ensayo específico para las proteínas depende de la presencia de una determinada cadena lateral aminoacídica, por lo tanto, los resultados analíticos se ven condicionados siempre por la proporción que el aminoácido en cuestión tenga en las proteínas del material sometido a ensayo además de que es necesario que el aminoácido este presente en alguna proteína estándar.

Ejemplo de ensayo específico es el método de Lowry (1951) en donde a la muestra se añade un reactivo que forma un complejo coloreado con las proteínas, siendo la intensidad de color proporcional a la concentración de proteínas, este método es el único aplicable a disoluciones proteínicas a concentraciones inferiores a $300 \mu\text{g}/\text{cm}^{-3}$.

En disolución alcalina y en presencia de iones de cobre, los restos de tirosina reducen el fosfomolibdotungstato que da lugar a un complejo de color azul intenso, que es determinado espectrofotométricamente (Matissek *et al.*, 1996).

Otro método calorimétrico-espectrofotométrico de respuesta uniforme frente a las distintas proteínas es el método de Biuret. Una vez más, en condiciones alcalinas que aseguren que la cadena polipeptídica está desplegada y es plenamente accesible, los iones Cu^{+2} forman un complejo con los átomos de nitrógeno de la cadena polipeptídica, para dar un color violeta característico.

De la mezcla de reacción forma parte el tartrato potásico, con objeto de asegurar que los iones Cu^{+2} en exceso no precipitan como $\text{Cu}(\text{OH})_2$ (Matissek *et al.*, 1996).

En el análisis de alimentos se tiene el supuesto de que la proporción de nitrógeno no proteico en un producto alimenticio es demasiado pequeña para ser significativa, y que una determinación de nitrógeno total refleja con suficiente precisión la riqueza en proteína (Souza *et al.*, 2000).

La proporción que representa el nitrógeno, en la mayor parte de las proteínas, es del 16% en peso, de modo que suele utilizarse un factor 6.25 (100/16) para convertir el contenido de nitrógeno en tanto por ciento de proteína (Simmone *et al.*, 1997).

Las variaciones en la composición aminoacídica de los diferentes alimentos exigen utilizar factores ligeramente diferentes, si se quieren obtener resultados precisos. Así, por ejemplo, las proteínas de los cereales tienen una proporción muy alta de glutamina y en consecuencia una riqueza en nitrógeno superior a la habitual, por lo que resulta necesario utilizar un factor de conversión de 5.70.

Para la determinación del contenido proteínico de la carne, se utiliza el factor estándar 6.25, pero para determinación de los productos lácteos y el huevo se emplean factores de 6.38 y 6.68, respectivamente (Stricher *et al.*, 1999).

2.12.1 Método Dumas

Para la determinación de nitrógeno total, se han desarrollado métodos como el que creó Justus Von Liebig (1803-1873) en 1830, que incluye el diseño de un aparato para llevar a cabo la combustión de las muestras (Dominic *et Wong*, 1995).

La determinación del contenido total de nitrógeno en sustancias orgánicas no se consiguió con resultados satisfactorios hasta que Jean Baptiste André Dumas (1800-1884) mejoró, en 1831, el complicado y tedioso método propuesto por Liebig (López, 2005).

La determinación de nitrógeno en compuestos orgánicos por el método de Dumas se basa en la reducción de los óxidos de nitrógeno formados en la combustión de las muestras, realizando la medición volumétricamente del gas nitrógeno producto de dicha reducción.

Esto se logra cuándo la muestra pesada de sustancia orgánica se hace pasar por un tren de combustión que consta de un tubo que contiene óxido de cobre y calentado a una temperatura que va desde 600°C a 800°C.

Posteriormente, el agua formada se absorbe en otro tubo que contiene agente desecante, para finalmente, diluir el dióxido de carbono en el último tubo cargado de base fuerte (Skoog *et West* 1994).

Al pasar la muestra por dicho tren de combustión el nitrógeno combinado se reduce liberando nitrógeno molecular, después la muestra pasa a través de una malla de cobre.

En la malla de cobre se reducen los óxidos de cobre que pudiesen haberse formado a nitrógeno elemental, el nitrógeno elemental se recoge y se mide el volumen obtenido (Skoog *et West* 1994).

Para obtener el peso del Nitrógeno se utiliza la siguiente formula:

$$\text{Peso de N}_2 = \frac{\text{Volumen obtenido de N}_2}{22400} \times (2 \times 14.01) = \text{gramos de Nitrógeno}$$

2.12.2 Método Kjeldahl

Como alternativa a la determinación del nitrógeno orgánico por combustión de la muestra, y tras algunos intentos fallidos, el danés Johan Gustav Christoffer Thorsager Kjeldahl (1849-1900) publicó en 1893 un método basado en la conversión del nitrógeno en amoníaco por vía húmeda (Kirk, 2002).

Aunque el método de Kjeldahl no es aplicable a muchos compuestos orgánicos nitrogenados debido a la conversión incompleta del nitrógeno en amoníaco, tal es el caso de los nitritos y nitratos, conduce, a resultados exactos cuando se aplica a muestras que contienen nitrógeno proteínico (Möller, 2005).

La determinación de nitrógeno total por el método Kjeldahl aún hoy en día es uno de los métodos más utilizados en el análisis químico (Souza *et al.*, 2000; Möller, 2005). Aceptado por la A.O.A.C. (1984), no requiere de un equipo sofisticado y se adapta con facilidad a los análisis de rutina de un gran número de muestras.

El método Kjeldahl (o alguna de sus modificaciones), es el método patrón para determinar la proteína contenida en cereales, carnes y otros materiales biológicos (Matissek *et al.*, 1996).

En éste método la muestra se descompone con ácido sulfúrico concentrado a una temperatura elevada, éste actúa como oxidante, los gases de ácido sulfúrico, que se forman, se disocian en forma de sulfatos y agua. El sulfato, a su vez, se descompone en sulfito y oxígeno, el cual oxida al carbono y al hidrógeno de la materia orgánica para convertirlos en dióxido de carbono y agua como se muestra en la siguiente ecuación:



El nitrógeno de la mayoría de los grupos orgánicos funcionales se convierte en NH₃ que, con el ácido sulfúrico, forma sulfato de amonio.

Cuando la descomposición es completa la solución se clarifica y después se enfría, se diluye y alcaliniza utilizando hidróxido de sodio concentrado. El amoníaco liberado se separa por destilación, se recoge en solución ácida, y por último se cuantifica mediante una valoración. La etapa crucial en el método Kjeldahl es la descomposición de la muestra con ácido sulfúrico, sin embargo, la transformación de nitrógeno depende del estado de combinación en la muestra original (Môller, 2005).

El nitrógeno amínico y amídico se transforma cuantitativamente en ión amonio. Por lo contrario el nitrógeno en forma de grupos nitro, azo y azoxi puede originar nitrógeno elemental o algunos óxidos de nitrógeno que se pierden en el medio ácido caliente. Esta pérdida puede evitarse al tratar previamente la muestra con un agente reductor para formar productos que se comporten como el nitrógeno amínico o amídico.

En uno de los tratamientos de prerreducción se agregan ácido salicílico y tiosulfato de sodio a la mezcla de ácido sulfúrico concentrado con la muestra. Poco después se lleva a cabo la digestión de la misma manera. Algunos compuestos heterocíclicos aromáticos como la piridina y sus derivados, son particularmente resistentes a la completa descomposición con ácido sulfúrico. Como consecuencia, estos compuestos producen resultados bajos si no se toman precauciones especiales (Skoog *et West*, 1994).

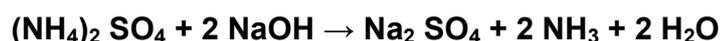
La digestión de la muestra es la etapa en donde se consume más tiempo; pueden ser necesarias seis horas (o más), es por ello que se ha intentado acelerar éste proceso por medio de la introducción de algunos agentes oxidantes más fuertes como el ácido perclórico, permanganato de potasio y peróxido de hidrógeno, pero no ha dado buen resultado debido a una parcial oxidación del ión amonio a productos volátiles (Matissek *et al.*, 1996).

Entre los diversos procedimientos para mejorar la cinética del proceso de digestión, la modificación propuesta por *J. W. Gunning* en 1889 es la más satisfactoria, Gunning añadió

sulfato de potasio, para incrementar el punto de ebullición del ácido sulfúrico y por lo tanto, la temperatura de digestión de la muestra (López, 2005).

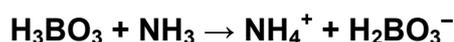
La cantidad de sal añadida debe ser controlada para eliminar la posibilidad de oxidación del ión amonio. Esta dificultad se presenta si se evapora excesiva cantidad de ácido durante la digestión (Skoog *et West*, 1994).

La etapa de neutralización se lleva a cabo adicionando hidróxido de sodio, el cual desplaza al amonio del sulfato y lo elimina en forma de hidróxido amónico que es arrastrado por el vapor de la destilación.

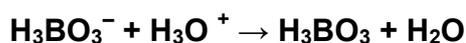


Como se expresa en la ecuación, es importante llegar a la alcalinización completa, de otra manera el amoníaco no se libera y por tanto no se llega a una determinación adecuada (Matissek *et al.*, 1996).

Para recoger y determinar el amoníaco liberado de la solución de la muestra, se puede realizar mediante dos vías. En una de ellas, el amoníaco destilado se recoge en una solución que contenga un exceso conocido de un ácido patrón, dicho exceso se valora con un álcali patrón. La otra alternativa es más conveniente ya que requiere sólo una solución patrón e implica la recogida del amoníaco destilado sobre un exceso no medido de ácido bórico, que retiene al amoníaco según la siguiente reacción:



El ión dihidrógeno borato es una base razonablemente fuerte que puede valorarse con una solución patrón de ácido.



En la equivalencia la solución contiene ácido bórico e ión amonio, por lo que se requiere de un indicador con un intervalo de transición ácido. Existen destiladores en donde incluyen ya la titulación por medio de cambio de pH

De no contar con uno, la titulación volumétrica requiere de una solución estándar de ácido fuerte como el ácido clorhídrico o el ácido sulfúrico, de normalidad conocida.

Para obtener la concentración exacta de la solución ácida se titula con una base fuerte previamente estandarizada con un compuesto primario como es el ftalato ácido de potasio (Dominic *et* Wong, 1995).

Al momento de valorar la solución que contiene ácido bórico e ión amonio con la solución estándar de ácido, se conoce el volumen necesario para llegar al punto de equivalencia. Finalizando la valoración volumétrica y con los datos obtenidos se puede aplicar la siguiente fórmula para conocer el porcentaje de nitrógeno presente en la muestra:

Átomos-miligramos de N = (Volumen gastado) * (Normalidad del ácido)

Peso de N = Átomos-miligramo de N * 14.01 = mg de Nitrógeno

$$\text{Porcentaje de nitrógeno} = \frac{\text{Peso de nitrógeno}}{\text{Peso de la muestra}} * 100$$

Conociendo el porcentaje de nitrógeno se utiliza el factor correspondiente a la muestra y así obtener el porcentaje de proteína correspondiente (Skoog *et* West, 1994).

2.13 TEORIA DE OPERACIÓN DEL DETERMINADOR DE NITRÓGENO/PROTEÍNA LECO FP-528®

Anteriormente se mencionó que el método Dumas representaba ser un método complicado y tedioso, pero actualmente con el avance de la tecnología se ha logrado la automatización de dicho método (Souza *et al.*, 2000).

La compañía LECO (LECO Corporation St. Joseph, Michigan, 2000) aplicó el método desarrollado por Dumas a sus modelos de determinadores para N₂/proteína de los cuales están disponibles en el mercado los siguientes modelos:

- * Determinador simultáneo de CHNS-N₂/proteína truspec[®]
- * Determinador de N₂/proteína FP- 528[®] (figura 10).

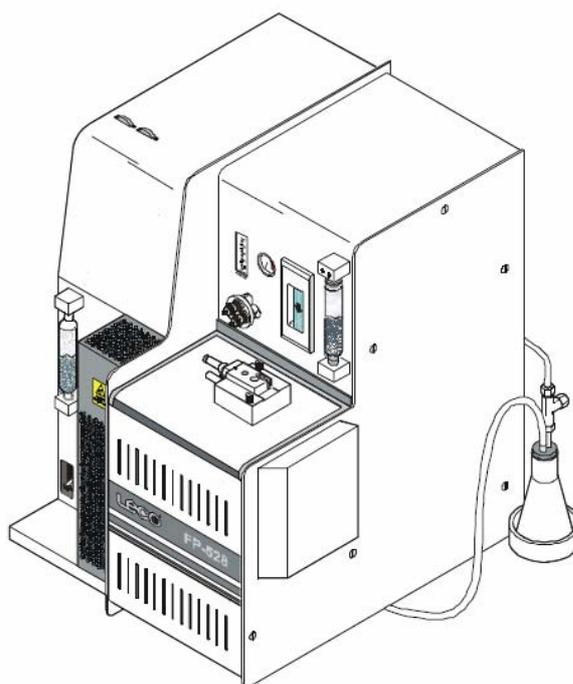


Figura 10. Determinador de nitrógeno/proteína LECO FP-528[®] (LECO, 2000).

Esencialmente, en cualquiera de los modelos LECO[®] la secuencia de operación, utilizando el método de combustión directa Dumas, está dividida en tres etapas:

2.13.1 Pesada

La muestra previamente desecada se pesa (aproximadamente de 0.1g) y se coloca en las cápsulas especiales (figura 11).



Figura 11. Técnica de pesada (LECO, 2000)

2.13.2 Ciclo de análisis

● Purga

La muestra pesada y envuelta en papel de estaño tin foil[®] es colocada en el cabezal de carga y es purgada de cualquier gas atmosférico que hubiera ingresado en el proceso de preparación de la misma, paralelamente el recipiente ballast[®] (figura 12) que colecta los gases de la combustión, también es purgado.

● Combustión

La muestra ingresa al horno (figura 12) calentado a 850°C aproximadamente y gas oxígeno puro ingresa para acelerar el proceso de combustión. Los productos de la combustión (CO₂, H₂O, NO_x, N₂) pasan a través de un filtro en el horno (figura 12) y por un enfriador termoeléctrico (figura 12), para quitar la humedad residual, después son recolectados en el ballast[®].

● Análisis

Los gases obtenidos en la combustión son homogeneizados en el ballast[®] a través de una mezcla pasiva. Una alícuota de 3 mL de muestra homogénea es capturada en el ballast[®] y es forzada a evacuarse mediante presión de aire seco. La muestra gaseosa de 3 mL pasa a

través de un tubo de cobre para remover el oxígeno y reducir los óxidos nitrosos a nitrógeno. La muestra continua su recorrido dentro del equipo pasando ahora por lecosorb[®] para remover el dióxido de carbono y por anhidrona para retener la humedad.

El nitrógeno liberado es arrastrado por una corriente de gas helio hacia una celda de conductividad térmica TC[®] (figura12) en donde se mide la concentración de N₂ presente en la muestra. El flujo de gas se muestra en la figura 13.

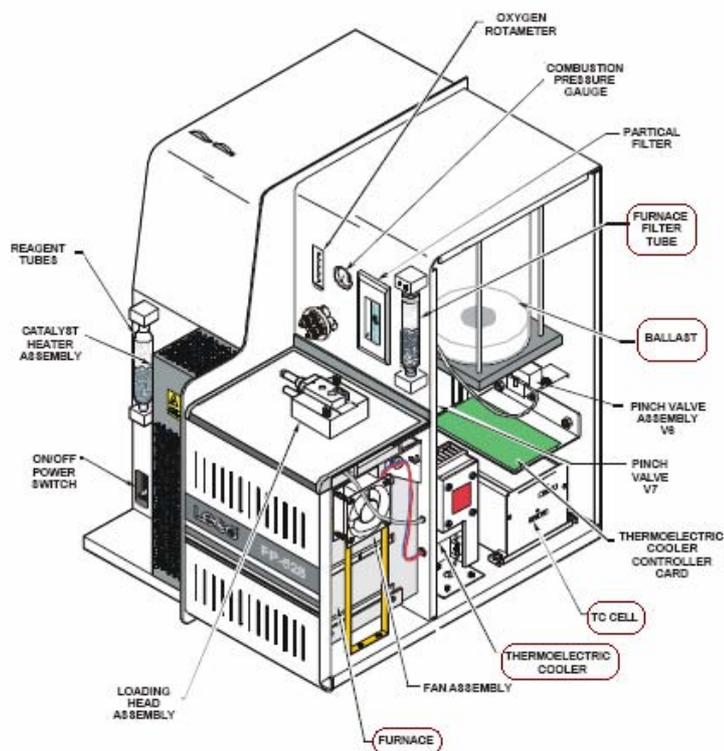


Figura 12. Ubicación del ballast[®], del horno, del enfriador termoelectrico de la celda de conductividad térmica y del filtro del horno dentro del equipo (LECO, 2000).

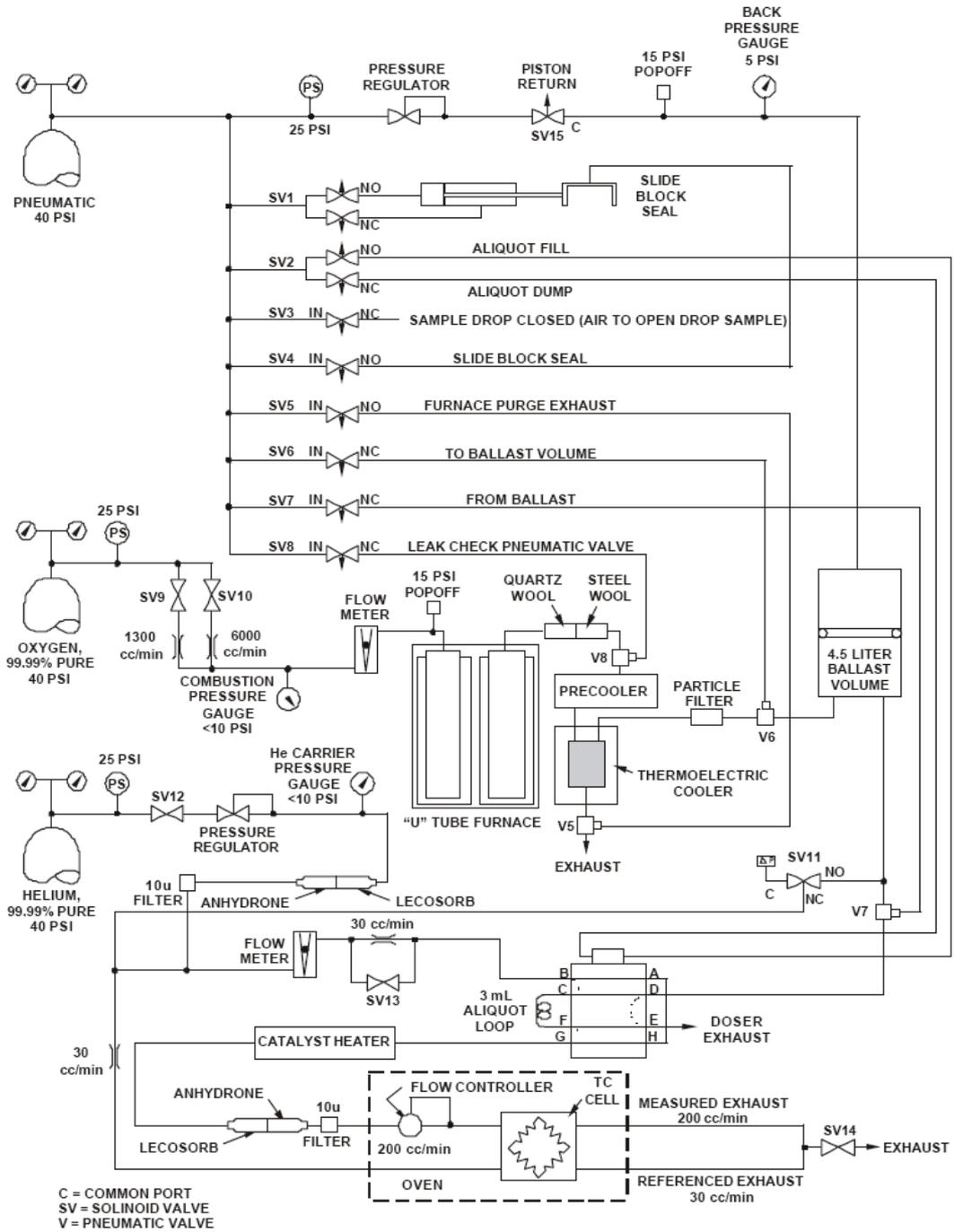


Figura 13. Flujo de gas en el equipo LECO FP-528® (LECO, 2000)

La cantidad de nitrógeno determina la magnitud de las lecturas. La sensibilidad del sistema es regida por la diferencia de conductividad térmica entre el gas análisis, nitrógeno, y el gas portador, helio (tabla 3).

Tabla 3. Conductividad térmica de gases (LECO, 2000)

Conductividad Térmica de Gases			
Gas	Símbolo	P. M.	Conductividad
Gas	H ₂	2	39
Helio	He	4	33
Neón	Ne	20	10.4
Oxígeno	O ₂	32	5.7
Nitrógeno	N ₂	28	5.6
Aire (seco)	Aire	29	5.4
Monóxido de Carbono	CO	28	5.4
Vapor de Agua	H ₂ O	18	4.0
Argón	Ar	40	3.8
Dióxido de Carbono	CO ₂	44	3.3
Dióxido de Sulfuro	SO ₂	64	1.6

2.13.3 Informe de resultado

El resultado final, expresado en porcentaje de nitrógeno, es mostrado en la computadora en donde es posible introducir los factores correspondientes a cada muestra y así obtener el porcentaje de proteína.

2.14 Características del equipo FP-258[®]

● Seguridad

No utiliza ácidos calientes y/o corrosivos ni catalizadores tóxicos como en el método Kjeldahl, lo que reduce la exposición a peligros propios del manejo de ácidos y bases fuertes.

● Ecológico

No utiliza sustancias tóxicas, por lo tanto no existe la necesidad de gestión de residuos, evitando de igual manera el almacenamiento de sustancias corrosivas, además de que cuenta con certificado expedido por la legislación ambiental vigente.

● Método de análisis primario

El equipo LECO FP-528[®] aplica un método aprobado por AOAC, AOCS y la calibración se realiza mediante la medición de sustancias estándares como el EDTA (Souza *et al.*, 2000).

● Productividad

El tiempo de análisis es de aproximadamente 4 minutos y puede operar hasta 35 muestras, con el uso de un carrusel, sin la necesidad de la intervención del operador.

El determinador FP-528[®] cuenta con un microprocesador basado en un software que controla el equipo y determina el contenido del nitrógeno en una variedad de materiales, incluyendo semillas, cereales productos de alimentación común, aceite, caucho, etc.

3. ■ OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Correlacionar la determinación de proteína mediante el método Kjeldahl con el método de combustión Dumas, en diversos grupos de alimentos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1. Determinar el contenido de nitrógeno mediante el método Kjeldahl en: cereales, legumbres, productos lácteos y productos cárnicos.

3.2.2. Determinar el contenido de nitrógeno mediante el método Dumas automatizado en: cereales, legumbres, productos lácteos y productos cárnicos.

3.2.3. Aplicar análisis estadístico a los resultados obtenidos.

3.2.4. Determinar si existe correlación o no en las determinaciones por ambos métodos.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 EQUIPO

- Balanza analítica Ohaus (USA, 1999).
- Campana de extracción Labconco (USA, 1990)
- Desecador Schott (USA, 1998)
- Determinador de N/proteína Lecho FP-528 (USA, 2000)
- Horno de secado Ohaus (USA, 1999).
- Molino Ohaus (USA, 1999)
- Parrilla de calentamiento con agitación, Thermolyne (USA, 2002)
- Procesador de alimentos Oster (USA, 2004)
- Refrigerador Labconco (USA, 1990)
- Sistema de aspiración y neutralización de vapores de ácidos agresivos Turbosog Gerhardt (Alemania, 2000)
- Sistema compacto de digestión de bloque manual Kjeldatherm Gerhardt (Alemania, 2000)
- Sistema de destilación con valoración integrada, Vapodest 50 Gerhardt (Alemania, 2000)

4.2 REACTIVOS

- Ácido bórico al 4% p/v
- Acido clorhídrico 0.1 N, estandarizado
- Aire seco comprimido_(g)
- Anhidrona (perclorato de magnesio anhidro granular).
- Azul de metileno
- Solución reguladora pH 4
- Solución reguladora pH 7
- Ftalafto ácido de potasio.
- Helio_(g) 99.99%
- Hidróxido de sodio 0.1 N
- Hidróxido de sodio 10% p/v
- Hidróxido de sodio 30% p/v
- Oxígeno_(g) al 99.99%
- Patrón Alfalfa 3.88 ± 0.05 % de N
- Patrón EDTA 9.57 ± 0.05 % de N
- Papel libre de nitrógeno
- Rojo de metilo
- Sulfato de cobre
- Sulfato de potasio
- Tabletas de catálisis, Kjeltabs, Foss Tekator: 5.0 g K_2SO_4 + 0.5 g $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$.

4.3 MUESTREO

Se tomaron muestras al azar, en lugares comunes de compra como central de abastos, mercados, tiendas, misceláneas y centros comerciales, cuatro grupos de alimentos: Cereales, productos cárnicos, productos lácteos y legumbres (Tabla 4.1, 4.2, 4.3, 4.4).

Tabla 4.1. Legumbres muestreadas ([referencia](#))

LEGUMBRES			
Nombre común	Nombre científico	Código	Fecha de muestreo
Ajonjolí	<i>Sesamun indicum</i>	AJ	27 Febrero 2006
Alverjón	<i>Pisum sativum L.</i>	AL	27 Febrero 2006
Amaranto	<i>Amarantus</i>	AM	27 Febrero 2006
Frijol flor de mayo		FM	06 Marzo 2006
Frijol negro	<i>Phaseolus vulgaris</i>	FN	06 Marzo 2006
Frijol San		SF	06 Marzo 2006
Garbanzo	<i>Cicerarie tinum L.</i>	GA	06 Marzo 2006
Haba	<i>Vicia faba L.</i>	HAB	08 Marzo 2006
Lenteja	<i>Lens Culinaris</i>	LE	08 Marzo 2006
Linaza		LN	08 Marzo 2006

Tabla 4.2. Cereales muestreados

C E R E A L E S			
Nombre común	Nombre científico	Código	Fecha de
Arroz	<i>Oryza sativa L.</i>	AR	02 Marzo 2006
Avena con cascarilla	<i>Avena sativa L.</i>	AVC	02 Marzo 2006
Avena descascarillada		AV	05 Marzo 2006
Cebada esperanza		CE	05 Marzo 2006
Maíz blanco	<i>Zea mays L.</i>	MBL	08Marzo 2006
Maíz dorado		MD	12 Marzo 2006
Mijo blanco		MB	12 Marzo 2006
Mijo rojo		MR	12 Marzo 2006
Trigo blando	<i>Triticum sativum L.</i>	TB	15 Marzo 2006
Trigo duro		TD	15 Marzo 2006

Tabla 4.3. Productos lácteos muestreados

PRODUCTOS LÁCTEOS		
Muestra	Código	Fecha de muestreo
Crema pura de vaca	CAL	28 Agosto 2006
Leche entera en polvo	LPN	28 Agosto 2006
Leche condensada azucarada	LCN	28 Agosto 2006
Natilla de leche	NLR	30 Agosto 2006
Producto lácteo fermentado "B"	FLB	30 Agosto 2006
Producto lácteo fermentado "C"	FLC	03 Septiembre 2006
Queso fresco blanco	QFB	03 Septiembre 2006
Queso fresco estilo Oaxaca	QEO	03 Septiembre 2006
Queso tipo Americano	QTA	05 Septiembre 2006
Queso tipo Manchego	QMC	05 Septiembre 2006
Queso tipo petit suisse "C"	QPC	05 Septiembre 2006
Queso tipo petit suisse "D"	QPD	05 Septiembre 2006
Yogurt con fresas	YFY	07 Septiembre 2006
Yogurt para beber	YBA	07 Septiembre 2006
Yogurt para beber	YBB	07 Septiembre 2006

Tabla 4.4. Productos cárnicos muestreados

PRODUCTOS CÁRNICOS		
Muestra	Código	Fecha de muestreo
Chorizo estilo Cantimpalo	CHCZ	21 Junio 2006
Chorizo casero	CHC	21 Junio 2006
Filete de res fresco	FRF	21 Junio 2006
Hígado de pollo fresco	HPF	22 Junio 2006
Jamón de cerdo	JCV	22 Junio 2006
Jamón de pavo	JPZ	22 Junio 2006
Longaniza casera fresca	LCF	24 Junio 2006
Mortadela	MTK	24 Junio 2006
Paté de cerdo	ZPC	24 Junio 2006
Pechuga de pollo fresca	PPF	27 Junio 2006
Pierna de cerdo fresca	PCF	27 Junio 2006
Pulpo fresco	PF	28 Junio 2006
Queso de puerco	QFP	28 Junio 2006
Salchicha Viena	SVB	31 Junio 2006
Salchichas de pavo	SPF	31 Junio 2006
Tocino ahumado	TAK	31 Junio 2006

Una vez definidas, las muestras se codificaron con letras representativas. Las muestras de semillas como son cereales y legumbres se trituraron en un molino y las muestras de productos cárnicos y lácteos se trituraron en un procesador de alimentos, con la finalidad de reducir el tamaño de partícula.

Posteriormente, se metieron en un horno de secado a una temperatura de $100^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ durante 6 hrs. Transcurrido ese tiempo se dejan enfriar en un desecador y se procede a pesar las muestras para la determinación de nitrógeno por triplicado en ambos métodos.

4.4 DETERMINACION DE NÍTRÓGENO Y PROTEÍNA POR EL MÉTODO KJELDAHL

4.4.1 Digestión

Con las muestras desecadas y atemperadas, se pesan en papel libre de nitrógeno alrededor de 1 g de muestra y se colocan en un tubo para digestión de 250 mL, se adiciona, 1 Kjeltab y 15 mL de ácido sulfúrico concentrado.

El calentamiento se lleva a cabo paulatinamente con las temperaturas y tiempos mostrados en la tabla 5, se toma en cuenta que, a partir de los 400°C los tiempos varían debido al tamaño y naturaleza de la muestra, el tiempo real consumido por bloque de ocho muestras es de aproximadamente 4-6 hrs, la digestión se da por terminada cuando la muestra es totalmente líquida y adquiere un color verde esmeralda claro.

Tabla 5. Temperaturas y tiempos utilizadas para llevar a cabo la digestión de la muestra

Temperatura °C	Tiempo en minutos
230	30
260	5
300	15
400	20
405	Hasta clarificar muestra

El equipo digestor utilizado en este trabajo de investigación se encuentra en el laboratorio de Nutrición en las instalaciones del Instituto de Ciencias de la Salud (ICSA) de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH).

Consta de un bloque de digestión Kjeldatherm[®] de aluminio (Figura 14) con capacidad para ocho tubos de digestión. Su óptima utilización de la energía así como el aislamiento efectivo en todo su alrededor proporcionan una retención de calor uniforme.

La gradilla de aluminio cuenta con pantalla de protección integrada y ventana para una observación fácil y segura de las muestras, además, de que dispone de dos asas aisladas térmicamente lo que reduce considerablemente el riesgo de quemaduras por ácido y temperatura lo cual es una ventaja para el trabajo realizado.

Para llevar a cabo el control de temperatura adecuado el equipo de digestión cuenta con un controlador electrónico de temperatura instalado lateralmente en el sistema con ajuste de valor teórico mediante teclado, pantalla digital que muestra temperatura actual y seleccionada y un intervalo de temperatura de 0 a 430°C con una precisión menor a 0.5%.



Figura 14. Bloque de digestión Kjeldatherm® (Gerhardt, 2000)

Conforme se aumenta la temperatura, el ácido comienza a desprender gases, por ello, anteriormente la digestión se llevaba a cabo bajo una campana de extracción.

Los problemas de seguridad que presenta esta técnica y por cuestiones ambientales el sistema cuenta con una unidad depuradora Turbosog® (Figura 15) que se utiliza para la aspiración y neutralización de vapores de ácido pasándolos por agua destilada y después se neutraliza con una solución de hidróxido de sodio al 10% p/v.



Figura 15. Unidad depuradora Turbosog® (Gerhardt, 2000)

En el laboratorio el equipo se encuentra dispuesto como se observa en la figura 16.



Figura 16. Equipo completo de digestión Gerhardt® 2000.

4.4.2 Destilación

Después que se lleva a cabo la digestión, los tubos se dejan enfriar hasta alcanzar temperatura ambiente, se desconectan de la unidad depuradora y se colocan uno a uno en el sistema de destilación con valoración integrada que se muestra en la figura 17, Vapodest 50® (Gerhardt, 2000).



Figura 17. Sistema de destilación con valoración integrada Vapodest 50[®] (Gerhardt, 2000). Este equipo cuenta con sistema de adición de agua e hidróxido de sodio automático, así como control de tiempo y potencia de vapor y la determinación se lleva a cabo mediante diferencia de pH.

Para el presente trabajo se utilizaron valores predeterminados de volumen de soluciones y potencia (Tabla 6), que se programaron directamente en la memoria del equipo, lo que nos permitió obtener una reproducibilidad en los resultados.

Tabla 6. Valores de la programación para llevar a cabo la destilación de la muestra.

Solución	Volumen adicionado
Agua destilada	60 mL
Hidróxido de sodio al 30% p/v	70 mL
Acido bórico al 3% p/v pH= 4.7	40 mL

La utilización de este tipo de destilador es segura debido a que cuenta con una puerta de protección contra salpicaduras, a demás de que todos los elementos de vidrio se encuentran montados de forma visible lo cual facilita la observación de la destilación en marcha.

Este sistema cuenta con un sensor que permite que las destilaciones se inicien sólo cuando los tubos están colocados correctamente. El generador de vapor, trabaja automáticamente con control de presión.

4.4.3 Titulación

Para la titulación es necesario contar con una solución ácido clorhídrico estandarizada 1 N. El contenedor de la solución de ácido bórico denominado reservorio (Figura 18) está conectado al equipo destilador en donde la celda detector de pH debe registrar una medida igual a 4.6 ± 0.01 .

Cuando comienza la destilación el amoniaco liberado y condensado cae en dicho contenedor y es agitado, al combinarse con el ácido bórico se forma el ión hidrógeno borato, base relativamente fuerte, que produce un incremento en el pH de la solución, el incremento es detectado por el electrodo de pH y cuando el incremento es igual a una unidad de pH, automáticamente inicia la adición de la solución de ácido clorhídrico 1N.

La destilación se detiene y la adición de ácido clorhídrico continúa hasta que el electrodo detecta nuevamente un $\text{pH} = 4.6 \pm 0.1$, ahí se da por terminada la titulación, por último el sistema procesa los datos obtenidos, envía la señal y el resultado aparece en la pantalla expresado en porcentaje de nitrógeno. La adición de ácido se lleva a cabo mediante una bomba de microdosificación integrada en el equipo destilador.



Figura 18. Reservorio integrado en el equipo.

En el laboratorio la disposición del equipo para determinar nitrógeno mediante el método Kjeldahl-Gunning se observa en la figura 19, en donde la utilización de este equipo no requiere del trabajo dentro de una campana de extracción, a pesar de ello, se deben

conservar las medidas de seguridad correspondientes al manejo de reactivos altamente peligrosos.



Figura 19. Disposición del equipo Gerhardt® 2000

En la figura 20 se observa el diagrama de flujo que se siguió para la aplicación del método Kjeldahl-Gunning para determinación de nitrógeno y proteína.

4.5 DETERMINACIÓN DE NITRÓGENO Y PROTEÍNA POR MEDIO DEL MÉTODO DUMAS AUTOMATIZADO

La determinación de nitrógeno mediante el método de combustión Dumas automatizado se realizó en el determinador de nitrógeno/proteína LECO FP-528[®] (Figura 21).



Figura 21. Determinador de nitrógeno/proteína LECO FP-528[®] (LECO, 2000)

El equipo se encuentra en el Laboratorio de Alimentos II del Centro de Investigaciones Químicas (CIQ). Para su instalación se requiere de conexión de los gases, que como se mencionó en la introducción, los gases a utilizar son: aire seco comprimido, helio al 99.99% y oxígeno al 99.99%.

Para la operación del equipo se cuenta con un software instalado en la computadora con sistema operativo Windows 98[®] de Microsoft[®], desde donde se controlan todas las operaciones del equipo.

Antes de comenzar el análisis el horno del equipo se calienta a una temperatura de 850°C, y se deja que la temperatura se estabilice por un tiempo de 2 hrs, al término de ese tiempo, se inspecciona que todos los parámetros requeridos para el funcionamiento del equipo estuvieran dentro de su rango, estos parámetros son previamente definidos al crear un método de análisis (Tabla 7).

Tabla 7. Parámetros utilizados en la operación del equipo LECO FP-528.

Parámetros	Rango de valores	Unidad
Celda de conductividad térmica	4.0 3.55 a 4.45	V
Celda de conductividad térmica	90 88 a 92	ma
Presión del sistema	—	mm de Hg
Horno de combustión	850-825 a 875	°C
Temperatura de catálisis	750-725 a 750	°C
Control de flujo	40-38 a 42	°C
Control de enfriamiento	r	—
Temperatura de enfriamiento	2 a 10	°C

Después de que de verificar los parámetros, se inspecciona que las presiones de los gases estuvieran dentro de los valores correctos y se procede a realizar una prueba de fugas.

La prueba tiene como finalidad confirmar que efectivamente no existan fugas para que el equipo funcione correctamente.

Una vez verificados todos los parámetros se procede a analizar una serie de “blancos” para excluir el nitrógeno presente en el ambiente, los blancos se corren hasta que los valores reportados sean menores a $0.01\% \pm 0.005$ de nitrógeno. Cuando se alcanzan valores inferiores de 0.01% de nitrógeno, se introduce la calibración para blancos.

El siguiente paso es calibrar el equipo es la calibración del equipo. En este caso se utilizaran dos patrones, alfalfa (LECO) con un contenido de nitrógeno de $3.88 \pm 0.05 \%$ y EDTA (LECO) con un contenido de nitrógeno de $4.57 \pm 0.05 \%$.

Después de que se lleva a cabo el ajuste de blancos y la calibración, se procede a iniciar los análisis correspondientes, las muestras se pesan (0.1 g) en las cápsulas tin foil® (Figura 22), se corre la muestra, se inspecciona siempre el transcurso de ésta y en cada intervalo de análisis se revisan los parámetros predeterminados en el método.

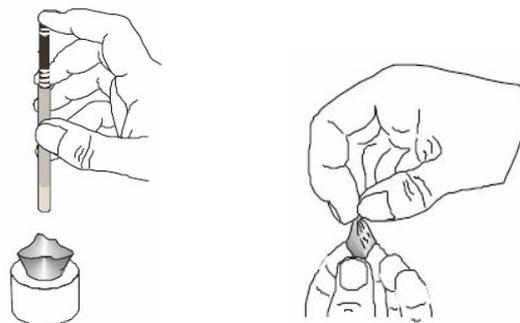


Figura 22. Técnica de pesada (LECO, 2000)

Los resultados obtenidos se exportan directamente del programa a una hoja de cálculo en donde se realiza el correspondiente tratamiento estadístico. El procedimiento se muestra en el diagrama de flujo de la figura 23.

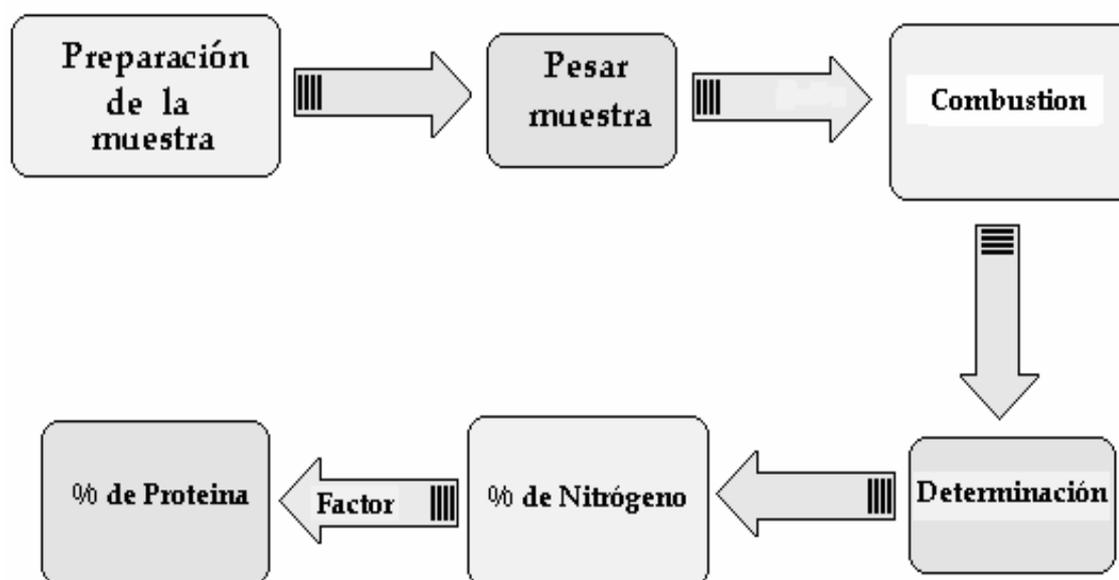


Figura 23. Diagrama de flujo para el método Dumas automatizado (LECO, 2000).

De los métodos empleados se obtuvieron resultados de % de nitrógeno total en base seca, los factores de conversión para obtener el % de proteína se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Valores de los factores de conversión utilizados para la expresión de resultados en porcentaje de proteína (Bourges *et al.*, 1993).

Código	Factor
MB, MR, TD, TB y CE	5.83
MD, AM, AR, AL, AVC, MBL, AVC, SF, LE, FN, AV, AJ, HAB, GA y FM	6.25
Productos Cárnicos	6.25
Productos Lácteos	6.38

4.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para los diferentes análisis estadísticos, ANOVA, prueba de hipótesis y regresión lineal se utilizó el programa estadístico Statgraphics versión 4.0.

Para ambos métodos, los datos obtenidos se reportaron en porcentaje de nitrógeno, a los cuales se les aplicó la prueba de comparación de medias y el análisis de sesgo.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 LEGUMBRES Y CEREALES

Las legumbres y cereales son muy importantes desde el punto de vista nutricional debido a que son un alimento vegetal ampliamente disponible por ello, son productos en los que se basan las dietas de la mayoría de los países en vías de desarrollo.

Contienen además de carbohidratos una buena cantidad de proteína y vitaminas, cuando las legumbres y los cereales se consumen en una misma dieta, suministran una mezcla de proteínas con buena cantidad de aminoácidos esenciales, lo que mejora el valor proteico de la dieta a pesar de las deficiencias en algunos aminoácidos como la lisina en el caso de los cereales, y la metionina en el caso de las legumbres (Cheftel *et al.* 1989).

La estructura de las legumbres y cereales es básicamente la misma, la figura 24 muestra el corte transversal de un grano de trigo, en donde se observan las tres partes fundamentales, salvado o cascarilla, almendra harinosa o endospermo y germen o embrión.

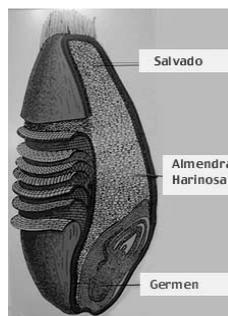


Figura 24. Corte transversal de un grano de trigo entero (<http://www.trigopan.com> mayo, 2007).

En los cereales y las legumbres el albumen está constituido por células que contienen gránulos de almidón y proteínas de reserva, durante la etapa de maduración, una gran parte de las proteínas de reserva se encuentran en el interior de unos glóbulos esféricos

denominados cuerpos proteicos, en el caso del trigo, la membrana de los cuerpos proteicos se destruye durante la maduración, las proteínas liberadas rodean a los gránulos de almidón. Por el contrario en las legumbres y en la mayoría de los demás cereales, se tiene que, los cuerpos proteínicos persisten durante la maduración.

En éste estudio se analizaron legumbres y cereales sin cascarilla, debido a que, en la mayoría de los caso es la forma de consumo. La excepción fue la muestra de avena en donde se realizó el análisis con grano descascarillado y grano entero. Los resultados obtenidos por los dos métodos de análisis para las muestras de legumbres se observan en la tabla 9.

Tabla 9. Porcentajes de nitrógeno y proteína sobre extracto seco (desviación estándar) en legumbres, obtenidos por el método Kjeldahl y el método Dumas automatizado.

LEGUMBRES				
Muestras	Porcentaje de nitrógeno		Porcentaje de proteína	
	Kjeldahl	Dumas	Kjeldahl	Dumas
AJ	3.632 ^a (0.009)	3.641 ^a (0.001)	22.699 (0.056)	22.755 (0.004)
AL	3.703 ^a (0.108)	3.760 ^a (0.008)	23.143 (0.673)	23.502 (0.049)
AM	2.225 ^a (0.001)	2.463 ^b (0.009)	13.904 (0.007)	15.397 (0.057)
FM	3.763 ^a (0.028)	3.795 ^a (0.0001)	23.515 (0.173)	23.716 (0.001)
FN	3.511 ^a (0.061)	3.574 ^a (0.004)	21.941 (0.383)	22.339 (0.022)
SF	3.504 ^a (0.051)	3.533 ^a (0.008)	21.898 (0.320)	22.082 (0.049)
GA	3.845 ^a (0.035)	3.822 ^a (0.002)	24.027 (0.216)	23.889 (0.012)
HAB	4.636 ^a (0.008)	4.675 ^a (0.001)	28.970 (0.047)	29.218 (0.006)
LE	4.036 ^a (0.007)	4.022 ^a (0.006)	25.223 (0.046)	25.140 (0.035)
LN	4.029 ^a (0.006)	4.117 ^b (0.005)	25.178 (0.035)	25.729 (0.033)

^{a, b} Medias con diferente letra en la misma fila son diferentes (P<0.05)

Para las muestras de legumbres, aplicando el análisis de varianza, se tiene que de la totalidad de las muestras el 80% nos da muestras iguales y el 20% nos da muestras diferentes significativamente ($P < 0.05$), lo que resulta interesante, puesto que es precisamente en estas dos muestras, Amaranto y Linaza (AM y LN) es en donde se presentaron problemas de homogenización debido al alto contenido de grasa.

Para llevar a cabo la determinación mediante el método Kjeldahl se debe tomar en cuenta que la transformación de nitrógeno depende del estado de combinación en la muestra.

Si bien se sabe que el nitrógeno amínico y amídico se transforma en ión amonio, también se tiene conocimiento que la presencia de grupos nitro, azo y azoxi, presentes en la muestra pueden originar resultados por encima o por debajo de los esperados, en este caso en la determinación de nitrógeno mediante el método Dumas automatizado el nitrógeno presente en la muestra fue totalmente cuantificado y por lo tanto arroja valores más altos.

Las muestras de garbanzo y lenteja (GA y LE, respectivamente) no presentan esta tendencia esto pudiera deberse a la naturaleza heterogénea de las muestras.

El análisis de las desviaciones indica que el método Kjeldahl presenta desviaciones más altas lo que sugiere una mayor dispersión en los resultados obtenidos. En la tabla 10 se representan valores de porcentaje de nitrógeno para algunas legumbres.

Tabla 10. Valores reportados por Senser *et al.* (1991) para legumbres.

VALORES REPORTADOS	
LEGUMBRES	
Muestra	Porcentaje de proteína
Sésamo (ajonjolí) blanco y seco	29.22
Alberjón	25.73
Frijol, grano seco	23.23
Garbanzo	24.49
Lenteja semilla seca	25.91
Linaza, grano seco	26.52

De acuerdo a los valores reportados por Senser *et al.* (1991), se tiene que para las muestras de frijol, garbanzo lenteja y linaza (FM, GA LE y LN, respectivamente), se obtuvieron valores muy cercanos. No así para la muestra de ajonjolí (AJ) en donde la diferencia del valor obtenido por ambos métodos al reportado por Senser *et al.* (1991), es mayor hasta por un 7%. Rossi *et al.* (2004) reportan un valor de porcentaje de nitrógeno de 4.74 en extracto seco para la lenteja (LE), valor muy próximo al obtenido por ambos métodos, esta comparación nos arroja como resultado que los valores aquí descritos y los reportados con anterioridad son valores semejantes.

Para las muestras de cereales, los valores obtenidos de porcentaje de nitrógeno y proteína por ambos métodos se presentan en la tabla 11.

Tabla 11. Porcentajes de nitrógeno y de proteína sobre extracto seco (desviación estándar) en cereales, obtenidos por el método Kjeldahl y el método Dumas automatizado.

CEREALES				
Muestras	Porcentaje de nitrógeno		Porcentaje de proteína	
	Kjeldahl	Dumas	Kjeldahl	Dumas
AR	1.119 ^a (0.039)	1.250 ^b (0.018)	6.658 (0.234)	7.439 (0.105)
AV	1.742 ^a (0.012)	2.333 ^b (0.0002)	10.886 (0.074)	14.578 (0.001)
AVC	1.462 ^a (0.016)	1.574 ^b (0.007)	9.139 (0.101)	9.834 (0.041)
CE	1.695 ^a (0.051)	1.908 ^b (0.003)	9.882 (0.296)	11.121 (0.116)
MBL	1.110 ^a (0.010)	1.288 ^b (0.002)	6.936 (0.063)	8.052 (0.001)
MD	1.560 ^a (0.034)	1.761 ^b (0.003)	9.748 (0.212)	11.006 (0.016)
MB	1.639 ^a (0.008)	1.672 ^b (0.004)	9.558 (0.047)	9.747 (0.021)
MR	2.265 ^a (0.020)	2.255 ^a (0.019)	13.207 (0.118)	13.149 (0.113)
TD	2.196 ^a (0.017)	2.312 ^b (0.009)	12.800 (0.097)	13.479 (0.050)

^{a, b} Medias con diferente letra en la misma fila son diferentes ($P < 0.05$)

En los resultados presentados en la tabla 11 se observa nuevamente la tendencia de que el método Kjeldahl presente desviaciones más altas entre muestra comparadas con las obtenidas de la determinación por el método Dumas automatizado, presentando por tanto mayor dispersión en resultados. La dispersión dentro de la aplicación del método Kjeldahl puede ser atribuida a que en éste método se tiene mayor número de factores y procesos en donde se toma en cuenta que puede intervenir más el error humano.

Las desviaciones estándar para ambos métodos son bajas presentando un máximo de 0.051 para el método Kjeldahl y un máximo de 0.019 para el método Dumas automatizado. También se observa que en el caso de la avena con cascarilla (AV) la desviación estándar es alta comparada con el resto de las muestras, y los valores obtenidos entre los dos métodos son significativamente diferentes.

La presencia de cascarilla, aunado al taño de muestra que, al momento del análisis, se pudo haber tomado más cascarilla en alguna muestra y en otras mayor parte de albumen lo que pudiera explicar la variación de porcentaje de nitrógeno entre métodos, en esta muestra en especial.

Para el análisis estadístico total se excluyó este valor, que afectaría de sobremanera la correlación que se espera encontrar.

En la tabla 12 se observan valores reportados con anterioridad para este tipo de muestras.

Tabla 12. Porcentajes de proteína en extracto seco, reportados por Senser *et al.* (1991) para algunos cereales.

C E R E A L E S	
Muestra	Porcentaje de Proteína
Arroz perlado	8.29
Avena, grano entero	20.69
Cebada, grano entero	16.09
Maíz, grano seco	9.71
Mijo, grano seco	11.15
Trigo, grano entero	13.88

Los valores obtenidos fueron inferiores a los reportados por Senser *et al.* (1991) hasta por 10% como en el caso de la avena (AV).

Rossi *et al.* (2004) reporta valores para maíz (MBL) de 1.78 % de nitrógeno en extracto seco. Cabe mencionar que en especial, las legumbres y cereales presentan una pérdida y variación durante el almacenamiento debido condiciones ambientales como humedad y tratamiento como molienda por ello los resultados obtenidos se toman como aceptables, comparativamente hablando (Cheftel *et al.* 1989).

5.2 PRODUCTOS LÁCTEOS

Las proteínas de la leche son las proteínas animales que desde hace más tiempo y en mayor cantidad consumen los humanos.

La leche de vaca, es la más consumida en el mundo, su producción cobra gran importancia debido a que es utilizada para reemplazar la leche materna y como alimento proteico esencial de los adultos (Ranken, 1980).

Dentro del sistema proteínico de la leche de vaca las caseínas (proteínas lácteas perteneciente al grupo de fosfoproteídos) representan el 80% de las proteínas presentes; el resto está constituido por β -lactoglobulina (alrededor del 10% de las proteínas totales), α -lactoalbúmina (en torno al 2% de las proteínas totales) y pequeñas cantidades de diversas proteínas (enzimas, inmunoglobulinas, etc.).

Cuando se coagulan las caseínas, quedan en solución las otras proteínas; conjuntamente con la lactosa y sales minerales para constituir el llamado lactosuero.

La fracción caseínica comprende varios tipos de moléculas de las cuales el 50% aproximadamente es de α -caseínas, 30% de β -caseína, 15% de κ -caseína y 5% de λ -caseína (Santos, 1987).

En la tabla 13 se observan los resultados de valores medios obtenidos del análisis por triplicado de las muestras de productos lácteos con su respectiva desviación estándar, expresados en porcentaje de nitrógeno y proteína en base seca.

Tabla 13. Porcentajes de nitrógeno y de proteína sobre extractos seco (desviación estándar) en productos lácteos, obtenidos por el método Kjeldahl y el método Dumas automatizado.

L Á C T E O S				
Muestras	Porcentaje de nitrógeno		Porcentaje de proteína	
	Kjeldahl	Dumas	Kjeldahl	Dumas
CAL	1.253 ^a (0.0418)	1.312 ^a (0.024)	7.994(0.267)	8.373(0.151)
LCN	1.218 ^a (0.015)	1.357 ^b (0.021)	7.771(0.096)	8.659(0.131)
LPN	3.686 ^a (0.016)	3.740 ^b (0.013)	23.519(0.099)	23.859(0.085)
NLR	0.968 ^b (0.026)	0.890 ^a (0.006)	6.176(0.165)	5.678(0.041)
FLB	1.250 ^a (0.044)	1.224 ^a (0.005)	7.973(0.278)	7.811(0.034)
FLC	1.346 ^a (0.042)	1.343 ^a (0.020)	8.585(0.265)	8.571(0.128)
QFB	5.242 ^a (0.133)	5.348 ^a (0.059)	33.444(0.851)	34.120(0.376)
QEO	7.274 ^b (0.019)	7.232 ^a (0.013)	46.406(0.123)	46.142(0.080)
QTA	2.468 ^a (0.013)	2.522 ^b (0.016)	15.746(0.083)	16.093(0.099)
QMC	4.792 ^b (0.008)	4.722 ^a (0.022)	30.571(0.053)	30.124(0.140)
QPC	3.550 ^a (0.038)	3.460 ^b (0.006)	22.651(0.240)	22.201(0.036)
QPD	2.899 ^a (0.003)	2.997 ^b (0.049)	18.496(0.017)	19.121(0.312)
YBA	3.399 ^b (0.233)	1.547 ^a (0.008)	21.684(1.488)	9.867(0.048)
YBB	2.181 ^a (0.013)	2.228 ^a (0.027)	13.917(0.079)	14.212(0.172)
YFY	2.244 ^a (0.026)	2.166 ^a (0.163)	14.319(0.163)	13.822(1.042)

^{a, b} Medias con diferente letra en la misma muestra son diferentes (P<0.05)

Si observamos la desviación estándar de cada uno de los productos lácteos nuevamente el método Kjeldahl presenta mayor dispersión en los resultados puesto que las desviaciones son más altas, exceptuando el caso de la muestra YFY en donde las desviación estándar es mayor en el método Dumas automatizado, sin embargo la dispersión de resultados totales no es elevada por tanto se puede hablar de precisión tanto en el método Kjeldahl como en el

método Dumas automatizado, exceptuando la muestra correspondiente a yogurt casero (YBA), que presenta elevada dispersión y podría ser debido a un error presente en la toma de muestra.

Dentro de los resultados obtenidos y de acuerdo al análisis de varianza se tiene que un 40% de la totalidad de las muestras analizadas son muestras iguales y el 60% son muestras diferentes.

Analizando los valores entre métodos, tenemos que las muestras de crema ácida, leche condensada, leche en polvo, queso fresco blanco, queso tipo americano, queso manchego, queso tipo petit suisse "C", queso tipo petit suisse "D", y yogurt para beber (CAL, LCN, LPN, QFB, QTA, QMC, QPC, QPD, y YBB, respectivamente) arrojan resultados mayores mediante el análisis por el método Dumas automatizado, no así las muestras de natilla de leche, producto lácteo fermentado "B", producto lácteo fermentado "C", queso estilo Oaxaca y yogurt con frutas (NLR, FLB, FLC, QEO y YFY, respectivamente) que dan resultados más altos en el método Kjeldahl

Tomando en cuenta la naturaleza de las muestras podremos observar que según lo expuesto por Santos (1987) la presencia de peróxido de hidrógeno en este tipo de muestras es muy común, ya sea por adición directa de los productores como medio antimicrobiano o como producto biológico de la lactoperoxidasa, abundante en la leche de vaca

De acuerdo a Kirk *et al.* (2002) en presencia de peróxido de hidrógeno en la matriz de la muestra la oxidación a elevadas temperaturas, una mínima fracción del nitrógeno total sufre una parcial oxidación del ión amonio produciendo compuestos volátiles que serán atrapados en el material desecante lo que producirá resultados ligeramente más bajos que en la determinación mediante el método Dumas.

Para algunos productos lácteos Senser *et al.* (1991) reportan valores de proteína en extracto seco, que se muestran en la tabla 14.

Tabla 14. Valores reportados por Senser *et al.* (1991) para productos lácteos.

L À C T E O S	
Producto	Porcentaje de proteína
Crema pura de vaca acidificada	10.98
Leche entera en polvo 3% humedad	25.98
Leche, condensada, azucarada al 60%	11.27
Producto lácteo fermentado dulce	10.94
Queso fresco blanco	36.74
Queso fresco para fundir	48.05
Queso tipo Americano	20.65
Queso tipo Manchego	31.09
Yogurt natural	16.96
Yogurt con Fruta	15.23

Comparado con los resultados en cereales y legumbres, existe mayor diferencia en los productos lácteos con los reportados por Senser *et al.* (1991) esto pudiera deberse a que en los productos lácteos se presenta una variación métodos y técnicas de elaboración, que se reflejan en el porcentaje de proteína.

5.3 PRODUCTOS CÁRNICOS

Las carnes y productos cárnicos son consumidos desde la antigüedad, su consumo esta fuertemente ligado al desarrollo de técnicas de caza y domesticación de animales como fuente de alimentación, así mismo, al desarrollo de técnicas de conservación por largos periodos de tiempo, ya que en condiciones normales la carne se descompone y deteriora con facilidad (Price et Schweigert, 1994).

Según el Price et Schweigert (1994), la carne es la parte comestible de los músculos de animales sacrificados en condiciones higiénicas, incluye vaca, oveja, cerdo, cabra, caballo y camélidos sanos, y se aplica también a animales de corral, caza, de pelo y plumas y animales marinos, declarados aptos para el consumo humano. Los derivados cárnicos, son productos alimenticios preparados total o parcialmente con carne o despojos de las especies autorizadas.

El músculo en general contiene de 55 a 78% de agua, de 1 a 15% de lípidos y de 1 a 22 % de proteínas, las porciones restantes son sales minerales y glúcidos, estas cifras revelan que las proteínas representan del 50 al 90% de la materia orgánica de la carne (Price et Schweigert, 1994).

Dentro de las proteínas de origen animal, las provenientes de la carne son las de mayor importancia, son completas y con elevado valor biológico (Olivares, 1989).

Considerando esto, las muestras de cárnicos fueron tanto carne fresca de distintas especies, como productos procesados.

En la tabla 15 se observan los valores medios obtenidos del análisis por triplicado de las muestras de productos cárnicos con su respectiva desviación estándar, expresados en porcentaje de nitrógeno y proteína reportado en base seca.

Tabla 15. Porcentaje de nitrógeno y proteína sobre extracto seco (desviación estándar) en productos cárnicos, obtenidos por el método Kjeldahl y el método Dumas automatizado.

C Á R N I C O S				
Muestras	Kjeldahl	Dumas	Kjeldahl	Dumas
	Porcentaje de nitrógeno	Porcentaje de nitrógeno	Porcentaje de proteína	Porcentaje de proteína
CHCZ	5.739 ^a (0.0331)	5.765 ^a (0.0938)	35.869(0.2066)	36.029(0.5862)
CHC	4.410 ^b (0.0622)	4.257 ^a (0.0220)	27.560(0.3889)	26.603(0.1374)
FRF	10.947 ^a (0.0175)	11.070 ^b (0.0563)	68.379(0.1094)	69.185(0.3517)
HPF	7.754 ^b (0.0117)	7.360 ^a (0.0490)	48.460(0.0730)	46.000(0.3060)
JPZ	7.801 ^a (0.0895)	7.683 ^a (0.0065)	48.754(0.5592)	48.017(0.0407)
JVC	6.119 ^a (0.0476)	6.160 ^a (0.0119)	38.246(0.2978)	38.499(0.0747)
LCF	3.099 ^a (0.0159)	3.035 ^a (0.1195)	19.367(0.0993)	18.968(0.7471)
MTK	4.134 ^b (0.0055)	4.006 ^a (0.0111)	25.835(0.0344)	25.039(0.0692)
ZPC	5.018 ^a (0.0903)	4.925 ^a (0.0085)	31.365(0.5646)	30.784(0.0529)
PPF	14.048 ^b (0.0555)	13.657 ^a (0.0159)	87.798(0.03469)	85.356(0.0993)
PCF	10.525 ^b (0.0020)	10.347 ^a (0.0273)	65.781 (0.0125)	64.666(0.1706)
PF	12.944 ^a (0.0731)	13.121 ^a (0.1105)	80.902 (0.4570)	82.004(0.6907)
QFP	9.378 ^b (0.0127)	9.176 ^a (0.0087)	58.610 (0.0791)	57.348(0.0542)
SVB	5.731 ^b (0.0015)	5.484 ^a (0.0013)	35.817 (0.0095)	34.275(0.0082)
SPF	4.937 ^a (0.0413)	5.364 ^b (0.0377)	30.854 (0.2581)	33.522(0.2354)
TAK	5.954 ^b (0.0165)	5.533 ^a (0.0272)	37.210 (0.1031)	34.579(0.1699)

^{a, b} Medias con diferente letra en la misma muestra son diferentes (P<0.05)

Dentro de los cuatro grupos analizados, los productos cárnicos son los que mayor dispersión de resultados arrojan comparados con los grupos de alimentos anteriores, es decir, existen problemas intrínsecos que pudieran afectar estos resultados tal es el caso de la presencia

porcentajes elevados de grasa que pudo haber influido en la heterogeneidad de las muestras. Para los productos cárnicos analizados, existen valores reportados previamente por *Senser*, (1991) que se muestran en la tabla 16.

Tabla 16. Valores reportados por *Senser et al.* (1991), para productos cárnicos.

C Á R N I C O S	
Muestra	Porcentaje de proteína
Chorizo estilo cantimpalo	38.57
Filete de res magro	70.27
Hígado de pollo	47.47
Jamón de cerdo	40.97
Jamón de pavo	49.86
Mortadela	26.00
Paté de cerdo	32.27
Pechuga de pollo magra	87.20
Pierna de cerdo magra	68.33
Queso de puerco	56.80
Salchicha Viena	35.82
Salchichas de pavo	34.32
Tocino ahumado	36.38

Estos valores son sólo referenciales, puesto que en los productos cárnicos aún es mayor la variabilidad entre formulaciones técnicas para la elaboración de dichos productos. *Rossi et al.* (2004) reporta valores para carne de res de 15.53%, para carne de pollo de 16.70%, para carne de cerdo de 16.70% y salchichas de 7.32% de nitrógeno sobre extracto seco, valores más altos que los obtenidos en el presente estudio.

5.4 COMPARACIÓN DE MÉTODOS

La desviación estándar nos indica que existe reproducibilidad en los valores obtenidos, a simple vista se puede notar que también existe correlación entre los valores obtenidos en ambos métodos, realizando una comparación con lo expuesto por Jung *et al.* (2003) se obtuvieron desviaciones mas bajas, pero para llegar a una conclusión acertada más adelante se muestra el análisis estadístico más completo.

En cuanto que si los valores son los esperados o no, tenemos valores relativamente cercanos. Como es de suponerse, el secado, el % de lípidos y la naturaleza y tamaño de la muestra, son factores que interfieren notablemente en la reproducibilidad de los resultados obtenidos, ya que de los tres grupos de muestras analizadas el grupo de cárnicos es el que presenta desviaciones estándar más elevadas, aun así se incluyen en e análisis estadístico global (Figura 25).

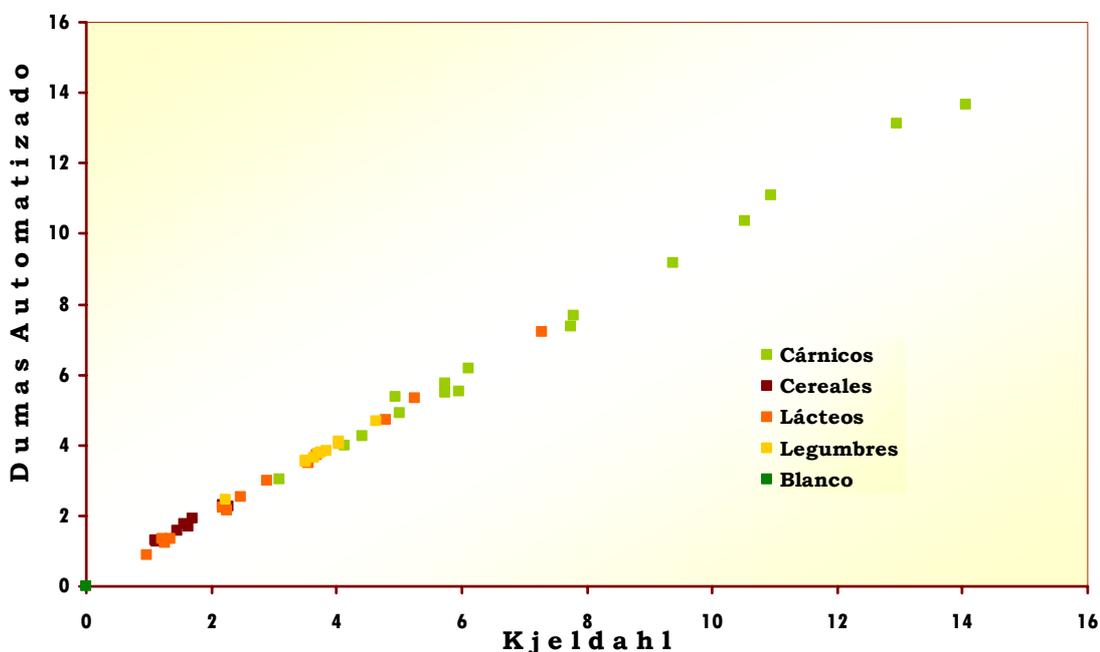


Figura 25. Representación gráfica de los datos totales obtenidos, exceptuando como ya se mencionó anteriormente las muestras con los códigos YBA y AV.

Aplicando el método de mínimos cuadrados, se obtuvo la regresión lineal siguiente:

$$Y = 0.9793 + 0.0896 X$$

Donde X es el contenido de nitrógeno expresado en porcentaje medido por el método Kjeldahl, Y es el contenido en nitrógeno medido por el método Dumas automatizado, el valor de 0.0896 es la ordenada en el origen y 0.9793 es la pendiente de la recta. La figura 26 se muestra la representación gráfica de los porcentajes de nitrógeno por ambos métodos, incluyendo la recta de regresión lineal.

La ordenada en el origen obtenida en el estudio es superior a la reportada por Souza *et al.* (2000) e inferior a la reportada por Sader *et al.* (2004) que determinaron que ambos métodos aunque estaban altamente correlacionados diferían entre sí por interferencia del contenido en nitritos pues se trataba de alimentos balanceados.

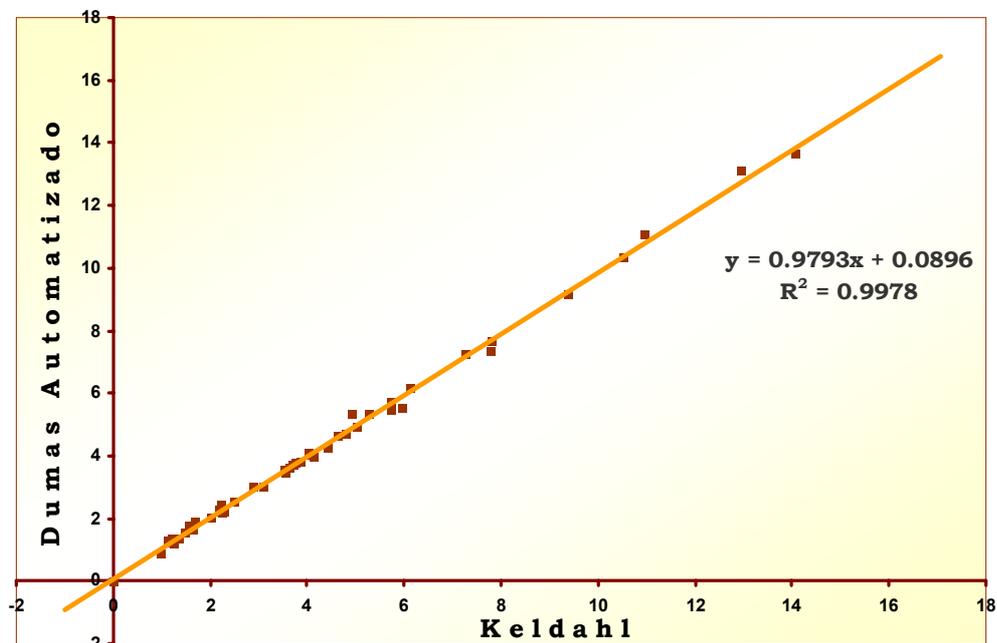


Figura 26. Representación gráfica de la recta de regresión lineal para los resultados obtenidos por ambos métodos.

La pendiente obtenida (0.9927) es inferior a la reportada por Souza *et al.* (2000) y superior a la reportada por Sader *et al.* (2004).

Se observa un valor de $R^2=0.9978$ ($P<0.01$), inferior a la correlación reportada por Souza *et al.* (2000) y Jung *et al.* (2003), mientras que en el estudio realizado por Sader *et al.* (2004) las correlaciones halladas en la determinación de nitrógeno en alimentos balanceados fueron inferiores a la aquí encontrada.

Una alta correlación entre los dos métodos es de esperar cuando se comparan dos métodos que miden lo mismo (Blanc *et al.* Altman, 1993).

Resulta interesante analizar las diferencias para determinar si existe sesgo además de determinar en que rango se ubican, en la tabla 17 se presentan los valores de las diferencias frente al valor promedio de proteína por ambos métodos y en la figura 27 la representación gráfica de dichas diferencias.

Tabla 17. Valores de las diferencias entre ambos métodos.

Muestra	Kjeldahl	Dumas	Diferencia	Muestra	Kjeldahl	Dumas	Diferencia
LEGUMBRES				CEREALES			
AJ	3,632	3,641	0,004	AR	1,119	1,250	0,066
AL	3,703	3,760	0,029	AVC	1,462	1,574	0,056
AM	2,225	2,463	0,119	CE	1,695	1,908	0,106
FM	3,762	3,794	0,016	MB	1,639	1,672	0,016
FN	3,511	3,574	0,032	MBL	1,110	1,288	0,089
GA	3,844	3,822	-0,011	MD	1,560	1,761	0,101
HAB	4,635	4,675	0,020	MR	2,265	2,255	-0,005
LE	4,036	4,022	-0,007	TB	2,020	2,036	0,008
LN	4,029	4,117	0,044	TD	2,196	2,312	0,058
SF	3,504	3,533	0,015				
LÁCTEOS				CÁRNICOS			
CAL	1,253	1,312	0,030	CHC	4,410	4,256	-0,077
FLB	1,250	1,224	-0,013	CHCZ	5,739	5,765	0,013
FLC	1,346	1,343	-0,001	FRF	10,941	11,070	0,064
LCN	1,218	1,357	0,070	HPF	7,754	7,360	-0,197
LPN	3,686	3,740	0,027	JPZ	7,801	7,683	-0,059
NLR	0,968	0,890	-0,039	JVC	6,119	6,160	0,020
QEO	7,274	7,232	-0,021	LCF	3,099	3,035	-0,032
QFB	5,242	5,348	0,053	MTK	4,134	4,006	-0,064
QMC	4,792	4,722	-0,035	PCF	10,525	10,347	-0,089
QPC	3,550	3,480	-0,035	PF	12,944	13,121	0,088
QPD	2,899	2,997	0,049	PPF	14,048	13,657	-0,195
QTA	2,468	2,522	0,027	QFP	9,378	9,176	-0,101
YBB	2,181	2,228	0,023	SPF	4,937	5,364	0,213
YFY	2,244	2,166	-0,039	SVB	5,731	5,484	-0,123
BCO	0.006	0.003	-0.003	TAK	5,954	5,533	-0,210
				ZPC	5,018	4,925	-0,046

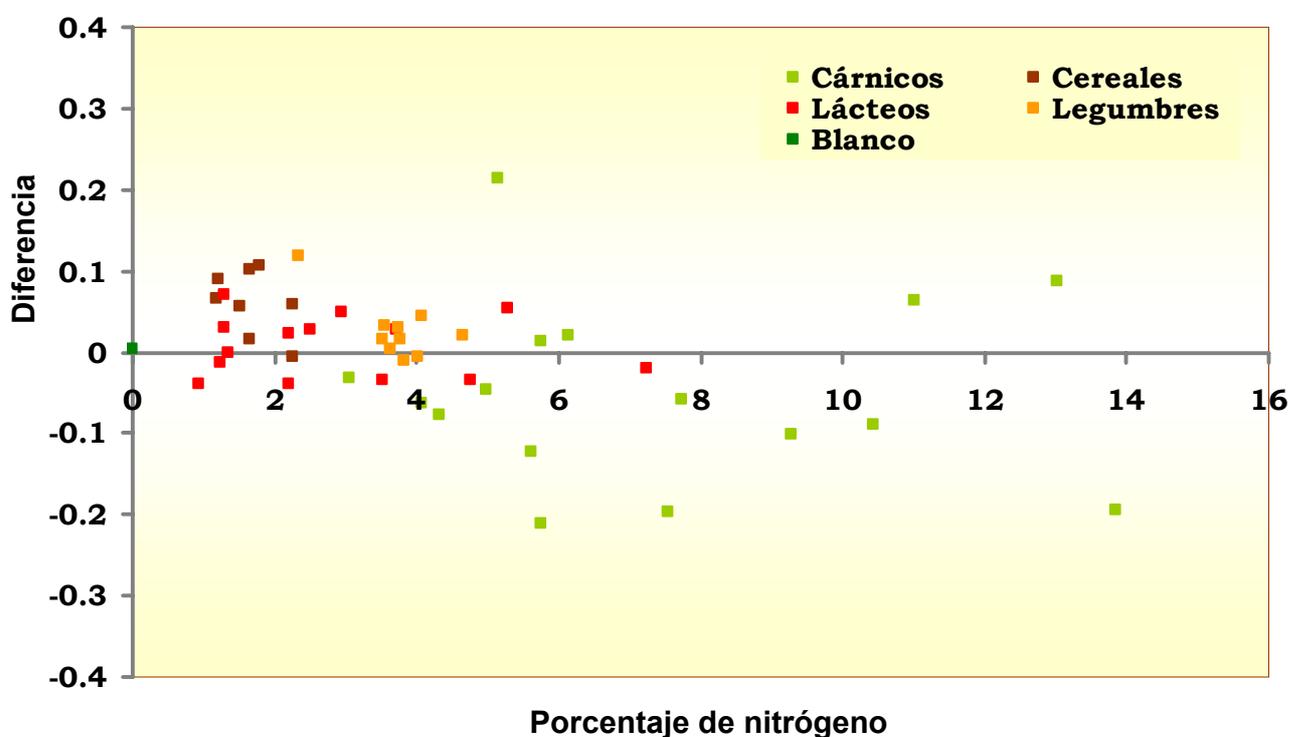


Figura 27. Representación grafica de las diferencias de ambos métodos.

Las diferencias dadas para cada muestra son el valor de Dumas menos el valor de Kjeldahl. Las diferencias estuvieron normalmente distribuidas con un valor promedio de 0.00119823 y una desviación estándar de 0.0792633.

El valor promedio de las diferencias no es diferente de cero con un nivel de significación de 0.05 lo que indicaría que ambos métodos miden igual. Es de esperar que el 95% de los valores de las diferencias se encuentren entre los límites de $-1.96s$ y $+1.96s$:

$$d - 1.96s = -0.1542 \quad d + 1.96s = +0.1566$$

Es decir los valores de proteína proporcionados por el equipo LECO FP 528[®] (LECO Corporation, St. Joseph, MI), pueden ubicarse 0.15% por debajo o 0.16% por encima de los valores proporcionados por el método tradicional de Kjeldahl lo que puede considerarse aceptable para análisis de alimentos.

Al representar las diferencias (Figura 28) respecto al valor promedio de proteína no se observa una variación sistemática del sesgo pero si se observa una marcada correlación entre las diferencias de concentración de nitrógeno y el tipo de alimento. Los valores correspondientes a cárnicos presentaron mayores valores de diferencias. De las 50 diferencias representadas, 56% fueron positivas y 44% fueron negativas, los que nos muestra una distribución normal de los resultados obtenidos. Varios autores (Souza *et al.*, 2000; King-Brink y Sebranek, 1993; Thompson *et al.*, 2002; Jung *et al.*, 2003;) han reportado que por lo general la determinación de proteína por combustión arroja mayores valores que por Kjeldahl con algunas excepciones. La explicación a tal hecho es que las variaciones entre ambos métodos pudieran estar relacionadas con la cuantificación de nitrógeno no amínico como nitratos, nitritos, nucleóticos y ácidos nucleicos por el método de Dumas que no ocurre en el método Kjeldahl (Jung *et al.*, 2003).

En nuestro caso el número de valores negativos de diferencias es relativamente alto en especial en las muestras cárnicas que son las que presentaron mayores diferencias entre los valores medidos por los métodos Kjeldahl y Dumas automatizado. Esto pudiera estar relacionado con el hecho de que las muestras cárnicas suelen presentar mayor heterogeneidad que podría influir en el análisis especialmente en el equipo LECO® (2000) en donde se toman muestras tan pequeñas de aproximadamente 0.1g.

Las diferencias fueron especialmente grandes en las muestras hígado de pollo fresco, pierna de cerdo fresca, tocino ahumado y salchicha de pavo (HPF, PPF, TAK y SPF, respectivamente) en donde las cuatro muestras son las que salen de los límites de $-1.96s$ y $+1.96s$. En el estudio realizado por Thompson *et al.* (2002) fueron las muestras de lácteos y pescado las que presentaron mayores valores de diferencias aunque dichas diferencias estuvieron por debajo de 0.1%.

En algunos trabajos en lugar de graficar las diferencias entre ambos métodos se analizan las proporciones de los valores de Kjeldahl/Dumas. En la tabla 18 se muestran las proporciones obtenidas en el presente estudio.

Tabla 18. Proporciones obtenidas de la totalidad de las muestras analizadas.

Muestra Kjeldahl Dumas Diferencia				Muestra Kjeldahl Dumas Diferencia			
LEGUMBRES				CEREALES			
AJ	3.632	3.641	1.00	AR	1.119	1.250	0.90
AL	3.703	3.760	0.98	AV	1.462	1.574	0.93
AM	2.225	2.463	0.90	CE	1.695	1.908	0.89
FM	3.762	3.794	0.99	MB	1.639	1.672	0.98
FN	3.511	3.574	0.98	MBL	1.110	1.288	0.86
SF	3.504	3.533	0.99	MD	1.560	1.761	0.89
GA	3.844	3.822	1.01	MR	2.265	2.255	1.00
HAB	4.635	4.675	0.99	TB	2.020	2.036	0.99
LE	4.036	4.022	1.00	TD	2.196	2.312	0.95
LN	4.029	4.117	0.98				
LÁCTEOS				CÁRNICOS			
CAL	1.253	1.312	0.95	CHC	4.410	4.256	1.04
FLB	1.250	1.224	1.02	CHCZ	5.739	5.765	1.00
FLC	1.346	1.343	1.00	FRF	10.941	11.070	0.99
LCN	1.218	1.357	0.90	HPF	7.754	7.360	1.05
LPN	3.686	3.740	0.99	JPZ	7.801	7.683	1.02
NLR	0.968	0.890	1.09	JVC	6.119	6.160	0.99
QEO	7.274	7.232	1.01	LCF	3.099	3.035	1.02
QFB	5.242	5.348	0.98	MTK	4.134	4.006	1.03
QMC	4.792	4.722	1.01	PCF	10.525	10.347	1.02
QPC	3.550	3.480	1.02	PF	12.944	13.121	0.99
QPD	2.899	2.997	0.97	PPF	14.048	13.657	1.03
QTA	2.468	2.522	0.98	QFP	9.378	9.176	1.02
YBB	2.181	2.228	0.98	SPF	4.937	5.364	0.92
YFY	2.244	2.166	1.04	SVB	5.731	5.484	1.04
				TAK	5.954	5.533	1.08
				ZPC	5.018	4.925	1.02

Los valores de las relaciones van de 0.86 a 1.09 siendo las muestras de cebada, maíz blanco, maíz dorado, dulce de leche y tocino ahumado (CE, MBL, MD, NLR y TAK, respectivamente) las que presentaron mayor relación. Simonne *et al* (1997) reportaron elevadas diferencias entre Dumas y Kjeldahl para frutas y pescado con relación de 0.8 y 0.73 respectivamente, mientras que Jung *et al.* (2003) presentaron relaciones superiores a 0.94 para muestras de soya.

Como se ha comentado previamente parece ser que el método Dumas es más eficiente en la medida de nitrógeno ya que mide también nitrógeno no amínico pero de acuerdo a Jung *et al.* (2003) en algunos casos las diferencias observadas entre ambos métodos no se sustentan solo por ese hecho y parece ser que otros factores interfieren y llevan a las diferencias entre los métodos Kjeldahl y Dumas.

Al reportar las proporciones por grupo alimenticio nos dan los resultados mostrados en la tabla 19.

Tabla 19. Valores de relaciones expresados por grupo alimenticio.

POR GRUPO ALIMENTICIO					
Tipo	observaciones	Mínimo	Máximo	Media	DS
Legumbres	10	0.90	1.01	0.98	0.03
Cereales	9	0.86	1.00	0.93	0.05
Cárnicos	16	0.92	1.08	1.02	0.04
Lácteos	14	0.90	1.09	0.95	0.04
Total de los datos	49	0.86	1.09	0.99	0.05

En este caso las relaciones de los grupos de legumbres, lácteos y cereales nos dan por debajo de la unidad y solo el grupo de productos cárnicos presenta un valor por encima, es decir, para legumbres cereales y lácteos, en general el método Dumas da resultados menores a los obtenidos por el método Kjeldahl, no así para los productos cárnicos en donde

al analizar las relaciones por grupo alimenticio se da que en el caso de este grupo los valores obtenidos por el método Kjeldahl son mayores.

Al analizar la totalidad de los datos nos da una diferencia de 0.99876, lo que nos indica que se puede decir que existe correlación entre los dos métodos y pueden ser utilizados indistintamente.

El método Dumas para la determinación cuantitativa de nitrógeno orgánico es tan preciso como el método Kjeldahl pero considerablemente más rápido lo que lo hace tan interesante para aplicaciones industriales y de investigación

Además es ventajoso en cuanto a que una vez colocadas las muestras en el carrusel de automuestreo, el analizador trabaja de forma autónoma sin que sea necesaria la presencia del analista. Por otro lado el método Kjeldahl implica la utilización de reactivos peligrosos como ácido sulfúrico, hidróxido sódico y metales pesados como catalizadores, que implican además contar con un sistema de manejo de desechos. Por el contrario el equipo de Dumas es amigable y seguro con el medio ambiente.

6 ■ CONCLUSIONES

1. Se analizaron 50 muestras por triplicado mediante los métodos Kjeldahl y Dumas automatizado desechándose las muestras AVC y FBB.
2. Se observó una alta correlación de 0.9975 entre ambos métodos que indica que ambos métodos proporcionan medidas análogas de proteína con la regresión lineal:

$$Y = 0.9793 + 0.0896 X$$

3. En productos cárnicos se presentaron las mayores diferencias entre ambos métodos hasta un máximo de 0.2134, en principio debido a la heterogeneidad del producto, más que porque los métodos sean diferentes, resulta interesante considerar la utilización de sustancias patrones de mayor concentración de nitrógeno que las utilizadas para el presente estudio.

7. BIBLIOGRAFÍA

Alavoine, G.; Nicolardot B., 2000. Comparison of various methods for the determination of total N in liquid effluents. *Analisis*, 28:88-92.

A.O.A.C., 1990. Association of Official Agricultural Chemist, Official Methods of Analysis. 15th ed. Washington D.C., pp. 11441.

Bellomonte, G.; Constantine A.; Giammariolo S., 1987. Comparison of modified automatic Dumas method and the traditional Kjeldahl method for nitrogen determination in infant food. *JAOAC* 70:227-229.

Blanc, J. M.; Altman D.G., 1993. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet*, pp. 307-310.

Blondel, P; Vian, L., 2003. Dosage des protéines par la méthode de Dumas modifiée appliqué aux préparations de protéines plasmatiques; *Anales Pharmaceutiques Françaises*, Paris, 51:292-298.

Bohinski, R. C., 1991. *Bioquímica*. 5^a edición, Ed. Pearson, Edo. de México, pp 113-117.

Boyer, R., 2000. *Conceptos de Bioquímica*, Capítulo 4: Aminoácidos péptidos y proteínas. Ed. Internacional Thomson Editores, S.A. de C. V., México DF.

Carrillo, C.; Arvelo, C.; Ruiz, M.; Zaragoza, M.; Castillo, L.; Escalona, J. G.; Arteaga, E.; Torres, M. A.; Cañizales, C.; Arrieche, B.; Gamboa, O.; Duran, L.; Pérez, A.; Arrieche, I. E.; Saume, L., 2004. Definición de los métodos para analizar nitrógeno total en fertilizantes. *Venesuelos*, depósito legal DLPP92-0468 6(1 y 2), pp. 33-38.

Cheftel, J. C.; Cuq, J. L.; Lorient, D. 1989. Proteínas alimentarias, bioquímica, propiedades funcionales, valor nutritivo, modificaciones químicas. Ed. Acribia, S. A., Zaragoza, España.

Cheftel, J. C.; Cheftel H. 1992. Introducción a la bioquímica y tecnología de alimentos. Ed. Acribia, S. A., Zaragoza, España.

Colombo, B.; Giuzzi, G., 1982. Total automatic nitrogen determination. Am. Lab. 14:38-45.

Darragh, A.; Hodgkinson, S., 2000. Quantifying the digestibility of dietary protein. Journal of Nutrition, 130:1850s – 1867s.

Dominic, C.; Wong, V. S., 1995. Química de los alimentos, mecanismos y teoría. Ed. Acribia S. A., Zaragoza, España.

Harding, V. J.; Waneford, V. H., 1975. A note on the determination of nitrogen by the Kjeldahl-Foling-Farmer method. Journal of Biological Chemistry, pp. 69-71.

Hauck, R. D., 1982. Conversion of total nitrogen to ammonium-nitrogen. pp. 744ff. En: Methods of Soil Analysis, Part 2, Chemical and Microbiological Properties. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin. Nitrogen-Isotope Ratio Analysis, sec.36-3.2.2.

Hiller, A.; Plazin, J.; Slyke, D. D. V., 1948. A study of conditions for Kjeldahl determination of nitrogen in proteins. Journal of Biological Chemistry, pp. 1401-1419.

Jung, S.; Rickert, D. A.; Deak, N. A.; Aldin, E. D.; Recknor, J.; Johnson, L. A.; Murphy, P. A., 2003. Comparison of Kjeldahl and Dumas methods for determining protein contents of soybean products. JAOCS, 80(12):1169-1173.

Keller, R. P; Neville, M. C. 1986. Determination of total protein in human milk: Comparison of methods, *Clinical Chemistry*, 32(1):120-123.

King-Brink, M.; Sebranek, J. G. 1993. Combustion method for determination of crude protein in meat and meat products, collaborative study. *Ibid*, 76:787-793.

Kinsella, J. E. 1981. Funcional properties of proteins: possible relationships between structure and function in foams. *Food Chemistry* pp. 273-288.

Kirk, R. S.; Sawyer, R.; Egan, H. 2002. Composición y análisis de alimentos de Pearson, 5ª edición, Ed. Compañía Editorial Continental S .A de C. V., México. DF. pp. 19-25.

Kirsten, W. 1983. Organic elemental analysis: Ultramicro, micro, and trace Methods. Academic Press/Harcourt Brace Jovanovich, New York City.

Lees, R. 1984. Análisis de los alimentos, Métodos analíticos y de control de calidad, 2ª edición, Ed. Leonard Hill Books, Londres, Inglaterra.

Lehninger, A. L., 1982. Bioquímica 2ª edición. Capítulo 3: Las proteínas y sus funciones biológicas. Capítulo 4: Los aminoácidos, sillares de las proteínas. Capítulo 5: Proteínas esqueleto covalente y secuencia aminoacídica. Capítulo 6: Proteínas, conformación tridimensional. Capítulo 7: Purificación y caracterización. Capítulo 8: Enzimas, cinética e inhibición. Ed. Omega S. A., Barcelona, España.

Llorente, A.; García, A. I.; Nicodemus, N.; Villamide, M. J.; Carabaño, R. 2005. Utilización de una nueva metodología para la determinación de la digestibilidad ideal aparente y real en la valoración nitrogenada de harina de girasol en conejos. AIDA-ITEA, 2005.

López, C. G. 2005. Lección inaugural curso 2004/2005: Química Analítica y Premio Nóbel, Universidad de Alicante, pp. 1-30.

Madl, R. L. 1993. Evolution of protein quality determination. Technical brief. Food and drug administration's proposed labeling rules for protein. FDA 38(18):296.

Matissek, R.; Schnepel, F. M.; Steiner, G., 1996. Análisis de los alimentos: Fundamentos, métodos y aplicaciones. Ed. Acribia S. A., Zaragoza, España.

Millar, L.; Houghton, A. 1995. The micro-Kjeldahl determination of the nitrogen content of amino acids and proteins. Journal of Biological chemistry, pp. 377-383.

Môller, J. 2005. Traceability in modern Kjeldahl analysis. Lab plus international, June 2005.

Morrison, R. T.; Boyd, R. N. 1998. Química Orgánica 5ª edición. Ed. Addison Wesley Longman de México, S. A. de C. V., México, DF. pp. 486-487.

Olivares, S.; Soto, D.; Zacarías, I. 1989. Nutrición, prevención de riesgos y tratamiento dietético. Confelanyd 1989., pp 8-13.

Osborne, D. R.; Vogt, P, 1990. Análisis de los nutrientes de los alimentos. Ed. Acribia S. A., Zaragoza, España. pp. 107-119; 162-163.

Pellet P T. 1987. Protein quality. Food Technology. pp. 60-78.

Price, J. F.; Schweigert, B. S. 1994. Ciencia de la carne y de los productos cárnicos. Ed. Acribia S. A., Zaragoza, España.

Ramón, G.; Pelayo; Gross 1994. Enciclopedia Científica Larousse, tomo 3. Ed. Ediciones Larousse México DF. pp. 589-590.

Ranken, M. D. 1980. Application of blood proteins. Applied protein chemistry. Applied Sciences Publishers, London. pp.169-180.

Rossi, A.M.; Villarreal, M.; Juarez, M. D.; Sammán, N. C. 2004; Nitrogen contents in food: a comparison between the Kjeldahl and Hach methods. The Journal of the Argentine Chemical Society: 92(4):99-108.

Ruffino, J.; Napolitano, F. 2002. Determinación de Nitrógeno Proteico en alimentos concentrados utilizando el método de combustión directa Leco[®] / Dumas. Ergomix Artículos técnicos.

Santos, M. A. 1987. Leche y sus derivados. Ed. Trillas S. A. de C. V., México DF.

Sader, A. P O.; Oliveira, S. G.; Berchielli, T. T. 2004. Application of Kjeldahl and Dumas combustion methods for nitrogen analysis. Archives of Veterinary Science, 9(2):73-79.

Sayle, R. 1994. Biomolecular Structure Glaxo Research and Development. RasMol 2.5. A molecular visualisation program. Greenford, Middlesex, UK. 1994.

Senser, F.; Scherz, H. W.; Fachmann, S. W. S.; Kraut H. S. (1998). Tablas de composición de alimentos. Ed. Acribia S. A., Zaragoza, España.

Simonne, A. H.; Simonne, E. H.; Eitenmiller, R. R.; Mills, H. A.; Cresman III C. P 1997. Could the Dumas method replace the Kjeldahl digestion for nitrogen and crude protein determinations in foods?. Journal Science Food and Agriculture, 73:39-45.

Skoog, D. A.; West, D. M., 1994. Química analítica, 4ª edición. Ed. Mc. Graw Hill México DF. pp. 231–233.

Souza, A. V. C.; Lopes, D. C.; Pacheco, B.M.; Pinhal, J.P J.; Reginato, G.; Fontes, D. O.; Vieites, F. M. 2000. Comparação entre as metodologias de Kjeldahl e de dumas para determinação de nitrogênio em amostras de alimentos e fezes de suínos. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. Viçosa 37. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, pp. 262.

Stricher, J. E.; Jolliff, C. R.; Hill, R. M. 1999. Comparison of Dumas and Kjeldahl methods for determination of nitrogen in feces. *Clinical Chemistry*, 15(3):248-254.

Stryer, L. 1988. *Bioquímica*, 3ª edición. Ed. Reverte, S. A., Barcelona, España. pp. 145-288.

Suárez, M. M. L.; Kizlanzky, A.; López, L. B. 2006. Evaluación de la calidad de las proteínas de los alimentos calculando el score de aminoácidos corregido por digestibilidad. *Nutrición Hospitalaria*, 21:47-51.

Sweeney, R. A. 1989. Generic combustion method for the determination of crude protein in feeds. Collaborative Study. *JAOAC*. 72:770-774.

Thompson, A.; Owen, L.; Wilkinson, K.; Wood, R.; Damant, A. 2002. A comparison of the Kjeldahl and Dumas methods for the determination of protein in foods, using data from a proficiency testing scheme., *The analyst*, 127:14666-1668.

Vittori, A.; Silva, C. J. F.; Vasquez, M. H.; Morenz, F. M. J.; Silva, M. A.; Filho, G. R. V. 2007. Frações de proteínas de gramíneas tropicais em diferentes idades de corte, XII Jornadas de producción animal aida 2007.

Young, V. R.; Scrimshaw, N. S. 1998. Nutritional evaluation of protein and protein requirements with special reference to man. *Analytical chemistry*. pp. 113-117.