

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA



ELABORACIÓN DE UNA PRÁCTICA DE LABORATORIO PARA LA DETERMINACIÓN
DE PROTEÍNA CRUDA EN CONCENTRADO PARA AVES PONEDORAS MEDIANTE EL
MÉTODO DE KJELDAHL

TRABAJO DE GRADO EN MODALIDAD DIPLOMADO DE ESPECIALIZACIÓN

PRESENTADO POR

MICHELLE ALEJANDRA ALBERTO LÓPEZ

FÁTIMA ISABEL ALVARADO AMAYA

PARA OPTAR AL GRADO DE

LICENCIADA EN QUÍMICA Y FARMACIA

JULIO, 2024

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMÉRICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

MAESTRO JUAN ROSA QUINTANILLA

SECRETARIO GENERAL

LICENCIADO PEDRO ROSALÍO ESCOBAR CASTANEDA

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA

DECANA

MAESTRA NANCY ZULEYMA GONZÁLEZ SOSA

SECRETARIA

LICENCIADA EUGENIA SORTO LEMUS

DIRECCIÓN GENERAL DE PROCESOS DE GRADO

DIRECTORA GENERAL (AD-HONOREM)

MAESTRA KATIA LISSETTE MARTÍNEZ DE PALACIOS

TRIBUNAL EVALUADOR

ASESOR

MAESTRO ÓSCAR RAÚL AVILÉS FLORES

ASESORA

LICENCIADA DALILA GUADALUPE ANAYA RODRÍGUEZ

TUTOR

LICENCIADO MARIO ANTONIO HERNÁNDEZ MELGAR

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi sincero agradecimiento a todas las personas que contribuyeron de manera significativa a la realización de este trabajo de grado.

En primer lugar, deseo agradecer a Dios, por ser mi fuente de fortaleza y sabiduría durante todo el proceso de elaboración de este trabajo de investigación. Agradezco también, a mi asesor, Lic. Mario Antonio Hernández Melgar por su orientación y paciencia a lo largo de todo este proceso. De igual manera deseo expresar mi gratitud a cada uno de los docentes de la Facultad de Química y Farmacia, por todo su tiempo, empeño y dedicación brindada para poder culminar esta carrera.

Agradezco de igual manera a mi pareja Eduardo Franco y a mi hijo Carlos López por su paciencia durante todo este trayecto, por estar presentes en cada etapa de este proceso, por sus palabras de aliento y por motivarme siempre a culminar esta etapa. Por último, pero no menos importante, quiero agradecer a mi familia por su constante apoyo a lo largo de este camino. En especial, a mi mamá Doris López, quien, a lo largo de este camino académico, ha sido mi mayor fuente de fortaleza y motivación; a mi hermano Douglas López, por su amor incondicional, sus consejos, sus palabras de ánimo para no rendirme y su apoyo diario a lo largo de todos estos años.

Primordialmente agradecer a Dios que me dio la fortaleza, paciencia y sabiduría para lograr esta meta.

A mis padres que fueron la fuente de energía que me motiva a seguir esforzándome, agradezco por el apoyo incondicional, el esfuerzo que realizaron para poder darme el estudio, por siempre tener las palabras adecuadas cuando sentía que ya no podía más, agradezco sobre todo a mi mami quien es también mi mejor amiga y mi apoyo incondicional. A mi hermano quien siempre está para mí y motivarme cada día a luchar por lo que yo quería, por enseñarme que con dedicación y perseverancia.

De manera muy especial agradezco a mi hija Giulianna Alvarado por ser mi mayor inspiración para continuar con mis estudios y ser un ejemplo de superación, doy gracias por que siendo una recién nacida era mi compañera de estudio, gracias por la paciencia con la que me esperaba para jugar cuando llegaba de la universidad, su sonrisa y mirada lo que me motiva cada día a luchar por cada uno de mis sueños.

En general agradecer a todas las personas que fueron parte de este camino y no se encuentran nombradas, no se habría logrado sin que ustedes estuvieran ahí para mí.

Michelle y Fátima

DEDICATORIA

Este trabajo de grado está dedicada con profundo amor y gratitud a todas las personas que han sido parte de mi viaje académico y personal.

A mi mamá, cuyo amor y apoyo incondicional ha sido la fuerza impulsora detrás de cada logro en mi vida. Por sus palabras llenas de motivación, por la confianza depositada en mí y por el enorme sacrificio realizado día a día para culminar este proyecto. Su constante aliento y ejemplo de perseverancia han sido mi mayor inspiración.

A mi pareja, por su paciencia, comprensión y compañerismo a lo largo de este desafío. Por su amor, cariño y apoyo incondicional que han sido mi refugio en los momentos de duda y agotamiento, por sus palabras llenas de amor que me inspiraron a salir adelante y culminar esta etapa, por no dudar de mí, y por su confianza brindada todo este tiempo.

A mi hijo, por ser mi apoyo y sobre todo mi motor en los momentos más duros, por su comprensión en cada momento agobiante, por su amor que me ayudaba a no darme por vencida y a culminar todo por él.

A mi hermano, por su gran apoyo, por sus palabras de aliento y ánimo cada día, por ser un ejemplo de perseverancia y lucha constante, por sus regaños y consejos, por ser mi incondicional.

A mis profesores y mentores, por su guía, conocimiento y orientación experta. Su sabiduría y apoyo han enriquecido enormemente mi aprendizaje y mi crecimiento académico. En especial al Lic. Guillermo Castillo, que en paz descanse, por su legado y esa semilla que dejó en mí, ese deseo de investigar y aprender cada día más, por su apoyo y todo el tiempo dedicado a mi educación.

A todas estas personas, y a muchas otras que han dejado una huella imborrable en mi vida, les dedico este trabajo. Su influencia y contribución han sido fundamentales en mi camino hacia la realización de este logro.

Michelle

DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo de grado a todas las personas que han estado en mi formación académica y personal, que fueron piezas claves para culminar este proyecto.

A mis padres y mi hermano por su apoyo incondicional, y por confiar en mí en todo momento, en especial a mi madre que se convirtió en mi amiga; siempre confiaba que iba a superar cada obstáculo que se presentaba.

A mi hija Giulianna Alvarado por darme las fuerzas para continuar, por tener paciencia y siempre recibirme con una sonrisa y un abrazo, aunque ella no entienda bien eso me daba las energías y la motivación que necesitaba para seguir avanzado en mi vida personal, académica y profesional.

A una de mis mejores amigas de infancia Pamela Molina que en paz descanse, por ella aprendí el valor de la vida, y valorar cada instante, sé que está orgullosa de la mujer en la que me convertí, y una parte de ella siempre vivirá en mí.

Fátima

ÍNDICE GENERAL

Pág. N°

ABREVIATURAS

GLOSARIO

RESUMEN

CAPÍTULO I

1.0 INTRODUCCIÓN 17

CAPÍTULO II 19

2.0 OBJETIVOS 20

CAPÍTULO III

3.0 MARCO TEÓRICO 22

3.1 Definición y clasificación del método de análisis. 22

3.1.1 Análisis volumétrico. 24

3.1.1.1 Tipos de volumetrías. 24

3.1.1.1.1 Volumetría de neutralización. 25

3.2 Muestra: Concentrado para aves ponedoras. 27

3.2.1 Características del pienso para gallinas ponedoras. 27

3.3 Preparación de la muestra. 28

3.3.1 Preparación de la muestra bruta. 29

3.4 Proteínas. 30

3.4.1 Función de la Proteína en la Nutrición Aviar. 30

3.4.2 Importancia de la Determinación Precisa de Proteína Cruda. 31

3.5 Método de Kjeldahl para Determinación de Proteínas. 31

3.5.1 Etapa 1: Digestión. 33

3.5.1.1 Digestor. 33

3.5.1.2 Tubos de borosilicato. 34

3.5.2 Etapa 2: Destilación.	36
3.5.3 Etapa 3: Valoración.	37
3.6 Cálculo de resultados.	38
3.7 Práctica de determinación.	43
CAPÍTULO IV	41
4.0 RESULTADOS: PRODUCTO FINAL	42
4.1 Introducción.	42
4.2 Objetivos.	43
4.3 Método de análisis.	43
4.4 Muestra a analizar.	46
4.5 Reactivos.	51
4.6 Materiales y equipo.	51
4.7 Procedimiento de práctica de determinación.	52
4.7.1 Preparación de reactivos.	66
4.7.2 Estandarización del ácido clorhídrico 0.1 N.	52
4.7.3 Procedimiento general.	52
4.8. Cálculos.	55
4.9 Interpretación de resultados.	56
4.10 Bibliografía.	57
CAPÍTULO V	58
5.0 CONCLUSIONES	59
CAPÍTULO VI	60
6.0 RECOMENDACIONES	61
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N°		Pág. N°
1	Mapa conceptual de las ramas de la química analítica.	23
2	Preparación de muestras por cuarteo.	30
3	Etapas del Método de Kjeldahl.	33
4	Bloque digestor Kjeldahl.	34
5	Tubos de Borosilicato	35
6	Destilador de Nitrógeno.	36
7	Pasos para muestreo de pienso de concentrado para aves.	50
8	Procedimiento método de Kjeldahl.	54
9	Alimentación diaria adecuada de las gallinas de postura	73

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N°		Pág. N°
1	Algunos indicadores ácido base y sus intervalos de viraje.	26
2	Necesidades mínimas de nutrientes recomendadas para gallinas ponedoras	28
3	Factores de conversión de nitrógeno a proteína para algunos alimentos.	39
4	Tabla para la selección de muestras en base a la matriz.	47
5	Porcentaje de proteína diaria recomendada para concentrado para aves.	56
6	Preparación de reactivos.	72

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo N°

- | | |
|---|---|
| 1 | Métodos de muestreo |
| 2 | Preparación de muestras |
| 3 | Alimentación de gallinas ponedoras según MAG. |

ABREVIATURAS

ACS: American Chemical Society, en español, Reactivos Analíticos de la Sociedad Química Estadounidense.

AOAC: Association of Analytical Communities y en español significa Asociación Científica Dedicada a la Excelencia Analítica.

ISO: International Organization for Standardization o Organización Internacional de Normalización.

MAG: Ministerio de Agricultura y Ganadería.

USEPA: U.S. Environmental Protection Agency, en español, Agencia de protección medioambiental de los Estados Unidos.

GLOSARIO

Aminoácido: Un aminoácido es una molécula orgánica con un grupo amino y un grupo carboxilo en un extremo. Son la base principal de las proteínas.

Analito: Es un componente de interés analítico de una muestra que se separa de la Matriz, una especie química cuya presencia o contenido se desea conocer, la cual es identificable y cuantificable, mediante un proceso de medición química.

Concentración de una solución: Cantidad de soluto disuelta en una cantidad dada de disolvente o de solución.

Disolución estándar: Es una disolución que contiene una concentración conocida de un elemento o sustancia específica, llamada patrón primario.

Matriz: Sustancia compuesta (química, física o biológica) que puede o no contener al analito de interés. Son los componentes de una muestra que no son el analito de interés.

Metodología analítica: Es un modelo de estudio científico basado en la experimentación directa y la lógica empírica. Este método consiste en la aplicación de la experiencia directa (lo propuesto por el empirismo) a la obtención de pruebas para verificar o validar un razonamiento, a través de mecanismos verificables como estadísticas, la observación de fenómenos o la replicación experimental.

Micronutrientes: Son elementos esenciales que los seres vivos, incluido el ser humano, requieren en pequeñas cantidades a lo largo de la vida para realizar una serie de funciones metabólicas y fisiológicas para mantener la salud.

Muestra bruta: Es una pequeña muestra tomada de un punto del lote, durante una simple acción de muestreo.

Nitrógeno amoniacal: Es el nitrógeno presente en forma de amoniaco.

Nitrógeno orgánico: El contenido de nitrógeno orgánico incluye el nitrógeno de aminoácidos, aminas, polipéptidos, proteínas y otros compuestos orgánicos del nitrógeno.

Nitrógeno total: También conocido como Nitrógeno de Kjeldahl, es la suma de todas las formas de nitrógeno presentes en la matriz analizada. El nitrógeno total Kjeldahl es un indicador utilizado

en química analítica cuantitativa. Determina la suma del nitrógeno orgánico en sus diversas formas y el ion amonio NH_4^+ , presentes en una muestra.

Pienso: También conocido como concentrado, es un alimento para animales, constituido por una mezcla de materias primas que son transformadas o no con el fin de lograr un alimento nutritivo y sano. Consistente en pequeños trozos de comida prensada y deshidratada.

Proteína cruda: También llamada proteína bruta, se refiere al porcentaje de proteína que contiene un alimento. Ese valor se obtiene después de haberlo sometido al análisis químico. Es el valor del contenido total en nitrógeno de un material animal o vegetal vivo valorado por el método Kjeldahl y multiplicado por 6,5 (100:16) siendo 16 % el porcentaje de proteínas en un tejido orgánico.

Reactivo grado ACS: La denominación ACS significa que el producto cumple el requisito definido por la American Chemical Society en relación con los reactivos analíticos. El término químico de grado reactivo implica que una sustancia tiene la suficiente pureza para usarse en la mayoría de los análisis o reacciones químicos.

Sustancia proteica: Son las sustancias compuestas fundamentalmente de proteínas; es una molécula compuesta de aminoácidos que el cuerpo necesita para funcionar de forma adecuada. Las proteínas son elementos fundamentales de estructuras del cuerpo, como la piel y el cabello, y de sustancias como las enzimas, las citocinas y los anticuerpos.

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se enfocó en el desarrollo de una práctica de determinación del contenido de proteína cruda a partir del nitrógeno total en muestras de concentrado diseñado para la alimentación de aves ponedoras, empleando para esto, el método de Kjeldahl.

El objetivo principal de esta investigación se centralizó en describir el proceso del diseño experimental utilizado para determinar la proteína cruda a partir del contenido de nitrógeno total en muestras de concentrado diseñado para gallinas ponedoras.

Dentro de la investigación se realizó una revisión íntegra de la bibliografía referente al método de Kjeldahl, abordando sus principios fundamentales, procedimientos analíticos, equipos necesarios y las principales aplicaciones en la industria avícola, dando como resultado el desarrollo de la práctica de determinación de proteína cruda en concentrado para aves ponedoras.

Para llevar a cabo este proceso se recurrió al método de Kjeldahl, el cual consta de tres etapas fundamentales: la digestión ácida, la destilación del amoníaco y la valoración volumétrica, haciendo énfasis en las ramas empleadas de la química analítica, específicamente del método clásico, una de las subdivisiones del método de análisis químico. De igual manera se detallaron los pasos específicos involucrados en la recolección y preparación de muestras.

Dicho trabajo retoma la evidencia planteada sobre la importancia de proporcionar una nutrición adecuada para las aves orientadas a la producción de huevos, ya que la proteína juega un papel importante tanto en su salud como en su rendimiento.

Como conclusión, la bibliografía recopilada permitió profundizar en la comprensión del método Kjeldahl para la determinación de proteínas en alimentos, identificando así, los principios fundamentales del método y sus etapas clave para su correcta aplicación. Se recomienda que esta práctica sea adoptada en laboratorios de control de calidad y empresas avícolas.

CAPÍTULO I

1.0 INTRODUCCIÓN

La producción avícola, particularmente la de huevos, juega un papel fundamental en la seguridad alimentaria a nivel mundial. Para garantizar la salud y productividad de las aves ponedoras, es crucial proporcionarles una dieta balanceada y rica en nutrientes, especialmente proteínas. La proteína cruda es un componente esencial en la alimentación de las aves, ya que aporta aminoácidos necesarios para el crecimiento, desarrollo y producción de huevos.

Para poder determinar que una gallina ponedora está siendo alimentada de manera balanceada y correcta, se crea una práctica de laboratorio para determinar la cantidad de proteína cruda en una muestra alimenticia de uso veterinario.

La práctica de determinación surge a raíz de la importancia que tiene garantizar la calidad en la nutrición de los alimentos destinados a aves ponedoras para que estas cumplan con la puesta de huevos diarios, y así satisfacer las necesidades de producción. La determinación de proteína cruda en el concentrado para gallinas ponedoras es crucial para garantizar una alimentación balanceada, al conocer la cantidad de proteína que el pienso posee, se puede determinar la cantidad de concentrado diario que se necesita para una alimentación balanceada y garantizar una correcta bioutilización del producto. Además, la aplicación de un método preciso de determinación de proteína cruda es esencial para cumplir con los estándares de calidad establecidos por las autoridades reguladoras en el sector de la producción avícola. Esta práctica proporciona la teoría necesaria para que pueda ser retomada y ejecutada a futuro por otros estudiantes, analistas, profesionales o formuladores.

El principal objetivo de esta práctica se centra en establecer un protocolo para la determinación de proteína cruda en concentrado destinado a aves ponedoras, empleando el método de Kjeldahl, una de las temáticas abordadas en el Diplomado. Para lograr este propósito, se ha diseñado un plan metodológico detallado que incluye la preparación de las muestras, la digestión ácida, la destilación y la valoración final, basándose en información recopilada en diferentes referencias bibliográficas.

Para realizar el desarrollo de la práctica escrita sobre el análisis químico del concentrado para aves ponedoras, se hará uso de la química analítica, la cual brinda las herramientas necesarias para poder determinar las sustancias que están presente en el alimento y en qué cantidades se encuentran. Con el fin de garantizar esto, se selecciona el método de Kjeldahl, reconocido por su precisión y

aplicabilidad en muestras orgánicas, este método es especialmente útil en la industria avícola para monitorear la calidad nutricional de los alimentos balanceados y asegurar un suministro adecuado de proteínas para mantener la producción óptima de huevos. Conocer las etapas del método de Kjeldahl es fundamental para el correcto desarrollo de la práctica, por lo tanto, se abordan las tres fases del método: el proceso de digestión ácida, la destilación y finalmente la valoración ácido base para cuantificar el nitrógeno total y posteriormente realizar la conversión a proteína bruta con el factor correspondiente.

El presente estudio se ha llevado a cabo durante un período de noviembre 2023 a junio 2024. Durante este tiempo, se ha recolectado suficiente referencia bibliográfica, dando como resultado el desarrollo de una práctica de determinación de proteína cruda, específicamente en concentrado para aves ponedoras.

CAPÍTULO II

2.0 OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Elaborar una práctica de laboratorio para la determinación de proteína cruda en muestra de concentrado para aves ponedoras mediante método de Kjeldahl.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Indagar en referencias bibliográficas para reforzar conocimientos en la aplicación y metodología del método Kjeldahl.

2.2.2 Elaborar un manual de laboratorio detallado que describa el procedimiento para la determinación de proteína cruda en una muestra de concentrado para aves valiéndose del método Kjeldahl, siguiendo las pautas establecidas en la bibliografía recopilada.

2.2.3 Indicar el método adecuado para la selección representativa de la matriz asegurándose de tener en cuenta el tamaño de la muestra requerido y los parámetros de análisis específicos.

2.2.4 Proporcionar una normativa adecuada para comparar resultados.

CAPÍTULO III

3.0 MARCO TEÓRICO

3.1 Definición y clasificación del método de análisis.

Para poder realizar el análisis químico de la muestra alimentaria a analizar, se debe hacer uso de una rama de la química, la química analítica, la cual brinda las herramientas necesarias para poder determinar quiénes son las sustancias que están presentes en los alimentos y en qué cantidades estas sustancias se encuentran.

Así, la química analítica puede definirse como la rama de la química que se ocupa de la identificación y cuantificación de un componente químico en una sustancia dada. De esta definición se deriva que la química analítica se divide en dos grandes campos de actuación: el análisis cualitativo, cuyo objeto es identificar cuáles son los componentes que están presentes en una muestra, y el análisis cuantitativo, a través del cual se determina cuánto hay de cada componente en la muestra evaluada. Para complementar cualquiera de estos objetivos (cualitativos o cuantitativos), el procedimiento del cual se vale la química analítica se denomina método analítico¹.

El método analítico puede definirse como el conjunto de operaciones físicas y químicas que permite identificar y/o cuantificar un componente químico, al cual se denomina “analito” en el sistema material que lo contiene, conocido como “matriz”.

En síntesis, se denomina muestra a una parte representativa de la materia objeto de análisis, siendo una alícuota de la muestra una porción o fracción de la misma. Se llama analito a la especie química objeto del análisis. La matriz de la muestra será el conjunto de todas aquellas especies químicas que acompañan al analito en la muestra. La técnica analítica es el medio utilizado para llevar a cabo el análisis químico, mientras que el método analítico es un concepto más amplio pues no sólo incluye a la o las técnicas analíticas empleadas en un análisis sino también todas las operaciones implicadas hasta la consecución del resultado final².

Atendiendo a las características del procedimiento analítico y del principio general en el cual se fundamenta la determinación, los métodos de análisis químico pueden clasificarse en dos grandes grupos: métodos clásicos y métodos instrumentales.

Ambos grupos de métodos pueden emplearse con fines cualitativos y cuantitativos. Sin embargo, el contenido de este trabajo investigativo estará centrado en el estudio de los métodos clásicos de análisis cuantitativo, los cuales, a su vez, pueden clasificarse atendiendo al tipo de medición que se emplea para realizar la cuantificación del analito.

En este sentido, los métodos cuantitativos de análisis clásico pueden clasificarse en:

- Métodos de análisis gravimétrico: se fundamentan en el hecho de que la determinación del analito se alcanza midiendo directa o indirectamente su masa.
- Métodos de análisis volumétrico: los cuales se basan en la medida exacta del volumen de una solución que contiene suficiente reactivo para reaccionar completamente con el analito.

En el caso de este trabajo de investigación, se hará uso de la química analítica cuantitativa, específicamente del Método de análisis volumétrico, el cual se basa en la medición exacta del volumen de una solución que contiene suficiente reactivo para reaccionar completamente con el analito.

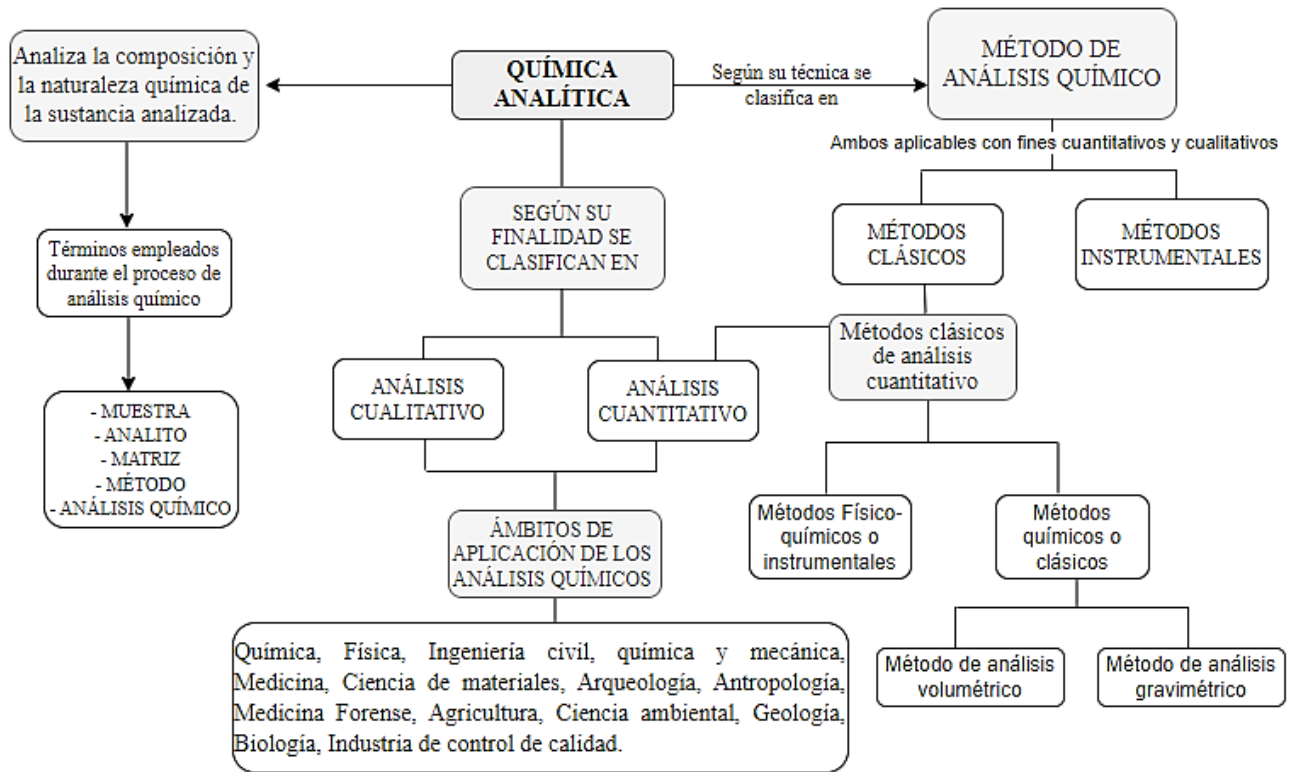


Figura N° 1. Mapa conceptual de las ramas de la química analítica.

Fuente: Elaboración propia.

3.1.1 Análisis volumétrico³.

El análisis volumétrico es todo aquel procedimiento basado en la medida de volumen de reactivo necesario para reaccionar con el analito. De este modo, al medir de forma exacta el volumen de reactivo, de concentración perfectamente conocida, necesario para reaccionar completamente con el analito, se podrá calcular su concentración en la muestra. Los requisitos que deben cumplir las reacciones que se emplean en los métodos volumétricos de análisis son:

- La reacción debe ser completa.
- La reacción debe ser rápida.
- La reacción debe poder describirse mediante una ecuación química balanceada.
- Posibilidad de detectar el punto final de la valoración.

Este tipo de análisis consiste en ir agregando lentamente, a la disolución de analito, la disolución estándar de reactivo desde la bureta u otro material de precisión dispensador de líquidos, hasta que la reacción entre las dos especies químicas se haya completado.

3.1.1.1 Tipos de volumetrías.

Los métodos de análisis volumétrico se pueden clasificar, atendiendo al tipo de reacción química:

- Volumetría de neutralización (o Volumetría ácido-base).
- Volumetría de precipitación.
- Volumetría de formación de complejos.
- Volumetría redox.

Por otro lado, si se atiende al procedimiento seguido para el desarrollo de la valoración, es decir, de acuerdo con la forma en que se realiza la valoración, los métodos volumétricos pueden clasificarse en métodos de valoración directos y métodos de valoración indirectos.

Teniendo en cuenta estas clasificaciones, vale la pena aclarar que, en este proyecto investigativo, si se habla en términos del procedimiento desarrollado se hablará de una valoración directa, mientras que, si nos referimos al tipo de reacción química presente, se hará uso del método la volumetría por neutralización.

3.1.1.1.1 Volumetría de neutralización⁴.

La volumetría de neutralización comprende un conjunto de reacciones que tienen lugar entre un ácido y una base con la correspondiente formación de sal y agua. Mediante estos métodos, utilizando una solución valorada de algún ácido se puede realizar la determinación cuantitativa de sustancias que se comportan como base (acidimetría) o, empleando una solución valorada de algún álcali, se pueden determinar cuantitativamente sustancias que se comportan como ácidos (alcalimetría).

El punto de equivalencia de una volumetría es un punto teórico que se alcanza cuando la cantidad de valorante añadido es químicamente equivalente a la cantidad de analito en la muestra. El punto de equivalencia es el resultado ideal (teórico) que se busca en toda valoración. Dado que el punto de equivalencia es un resultado teórico, su determinación experimental es imposible, en su lugar podemos estimar su posición al observar un cambio físico relacionado con la condición de equivalencia. A dicho cambio físico se le llama punto final de la volumetría.

La forma más común de observar el punto final de una volumetría es agregar un indicador químico a la disolución de analito para producir un cambio físico observable cerca del punto de equivalencia. Entre los cambios típicos de los indicadores se incluyen la aparición o desaparición de color, cambio de color, o aparición o desaparición de turbidez.

En los métodos de valoración ácido base, se emplean como indicadores sustancias orgánicas que cambian de color en función de la variación de pH durante el transcurso de la valoración. El color de los indicadores cambia en un cierto intervalo de pH el cual depende exclusivamente de las propiedades del indicador y es independiente de la naturaleza del ácido o de la base que constituyen los reaccionantes.

Así una sustancia que pretenda ser empleada como indicador en la volumetría de neutralización, debe cumplir los siguientes requisitos.

- El color del indicador debe cambiar bruscamente en un pequeño intervalo de pH.
- El color del indicador debe ser lo más intenso posible.
- La cantidad de base o ácido (reaccionantes) que reaccione con el indicador debe ser tan insignificante que no altere los resultados de la valoración.
- El cambio de color del indicador debe ser un proceso plenamente reversible.

Se conocen muchos indicadores de pH, y sus constantes de ionización aparentes se distinguen muy nítidamente. Por eso, las zonas de viraje de diferentes indicadores cubren prácticamente toda la escala de pH, comenzando por pH 0 a pH 12 y mayor. Lo expuesto se ilustra en la Tabla N° 1.

Como regla general de selección de los indicadores: “en una valoración ácido base, se pueden utilizar como indicadores solo aquellos cuyo rango de viraje se hallen total o parcialmente dentro de los límites del salto brusco de la curva de valoración”.

Tabla N° 1. Algunos indicadores ácido base y sus intervalos de viraje⁵.

Indicador	Disolvente	Concentración %	Tipo de indicador	COLOR		Zona de viraje
				Forma ácida	Forma alcalina	
Amarillo de alizarina	Agua	0.1	Ácido	Amarillo	Violeta	10.1 – 12.1
Timolftaleína	Alcohol al 90%	0.1	Acido	Incoloro	Azul	9.4- 10.6
Fenolftaleína	Alcohol al 60%	0.1 y 1.0	Acido	Incoloro	Rojo	8.2 – 10.0
Púrpura de cresol	Alcohol al 20%	0.5	Acido	Amarillo	Purpúreo	7.4 – 9.0
Rojo neutro	Alcohol al 60%	0.1	Base	Rojo	Amarillo-castaño	6.8 – 8.0
Rojo de fenal	Alcohol al 20%	0.1	Acido	Amarillo	Rojo	6.8 – 8.0
Azul de bromotinol	Alcohol al 20%	0.05	Acido	Amarillo	Azul	6.0 – 7.6
Tornasol	Agua	1.0	Acido	Rojo	Azul	5.0 – 8.0
Rojo de metilo	Alcohol al 60%	0.1 y 0.2	Base	Rojo	Amarillo	4.4 – 6.2
Anaranjado de metilo	Agua	0.1	Base	Rosa	Amarillo	3.0 – 4.4
Azul de bromofenol	Agua	0.1	Acido	Amarillo	Azul	3.0 – 4.6
Tropeolina	Agua	0.01; 0.1 y 1.0	Base	Rojo	Amarillo	1.4 – 3.2
Violeta cristalino	Agua	-		Verde	Violeta	0.0 – 2.0

3.2 Muestra: Concentrado para aves ponedoras.

Los huevos son nutritivos y ricos en proteína y estos son una excelente fuente de proteína de alta calidad para los humanos. El consumo de huevos ha seguido creciendo, lo que ha conllevado al impulso del desarrollo de la industria de las gallinas ponedoras.

El alimento es la base material para las gallinas ponedoras y tiene un gran impacto en la salud de estas, así como en el rendimiento productivo y los beneficios reproductivos. La calidad del alimento está estrechamente relacionado con la calidad de las materias primas del alimento, la composición de la fórmula y la tecnología de procesamiento⁶.

En el caso de los animales de producción, como lo es el caso de las gallinas ponedoras, es fundamental que la cantidad de concentrado brindada proporcione a la gallina todos los nutrientes que esta necesita para conseguir un máximo rendimiento productivo en cuanto a cantidad y calidad de los productos, garantizar de igual manera, que su costo sea el más bajo posible y que prevenga la aparición de trastornos digestivos o metabólicos.

3.2.1 Características del pienso para gallinas ponedoras⁷.

Para lograr el nivel máximo de crecimiento y buena salud, las gallinas ponedoras necesitan una selección amplia y equilibrada de nutrientes en su dieta. Las necesidades nutricionales de las aves varían según la especie y la edad. Las aves necesitan un suministro constante de energía, proteínas, aminoácidos esenciales, ácidos grasos esenciales, minerales, vitaminas y, lo más importante, agua. Las gallinas ponedoras obtienen la energía y los nutrientes necesarios a través de la digestión de los concentrados o pienso para aves específicos para la finalidad de la producción de huevos.

A continuación, se presenta un resumen de los niveles mínimos recomendados de nutrientes seleccionados para las gallinas ponedoras (Ver Tabla N°2).

Tabla N° 2. Necesidades mínimas de nutrientes recomendadas para gallinas ponedoras, como porcentaje o unidades por kilogramo de dieta (90% de materia seca)⁸.

Nutriente	Unidad	Gallinas Ponedoras
Energía Metabolizable	Kcal/Kg	2,900
Proteína Bruta	%	15
Arginina	%	0.7
Leucina	%	0.82
Lisina	%	0.69
Metionina	%	0.3
Fenilalanina	%	0.47
Triptófano	%	0.16
Ácido linoleico	%	1
Calcio	%	3.25
Cloro	%	0.13
Potasio	%	0.15
Sodio	%	0.15
Yodo	mg	0.04
Hierro	mg	45
Manganeso	mg	20
Zinc	mg	35

3.3 Preparación de la muestra⁹.

La etapa de preparación de muestra es una de las etapas que puede considerarse crítica en una metodología analítica. El objetivo central del proceso de preparación de la muestra es el de poner al analito en condiciones óptimas para ser analizado; dicho de otro modo, obtener muestras

enriquecidas en las sustancias de interés analítico y asegurar la detección y/o cuantificación eficiente del o los analitos, así como la compatibilidad con el sistema analítico, lo cual está obviamente relacionado con el éxito del análisis.

En el análisis de los alimentos, la preparación de la muestra incluye un número de etapas más o menos numerosas que dependen del tipo de producto (matriz) y del componente que se desea cuantificar (analito). Ahora bien, existen dos momentos perfectamente delimitados que pueden clasificarse como subetapas y forman parte de la etapa de preparación de la muestra, estas subetapas son: preparación de la muestra bruta y preparación de la porción de ensayo.

3.3.1 Preparación de la muestra bruta.

Constituye un proceso de tratamiento de la matriz dirigida a garantizar la representatividad de los resultados y a facilitar la posterior extracción del analito. Se realiza, como su nombre lo indica, a la muestra que llega al laboratorio (muestra bruta) antes de proceder a la pesada o medida del volumen de esta.

Usualmente, el procedimiento de preparación de la muestra bruta aparece descrito en normas que regulan e indican cómo debe realizarse esta etapa en función de las características de la matriz.

La muestra que se va a utilizar para el análisis debe ser representativa del lote, para que los resultados obtenidos tengan validez.

Con el fin de evitar que se produzcan errores ajenos a la eficacia y exactitud del analista, hay que seguir los procedimientos correctos en la toma de muestras. Con frecuencia esto escapa al control del químico, pero los procedimientos en cuestión pueden aplicarse una vez que se recibe la muestra bruta en el laboratorio. La muestra debe ser lo más representativa del lote que se va a analizar y la porción que se pesa para efectuar las diferentes determinaciones debe ser una fracción exacta del producto total.

En concreto para este trabajo, al ser el concentrado para aves ponedoras un granulado, la toma de muestra representativa se realiza por cuarteo, según el siguiente procedimiento: Se depositan los gránulos o polvo sobre una gran hoja de papel y se mezcla con una espátula. Se traza una cruz sobre el montón de material apilado y luego se eliminan dos de los segmentos opuestos y se vuelven a introducir en el paquete original. Se continúa este procedimiento hasta que quede una muestra de

unos 250 gramos que se transfiere a un frasco de muestras y se tapa herméticamente. La muestra debe analizarse antes de las 24 horas posteriores a su preparación (Ver Figura N°2).

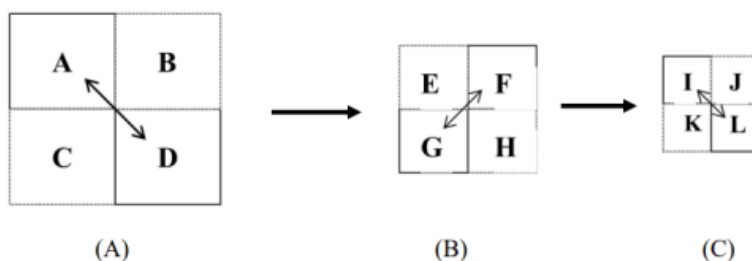


Figura N° 2. Preparación de muestras por cuarteo¹⁰.

La muestra pulverizada se extiende formando un cuadrado que se divide en otros 4 cuadros. Los cuartos B y C se rechazan, los cuartos A y D se mezclan para dar (B). En las figuras (B) y (C), los cuartos E, H, J y K serán rechazados; I y L serán la muestra para analizar.

3.4 Proteínas.

Las proteínas son compuestos químicos muy complejos que se encuentran en todas las células vivas, en la sangre, en la leche, en los huevos y en toda clase de semillas. Hay ciertos elementos químicos que todas ellas poseen, pero los diversos tipos de proteínas los contienen en diferentes cantidades. En todas se encuentran un alto porcentaje de nitrógeno, así como de oxígeno, hidrógeno y carbono. En la mayor parte de ellas existe azufre y en algunas, fósforo y hierro¹¹.

La proteína en los alimentos es un nutriente esencial compuesto por cadenas de aminoácidos que desempeña un papel fundamental en el crecimiento, mantenimiento y reparación de los tejidos del cuerpo. Es crucial para numerosas funciones biológicas y metabólicas, incluyendo la formación de enzimas, hormonas y estructuras celulares.

La proteína cruda es un componente esencial en la nutrición animal y se compone principalmente de aminoácidos. Es un factor clave para el crecimiento, la salud y la producción en aves ponedoras. La determinación precisa de la proteína cruda en los alimentos para aves es esencial para formular dietas adecuadas y maximizar la eficiencia de la producción.

3.4.1 Función de la Proteína en la Nutrición Aviar¹².

- La proteína es esencial para el crecimiento, el desarrollo y la reparación de tejidos en aves.

- Actúa como enzimas y hormonas que regulan los procesos metabólicos.
- Es un componente crucial para la producción de huevos y la calidad del huevo en las aves ponedoras.

3.4.2 Importancia de la Determinación Precisa de Proteína Cruda.

La determinación de proteínas en alimentos no es necesariamente un procedimiento sencillo. Esto se debe parcialmente a que los alimentos son masas heterogéneas, constituidas por una gran diversidad de nutrientes como, por ejemplo, carbohidratos, lípidos y múltiples tipos de micronutrientes. Por lo tanto, es usual que la composición, estructura o matriz de los alimentos y las interacciones entre los diversos nutrientes puedan reducir la accesibilidad de las proteínas, lo que conduce a una subestimación de su contenido.

La nutrición avícola es un campo crucial para garantizar la salud, la producción y la reproducción adecuadas de las aves. Las aves ponedoras tienen requisitos específicos de proteínas para mantener la producción de huevos y la salud general. La proteína cruda es uno de los principales componentes dietéticos que influyen en la salud y el rendimiento de las aves ponedoras.

La formulación inadecuada de dietas puede resultar en deficiencias o excesos de proteína, afectando negativamente la producción y la salud del ave. Un concentrado con un nivel adecuado de proteína garantiza una producción de huevos constante y de buena calidad, lo que es esencial para la rentabilidad de las granjas avícolas.

La calidad nutricional de los concentrados para aves ponedoras depende en gran medida de su contenido de proteínas, ya que estas son esenciales para el crecimiento, desarrollo y producción de huevos en las aves. Según Gupta y Kumar (2019), la evaluación del contenido de proteína cruda en los concentrados es crucial para formular dietas balanceadas que satisfagan las necesidades nutricionales de las aves en diferentes etapas de producción¹³.

3.5 Método de Kjeldahl para Determinación de Proteínas.

Las proteínas pueden definirse como macromoléculas complejas de alto peso molecular que por hidrólisis completa rinden aminoácidos o compuestos similares. Uno de los compuestos químicos que se encuentra en mayor proporción en las proteínas es el nitrógeno y pese a que no todo el nitrógeno de la materia orgánica proviene necesariamente de las proteínas, los métodos de determinación de proteínas totales usados hoy en día se fundamentan en la cuantificación de nitrógeno total.

El método aceptado universalmente como estándar para la determinación de nitrógeno total es el conocido como el método de Kjeldahl-Willfarth-Gunning. Ante tal perspectiva, el método Kjeldahl es descrito en múltiples normativas: AOAC (Asociación Científica Dedicada a la Excelencia Analítica), USEPA (Agencia de protección medioambiental de los Estados Unidos), ISO (Organización Internacional de Normalización), Farmacopeas y distintas Directivas Comunitarias, como el método oficial para la determinación de proteínas en alimentos.

El Nitrógeno total es la suma de los nitrógenos amoniacal y orgánico presentes en la muestra, conocido como nitrógeno Kjeldahl.

Para la etapa de digestión, Kjeldahl utilizó originalmente una solución de permanganato de potasio con el fin de oxidar toda la materia orgánica, pero los resultados obtenidos no fueron satisfactorios. En 1885, Willfarth observó que, realizando la digestión con ácido sulfúrico concentrado y en caliente, se obtienen resultados satisfactorios. Cuatro años más tarde Gunning sugirió la adición de sulfato de potasio para elevar el punto de ebullición de la mezcla y acortar así los tiempos de digestión. De ahí que el método se conozca con el nombre de los tres autores, aunque en la actualidad aparece mayoritariamente reportado como método de Kjeldahl¹⁴.

El método de Kjeldahl ha sido ampliamente utilizado para determinar el contenido de proteína cruda en concentrados para aves ponedoras debido a su precisión y fiabilidad. Según los autores Sá LRD, Silva MAD, Lopez CDS, Maciel MPO, Menezes GO, Oliveira IM en la Revista Brasileña de Zootecnia: Niveles de proteína bruta en dietas para gallinas ponedoras: rendimiento, calidad del huevo y metabolismo del nitrógeno- (2018), este método es especialmente útil en la industria avícola para monitorear la calidad nutricional de los alimentos balanceados y asegurar un suministro adecuado de proteínas para mantener la producción óptima de huevos¹⁵.

El método de Kjeldahl es un procedimiento estándar reconocido internacionalmente para la determinación de nitrógeno total en muestras orgánicas. Dado que las proteínas contienen nitrógeno en cantidades conocidas, el contenido de nitrógeno se utiliza como un indicador indirecto de la cantidad de proteína presente en la muestra¹⁶.

La determinación de proteínas por el método Kjeldahl se fundamenta en la cuantificación del Nitrógeno Total, proveniente de aminoácidos y proteínas de la muestra, a través de tres etapas fundamentales:

- Digestión
- Destilación
- Valoración.

Finalmente, el contenido de Nitrógeno obtenido se multiplica por un factor característico de cada alimento y los resultados se expresan en % de Proteínas Totales.



Figura N° 3. Etapas del Método de Kjeldahl¹⁷.

3.5.1 Etapa 1: Digestión^{18, 19, 20}.

En el área química, el proceso de digestión se puede definir como un mecanismo químico para solubilizar el analito y descomponer la muestra con la ayuda de calor y reactivos químicos, de esta manera este proceso logra reducir interferencias y facilita el análisis en los instrumentos de medición.

Para este caso en particular, el proceso de digestión química es un procedimiento estándar en química analítica que se utiliza mayoritariamente en la preparación de muestras de diferentes métodos analíticos.

El principio básico de la digestión es la destrucción oxidativa de la matriz de la muestra para extraer la sustancia a determinar para su posterior análisis. Con este objetivo, las muestras se suelen llevar a ebullición con un ácido a alta temperatura.

En la industria alimentaria, los aparatos de digestión se utilizan en el análisis Kjeldahl para la determinación del contenido de nitrógeno y proteínas en gran diversidad de productos alimenticios.

3.5.1.1 Digestor.

Para llevar a cabo el proceso de digestión, es utilizado un equipo especializado llamado digestor, cuya función principal es descomponer las sustancias orgánicas complejas, especialmente aquellas que contienen nitrógeno, para que la muestra pueda ser analizada más fácilmente.

Un digestor es un sistema y equipo diseñado para realizar digestiones químicas seguras de una muestra. Es el equipo donde será realizada la digestión de la muestra. Se trata de una especie de

cámara, con funcionamiento semejante a una placa calentadora. Sin embargo, hay orificios para colocar los tubos con las muestras a digerir. Cabe resaltar que la muestra debe recibir calor de manera uniforme por lo que debe administrarse calor por la mayor área de superficie. Estos bloques de digestión resultan especialmente adecuados para el procesamiento en serie de muestras, ya que pueden digerir hasta 40 muestras simultáneamente. (Ver figura N°4).



Figura N° 4. *Bloque digester Kjeldahl* ²¹.

El método del digester químico se fundamenta en convertir proteínas, aminos, compuestos orgánicos y otros compuestos de nitrógeno en compuestos de amoníaco. Se añade una cáustica para liberar el amoníaco, que luego se destila y se valora. Las muestras se calientan de 360 °C a 410 °C en presencia de ácido sulfúrico concentrado y un catalizador. Esto descompone o digiere la muestra y libera el nitrógeno. La digestión se completa cuando se clarifica el líquido y se liberan los vapores. Las muestras se enfrían y el líquido se destila y se valora. Todo el proceso de digestión se desarrolla en un sistema cerrado y funciona de forma completamente automática.

3.5.1.2 Tubos de borosilicato.

Además, vale la pena mencionar que todo este procedimiento es realizado en tubos de borosilicato, estos son fabricados a partir de un tipo de vidrio con bajo coeficiente de expansión térmica cuyos principales constituyentes son sílice y óxido de boro. Es un tubo de vidrio de calidad premium que se produce a partir de vidrio de borosilicato para proporcionar una excelente resistencia química y durabilidad (Ver figura N°5).

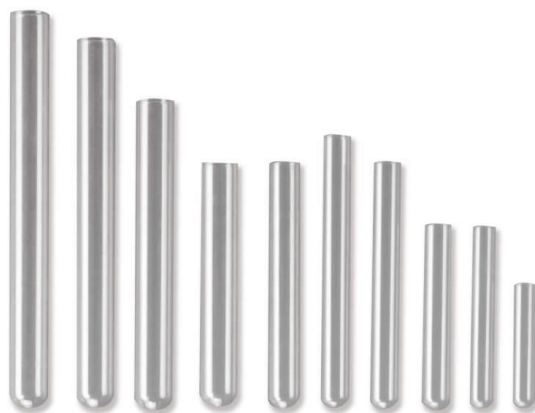


Figura N° 5. Tubos de Borosilicato²².

En síntesis, el tubo de borosilicato es el recipiente donde será colocada la muestra junto al ácido concentrado y catalizadores, para que sea sometida al bloque digestor y alcanzar la temperatura de reacción. Se utilizan estos tubos ya que han sido construidos con vidrio resistente al calor y a los elementos químicos a fin de evitar rupturas o incidentes en el laboratorio. Es posible utilizar tubos micro o macro, dependiendo de la necesidad y de la naturaleza de la muestra.

Para esta primera etapa de la digestión, la muestra homogeneizada es previamente pesada en la balanza analítica y mezclada en la proporción necesaria de ácido sulfúrico concentrado en un tubo de borosilicato. A continuación, es adicionado el catalizador que actuará en la aceleración de la digestión.

Los catalizadores normalmente utilizados son:

- Sulfato de Cobre: Para que la muestra y el ácido sulfúrico reaccionen de manera efectiva.
- Selenito de Sodio: Para minimizar detonaciones dentro del tubo.
- Sulfato de Sodio: Para elevar el punto de ebullición del ácido sulfúrico hasta aproximadamente 360°C.

La mezcla preparada es colocada en el bloque digestor. La temperatura mínima del bloque para que la reacción ocurra es de 350°C, sin embargo, normalmente, es fijada en 400°C, para garantizar la eficiencia del proceso. Con el calentamiento del bloque digestor juntamente con la mezcla ácida, el carbono contenido en la muestra es oxidado hasta dióxido de carbono, este dióxido se desprende y todo el nitrógeno es transformado en sulfato de amonio y agua, transformando la muestra oscura en una solución translúcida.

La reacción general que tiene lugar es la siguiente:



Cuando la digestión termina, la solución queda transparente, libre de partículas carbonosas.

En el caso de haber empleado como catalizador el sulfato de cobre, la solución toma un color azul verdoso.

3.5.2 Etapa 2: Destilación^{18, 19, 20.}

Para esta segunda etapa es necesario el uso de un equipo especial, el destilador de nitrógeno, este aparato es utilizado para la destilación de nitrógeno amoniacal, bases volátiles totales y análisis de proteína y nitrógeno a través del método de Kjeldahl (Ver figura N°6).



Figura N° 6. Destilador de Nitrógeno²³.

El método consiste en una digestión con ácido sulfúrico concentrado y una mezcla catalítica para acelerar la reacción, seguida de una destilación con hidróxido de sodio para liberar el ion amonio que se encuentra retenido (generalmente) en el ácido bórico.

En la destilación el objetivo es transformar el nitrógeno presente en la solución en forma de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Sulfato de amonio, estable en medio líquido) a NH_4OH (Hidróxido de amonio, volátil). Con adición de Hidróxido de sodio (NaOH) concentrado y con el calentamiento, ocurre la liberación del ion amonio que se separa de la mezcla por destilación. El NH_4^+ (ion amonio) liberado

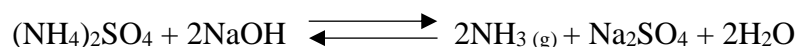
queda atrapado en una solución de ácido bórico, formando borato de amonio, que luego se titula con ácido estandarizado para calcular el contenido de nitrógeno.

Después de la digestión de la muestra, la solución de sulfato de amonio obtenida en el tubo es enfriada a temperatura ambiente y, posteriormente, es llevada al destilador de nitrógeno. Antes de comenzar con el proceso de destilación, es necesario que sea colocado un Erlenmeyer en la salida del condensador del equipo, que deberá contener una solución alcohólica de ácido bórico y un indicador, generalmente, rojo de metilo.

El tubo es colocado en el destilador, donde es dosificado hidróxido de sodio (NaOH 40% P/V) para la neutralización. El sulfato de amonio, presente en el tubo, en contacto con el hidróxido de sodio dosificado y el vapor de agua de la caldera del equipo, es transformado en hidróxido de amonio y, así, liberado en estado gaseoso.

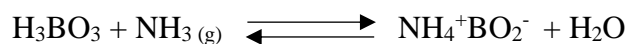
En resumen, el tubo de borosilicato que contiene la muestra dirigida se coloca en un destilador de nitrógeno, donde se dosifica hidróxido de sodio para su neutralización. El sulfato de amonio, presente en el tubo, en contacto con el hidróxido de sodio y el vapor de agua de la caldera del equipo, se transforma en hidróxido de amonio y, por lo tanto, se libera en estado gaseoso.

La reacción que tiene lugar es la siguiente:



Cuando el hidróxido de amonio es liberado, éste pasa por el sistema de destilación del equipo y condensa dentro del Erlenmeyer que fue preparado previamente con la solución alcohólica de ácido bórico y el indicador, formando el borato de amonio en una coloración que pasa de rojo pálido para verde.

La reacción que ocurre es la siguiente:



Una vez observado el viraje de color, se da por finalizada la destilación de la muestra.

3.5.3 Etapa 3: Valoración^{18, 19, 20}.

El último paso del análisis de proteínas por el método Kjeldahl es la titulación directa.

En esta etapa final, el destilado obtenido del paso N°2 (destilación) se titula con ácido fuerte estandarizado (titulación directa con ácido clorhídrico estandarizado 0.1 mol/L) el cual desplaza la molécula de borato, separando el borato de amonio formado en la destilación, esto con el fin de cuantificar el nitrógeno total presente en la muestra. Luego, el contenido de proteína se estima indirectamente a través del cálculo multiplicando el contenido de nitrógeno por un factor de conversión.

Para el procedimiento de titulación directa propiamente dicho, el borato de amonio formado se valora entonces utilizando como patrón valorante una solución estandarizada de ácido clorhídrico, donde tiene lugar la siguiente reacción:



El punto final de la valoración estará a pH ácido, por la presencia de ácido bórico finalmente formado.

El volumen de solución titulante requerido para la muestra, junto con el factor de corrección del ácido clorhídrico y el factor de conversión del nitrógeno se utilizan para el cálculo final para obtener la concentración de proteína en la muestra.

3.6 Cálculo de resultados.

El porcentaje de nitrógeno total se puede calcular a partir del volumen de ácido clorhídrico (concentración conocida y valorada) gastado, de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ N} = \frac{(V_m - V_b) \times N_{\text{HCl}} \times 14 \times 100}{\text{Peso de la muestra en mg}}$$

Donde:

%N = Nitrógeno total

V_m = Volumen de HCl gastado en la muestra

V_b = Volumen de HCl gastado en el blanco

N = Normalidad de HCl

Mientras que, para determinar el porcentaje propiamente dicho de proteína bruta, se obtiene a partir de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Proteína Bruta} = \% \text{ N} * F$$

Los resultados se expresan en % de proteínas y se dan aproximadamente hasta la centésima.

El contenido de nitrógeno finalmente calculado se multiplica por un factor característico de cada alimento y se obtiene entonces el contenido de proteínas totales.

Los factores de conversión utilizados para algunos alimentos se relacionan a continuación:

Tabla N° 3. Factores de conversión de nitrógeno a proteína para algunos alimentos²⁴.

Alimento	% N de proteína	Factor
Huevo o carne	16.00	6.25
Leche	15.70	6.38
Trigo	18.76	5.33
Maíz	17.70	5.65
Avena	18.66	5.36
Soya	18.12	5.52
Arroz	19.34	5.17

Para determinar este factor de conversión de nitrógeno a proteína, se debe tener en consideración el % de nitrógeno presente en cada alimento, en base a la siguiente fórmula:

$$\text{Factor} = \frac{100 \text{ g de proteína}}{\text{g de Nitrogeno presente en la muestra}}$$

3.7 Práctica de determinación²⁵.

Una práctica de determinación de análisis químico de un alimento o materia prima para alimentos es una guía detallada con la finalidad de la obtención de la identidad, llámese esto identificación, de la concentración (cuantificación) o de la estructura de uno o más analitos, a través del análisis de una muestra.

Una elaboración de práctica de determinación de análisis químico de un alimento implica los siguientes pasos clave:

- Definir el objetivo del análisis, es decir, qué se busca determinar en la muestra de alimento (identificación, concentración o estructura de los analitos).
- Seleccionar el método analítico más adecuado para la determinación, considerando la naturaleza de los analitos y la matriz del alimento. Algunos métodos comunes son gravimétricos, volumétricos, espectroscópicos, entre otros. Es importante señalar que el análisis conduce a determinar la calidad de un producto alimenticio, por lo cual es necesario conocer las técnicas y métodos; además, para obtener buenos resultados analíticos es necesario llevar a cabo una buena preparación de la muestra, por lo que se debe considerar que los trabajadores del laboratorio deben tener una buena apreciación de muestreo, análisis estadístico y de criterios de calidad, así como una buena comprensión de los resultados obtenidos.
- Preparar correctamente la muestra de alimento para el análisis, siguiendo procedimientos establecidos para evitar contaminaciones o pérdidas de analitos.
- Realizar las mediciones necesarias según el método seleccionado, aplicando las técnicas analíticas específicas para obtener resultados precisos.
- Interpretar los datos obtenidos y calcular las concentraciones o cantidades de los analitos presentes en la muestra de alimento.
- Presentar los resultados de manera clara y concisa, incluyendo unidades de medida y posibles incertidumbres asociadas.
- Discutir e interpretar los resultados, identificar posibles fuentes de error y extraer conclusiones relevantes del análisis realizado.
- Garantizar el cumplimiento de las normas de seguridad en el laboratorio durante todo el proceso de determinación.

En síntesis, la elaboración de una práctica de determinación de análisis químico de un alimento implica un proceso estructurado que permite identificar y cuantificar los analitos de interés en la muestra, siguiendo procedimientos analíticos establecidos y aplicando buenas prácticas de laboratorio.

CAPÍTULO IV

4.0 RESULTADOS: PRODUCTO FINAL

Como aplicación de los temas estudiados en el Diplomado de especialización “Análisis químico de los alimentos” se elaboró una práctica de laboratorio para la determinación de proteína cruda en muestras de concentrado para aves. Las partes fundamentales que componen el diseño de esta práctica son:

- Título de la práctica.
- Introducción
- Objetivos.
- Tipo de método de análisis y Fundamento.
- Información general de la muestra.
- Reactivos.
- Materiales y equipos.
- Procedimiento de práctica de determinación.
- Cálculos involucrados.
- Normativas nacionales o internacionales a utilizar, para poder interpretar los resultados.
- Referencias bibliográficas.

DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA CRUDA EN MUESTRA DE CONCENTRADO PARA AVES PONEDORAS MEDIANTE MÉTODO DE KJELDAHL.

4.1 Introducción.

La palabra proteína se aplica a un amplio rango de compuestos nitrogenados, conocidos como alimentos plásticos. Estructuralmente, estos compuestos son polímeros cuyas unidades básicas son aminoácidos, unidos por un enlace característico llamado enlace peptídico. La secuencia de grupos aminoácidos es fundamental para caracterizar una proteína y determina sus propiedades físicas, químicas y nutricionales. En la práctica rutinaria, se determina más frecuentemente el contenido total de proteínas que las proteínas o aminoácidos individuales. Debido a que el nitrógeno representa en la mayoría de las sustancias proteicas un porcentaje relativamente constante, alrededor del 16%, su determinación se utiliza como una medida del contenido proteico en los alimentos.

El contenido proteico de los alimentos se puede determinar utilizando diversos métodos. Una de las formas más habituales es la cuantificación indirecta y aproximada, que se puede realizar mediante la determinación del contenido en nitrógeno total de la muestra, el cual se utiliza posteriormente para calcular el contenido de proteínas. El método Kjeldahl, desarrollado por Johan Gustav Kjeldahl en 1883, se utiliza para determinar el nitrógeno en una amplia gama de muestras, incluyendo alimentos y bebidas, piensos, forrajes, fertilizantes, aguas residuales y suelos. La versatilidad y robustez de este método lo convierten en una herramienta invaluable en laboratorios de investigación, industrias alimentarias y agroalimentarias, entre otros. Se denomina proteína bruta o proteína total a la obtenida por este método.

4.2 Objetivos.

- Establecer los fundamentos del método Kjeldahl para la determinación del contenido en proteína del concentrado para aves ponedoras.
- Conocer el procedimiento experimental del análisis de proteínas por el método de Kjeldahl.
- Calcular el porcentaje de proteína de un alimento a partir del contenido de nitrógeno obtenido por el método Kjeldahl.

4.3 Método de análisis.¹

El contenido en nitrógeno que se expresa como nitrógeno total o proteína bruta, se determina casi siempre por combustión líquida en la que se convierte el nitrógeno primero en sulfato amónico y finalmente en amoníaco; el amoníaco formado se destila, se recoge en ácido bórico y se titula con una disolución ácida normalizada. Este método, ideado por J. Kjeldahl en 1883, ha sufrido numerosas modificaciones, no en lo fundamental, sino en lo que se refiere a los catalizadores aplicados para acelerar o hacer más completa la digestión, en general consiste en:

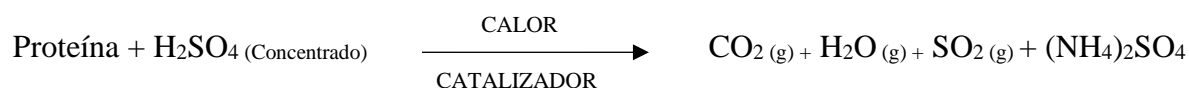
- Oxidación de la muestra con H_2SO_4 y un catalizador, durante la cual la materia orgánica se destruye y el nitrógeno se convierte en sulfato ácido de amonio.
- Descomposición del sulfato ácido de amonio por medio de un exceso de álcali fuerte para liberar el amoníaco, el cual se recoge por destilación sobre ácido bórico.
- Titulación del borato de amonio formado con solución patrón de HCl o de H_2SO_4 , usando como indicadores de punto final una mezcla de rojo de metilo y azul de metileno o una mezcla de rojo de metilo y verde de bromocresol.

El método de Kjeldahl consta de tres etapas; los fundamentos de cada una de las etapas se describen a continuación:

Etapa 1: Digestión.

Para el desarrollo de esta etapa se utiliza ácido sulfúrico concentrado y sulfato de cobre como agente catalizador, los cuales, con el apoyo de calor y sulfato de potasio, oxidan la materia orgánica hasta obtener dióxido de carbono y agua, convirtiendo todo el nitrógeno amínico (NH_2) e imínico ($\text{NH}=\text{NH}$) derivado de proteínas y aminoácidos en ion amonio (NH_4^+).

La reacción que tiene lugar durante esta etapa es la siguiente:



Donde:

$\text{H}_2\text{SO}_4 (\text{Concentrado})$ = Ácido sulfúrico concentrado.

$\text{CO}_2 (\text{g})$ = Dióxido de carbono en estado gaseoso.

$\text{H}_2\text{O} (\text{g})$ = Agua en estado gaseoso.

$\text{SO}_2 (\text{g})$ = Dióxido de Azufre.

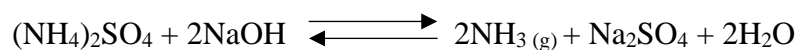
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ = Sulfato de Amonio.

Para esta etapa, pueden ser utilizados diferentes catalizadores, entre ellos: mercurio, cobre y selenio. Cuando la digestión termina, la solución queda transparente, libre de partículas carbonosas.

Etapa 2: Digestión.

La muestra, ahora ya digerida se trata con una base fuerte añadida en exceso, la cual reacciona descomponiendo el sulfato de amonio en amoníaco, que es volátil y se destila por arrastre con vapor.

La reacción que tiene lugar es la siguiente:



Donde:

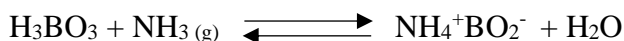
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ = Sulfato de Amonio.

NaOH = Hidróxido de Sodio.

$\text{NH}_3(\text{g})$ = Amoniacó en estado gaseoso.

Na_2SO_4 = Sulfato de sodio.

El amoníaco destilado se recoge en un Erlenmeyer con una mezcla de indicadores (bromocresol verde-rojo de metilo) y solución alcohólica de ácido bórico. La reacción que ocurre es:



Donde:

H_3BO_3 = Ácido Bórico

$\text{NH}_3(\text{g})$ = Amoniacó en estado gaseoso.

$\text{NH}_4^+\text{BO}_2^-$ = Borato de amonio.

Etapa 3: Valoración directa.

La cuantificación del nitrógeno amoniacal se realiza por medio de una volumetría ácido-base del ion borato formato, empleando ácido clorhídrico o sulfúrico y como indicador una disolución alcohólica de una mezcla de rojo de metilo y azul de metileno. Los equivalentes de ácido consumidos corresponden a los equivalentes de amoniacó destilados.

La reacción que tiene lugar es la siguiente:



Donde:

BO_2^- = Borato.

H_3BO_3 = Ácido Bórico.

El punto final de la valoración estará a pH ácido, por la presencia de ácido bórico finalmente formado.

4.4 Muestra a analizar.

Para la selección de la muestra, se llevan a cabo una serie de pasos para un correcto muestreo: selección de muestra de laboratorio, selección de muestra y la posterior selección de la porción que será analizada en el laboratorio.

Muestra de laboratorio: Muestra representativa de la calidad y el estado del lote, obtenida por reducción de la muestra a granel y destinados para el análisis u otro examen.

Muestra: Porción representativa de la muestra de laboratorio, se obtiene al dividir por medio de un divisor o en forma manual, si es necesario después de la reducción del tamaño de partícula.

Porción de ensayo: Porción representativa de la muestra o muestras de laboratorio.

La muestra para analizar es el concentrado del cual se alimentan las aves ponedoras de huevos.

Para este análisis, se tomarán en cuenta las especificaciones descritas en el Reglamento (CE) N° 152/2009 de la Comisión, de 27 de enero de 2009, por el que se establecen los métodos de muestreo y análisis para el control oficial de los piensos² (Ver Anexo 1).

Este reglamento detalla el correcto muestreo y almacenamiento para el análisis del pienso para aves.

Para el caso de la selección de la muestra de laboratorio (lote de pienso):

El Reglamento detalla la correcta selección de muestras en función del tipo de matriz, lo que se detalla en la siguiente tabla (Ver Tabla 4):

Tabla N° 4. Tabla para la selección de muestras en base a la matriz².

Muestras elementales	
Piensos a granel	Número mínimo de muestras elementales
Lotes objeto de muestreo que no superen las 2,5 toneladas	Siete
Lotes objeto de muestreo que superen las 2,5 toneladas	$\sqrt{\quad}$ Veinte veces el número de toneladas que constituyen el lote objeto de muestreo, hasta un máximo de 40 muestras elementales
Piensos envasados	Número mínimo de envases de los que deben tomarse muestras.
Envases con un contenido superior a 1 kg	
Lotes objeto de muestreo compuestos de uno a cuatro envases	Todos los envases
Lotes objeto de muestreo compuestos de cinco a 16 envases	Cuatro
Lotes objeto de muestreo compuestos de más de 16 envases	$\sqrt{\quad}$ Número de envases que componen el lote objeto de muestreo, hasta un máximo de 20 envases
Envases de no más de 1 kg	Cuatro
Piensos líquidos o semilíquidos	Número mínimo de recipientes de los que deben tomarse muestras.
Recipientes de no más de 1 l	Cuatro

Continuación Tabla N°4

Muestra global	
Se requiere una sola muestra global por cada lote objeto de muestreo. La cantidad total de las muestras elementales que constituyen la muestra global no será inferior a las cantidades siguientes:	
Piensos a granel	4 kg
Piensos envasados	
Envases de más de 1 kg	4 kg
Envases de no más de 1 kg	Peso del contenido de cuatro envases originales
Piensos líquidos o semilíquidos:	
Recipientes de más de 1 l	4 l
Recipientes de no más de 1 l	Volumen del contenido de cuatro envases originales
Muestras finales	
La muestra global da lugar, una vez reducida si es necesario, a las muestras finales. Se requiere el análisis de, por lo menos, una muestra final. La cantidad de muestra final destinada al análisis no será inferior a lo que se indica a continuación:	
Piensos sólidos	500 g
Piensos líquidos o semilíquidos	500 ml
Muestras elementales	
Piensos envasados	Número mínimo de envases de los que deben tomarse muestras
Lotes objeto de muestreo compuestos de uno a cuatro envases	Todos los envases
Lotes objeto de muestreo compuestos de cinco a 16 envases	Cuatro
Lotes objeto de muestreo compuestos de más de 16 envases	$\sqrt{\text{Número de envases que componen el lote objeto de muestreo, hasta un máximo de 40 envases}}$

Muestras globales	
El número de muestras globales variará en función del tamaño del lote objeto de muestreo. A continuación se indica el número mínimo de muestras globales por cada lote objeto de muestreo. El peso total de las muestras elementales que componen cada muestra global no será inferior a 4 kg.	
Piensos a granel	
Peso del lote objeto de muestreo en toneladas	Número mínimo de muestras globales por cada lote objeto de muestreo
hasta 1	1
más de 1 y hasta 10	2
más de 10 y hasta 40	3
más de 40	4
Piensos envasados	
Tamaño del lote objeto de muestreo en número de envases	Número mínimo de muestras globales por cada lote objeto de muestreo
1 a 16	1
17 a 200	2
201 a 800	3
más de 800	4
Muestras finales	
Cada muestra global da lugar, una vez reducida, a las muestras finales. Se requiere el análisis de por lo menos una muestra final por cada muestra global. El peso de la muestra final destinada al análisis no puede ser inferior a 500 g.	

Para el caso de la selección de la muestra:

- Las submuestras deben recogerse del centro y a lo largo de toda la longitud de cada envase, de manera mecánica o manual utilizando un calador sonda. En caso de no disponer de calador se puede realizar el muestreo tomando puñados del producto con cuchara, pala de muestreo o manualmente. Para este paso, se introduce el calador, cuchara o pala, se llena de pienso y se deposita la sub-muestra en la bolsa de muestreo. Se procede de esta forma

con las siguientes sub-muestras hasta conformar la muestra global. Se requiere que la muestra (formada por el conjunto de sub-muestras) sea de aproximadamente 500g. Se coloca en bolsa plástica con cierre hermético (o en frasco con tapa) y se rotula correctamente.

Para el caso de la selección de la porción de ensayo:

- La toma de muestra representativa se realiza por cuarteo, según el siguiente procedimiento: Se depositan los gránulos o polvo sobre una gran hoja de papel y se mezcla con una espátula. Se traza una cruz sobre el montón de material apilado y luego se eliminan dos de los segmentos opuestos y se vuelven a introducir en el paquete original. Se continúa este procedimiento hasta que quede una muestra de unos 250 gramos que se transfiere a un frasco de muestras y se tapa herméticamente.

Los pasos descritos desde la selección de la muestra de laboratorio hasta la etapa final del muestreo se detallan a continuación (Ver Figura N°7).

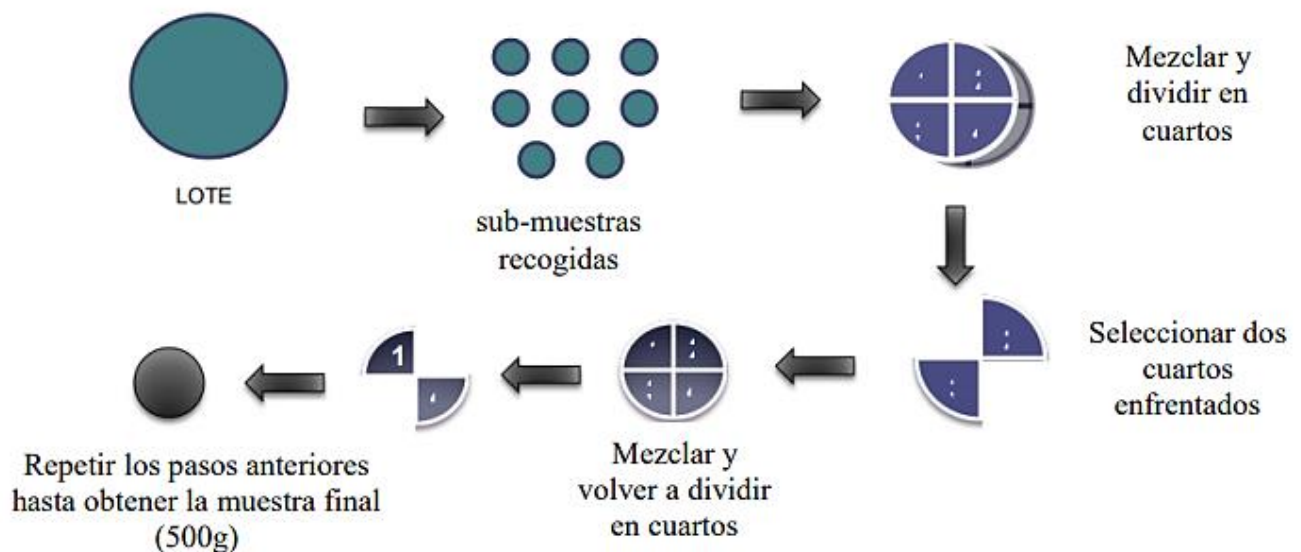


Figura N° 7. Pasos para muestreo de pienso de concentrado para aves³.

Las muestras deben conservarse a temperatura ambiente en un lugar seco y bien ventilado. Deberán protegerse de la luz y los olores para prevenir la contaminación, la proliferación microbiológica u otras situaciones que puedan dañarlas.

4.5 Reactivos

Se deben utilizar reactivos de grado analítico o superior que cumplan las normas internacionales de calidad (ACS (Reactivos Analíticos de la Sociedad Química Estadounidense), ISO).

Nota: Para verificar preparación de cada uno de los reactivos, ir a sección anexos (Anexo 2: Preparación de reactivos).

- Ácido sulfúrico concentrado, PA (para análisis).
- Sulfato de potasio o sulfato de sodio, PA (para análisis).
- Sulfato de cobre, PA (para análisis).
- Solución de hidróxido de sodio al 40 %.
- Solución indicadora de rojo de metilo al 1% y azul de bromocresol verde 1% en etanol.
- Etanol 95% V/V
- Ácido bórico al 4%.
- Solución de ácido clorhídrico 0.1 N.
- Carbonato de Sodio Anhidro.
- Sacarosa
- Muestra de concentrado para aves.

4.6 Materiales y equipo.

- Balanza analítica con capacidad máxima de 200 g y valor de división 0.1 mg.
- Aparato de digestión (Equipo Kjeldahl).
- Aparato de destilación con trampa Kjeldahl.
- Buretas.
- Pipetas
- Balanza gravimétrica con capacidad máxima de 200 g y valor de división de 0.1 g.
- Frasco lavador.

- Perlas de vidrio.
- Erlenmeyer de 100 mL
- Erlenmeyer de 250 mL
- Balón Kjeldahl de 100 o 500 mL
- Equipo de destilación provisto de una trampa Kjeldahl
- Matraz aforado de 200 o 250 mL
- pH metro.

4.7 Procedimiento de práctica de determinación⁴.

4.7.1 Estandarización del ácido clorhídrico 0.1 N.

4.7.1.1 Pesar aproximadamente 0.133 g de Carbonato de sodio en un matraz Erlenmeyer previamente secado a 105 °C durante 2 horas.

4.7.1.2 Disolver en 50 mL de agua.

4.7.1.3 Añadir 3 gotas de solución de rojo de metilo al 0.1 % (p/v).

4.7.1.4 Titular hasta tornarse de rosa.

4.7.1.5 Calentar hasta ebullición para eliminar el dióxido de carbono, (si el color rosa persiste, enfriar y continuar con la titulación).

4.7.2 Procedimiento general

4.7.2.1 - Realizar la muestra en duplicado.

4.7.2.2 Efectuar un ensayo en blanco usando una sustancia orgánica sin nitrógeno (sacarosa) que sea capaz de provocar la reducción de los derivados nítricos y nitrosos eventualmente presentes en los reactivos.

4.7.2.3 Pesar con exactitud en balanza analítica 0.1 g de muestra homogeneizada en un papel de filtro libre de cenizas.

4.7.2.4 Una vez pesada la muestra, transferir con el papel a un balón Kjeldahl, añadir 3 perlas de ebullición, 10 g de sulfato de potasio, 0.5 g de sulfato de cobre y 20 mL de ácido sulfúrico concentrado, se agita y el balón se tapa con un embudo pequeño.

4.7.2.5 Colocar el tubo Kjeldahl en el calentador del equipo Kjeldahl y se conecta la salida del frasco al sistema de extracción de humos. Se abre la llave de agua, se enciende el sistema vacío y la corriente. Realizar la digestión dentro de una campana extractora.

4.7.2.5.1 Si no se posee equipo Kjeldahl, el balón se calienta apoyado en soporte, aro y malla con la ayuda de un mechero Bunsen, acá se somete a la muestra a un calentamiento suave inicialmente, evitando la excesiva formación de espuma.

4.7.2.6 Una vez que la solución esté transparente, dejar en ebullición 15 a 20 minutos más.

4.7.2.7 Terminada la digestión se deja enfriar y se transfiere cuantitativamente a un matraz aforado de 100 mL.

4.7.2.8 Preparar el Erlenmeyer colector de 250 mL añadiendo 30 ml de solución de ácido Bórico al 4% y 5 gotas de la reacción indicadora (rojo de metilo y azul de bromocresol verde).

4.7.2.9 Colocar el Erlenmeyer en la parte final del condensador del equipo de destilación Kjeldahl para poder coleccionar el destilado.

4.7.2.10 El contenido obtenido en el matraz del paso 4.7.3.7 se añade a la trampa Kjeldahl.

4.7.2.11 Añadir también a la trampa 30 mL de hidróxido de sodio 40% (p/v).

4.7.2.12 Se abre la llave de alimentación de agua que va al equipo destilador, se enciende el equipo con el control ubicado en la parte inferior frontal y se destila hasta coleccionar aproximadamente 100 mL de destilado.

4.7.2.13 Se retira el destilado coleccionado fuera del contacto con la punta del condensador.

4.7.2.14 El matraz Erlenmeyer colector tiene una coloración verdosa (lo cual indica la presencia de amoníaco), se titula el amoníaco del destilado con HCl 0,1 N previamente estandarizado hasta que se torne de color violeta o tono rojizo (justo antes de que la solución se convierta en rosado).

A continuación se detalla el procedimiento general esquematizado (Ver Figura N°8).

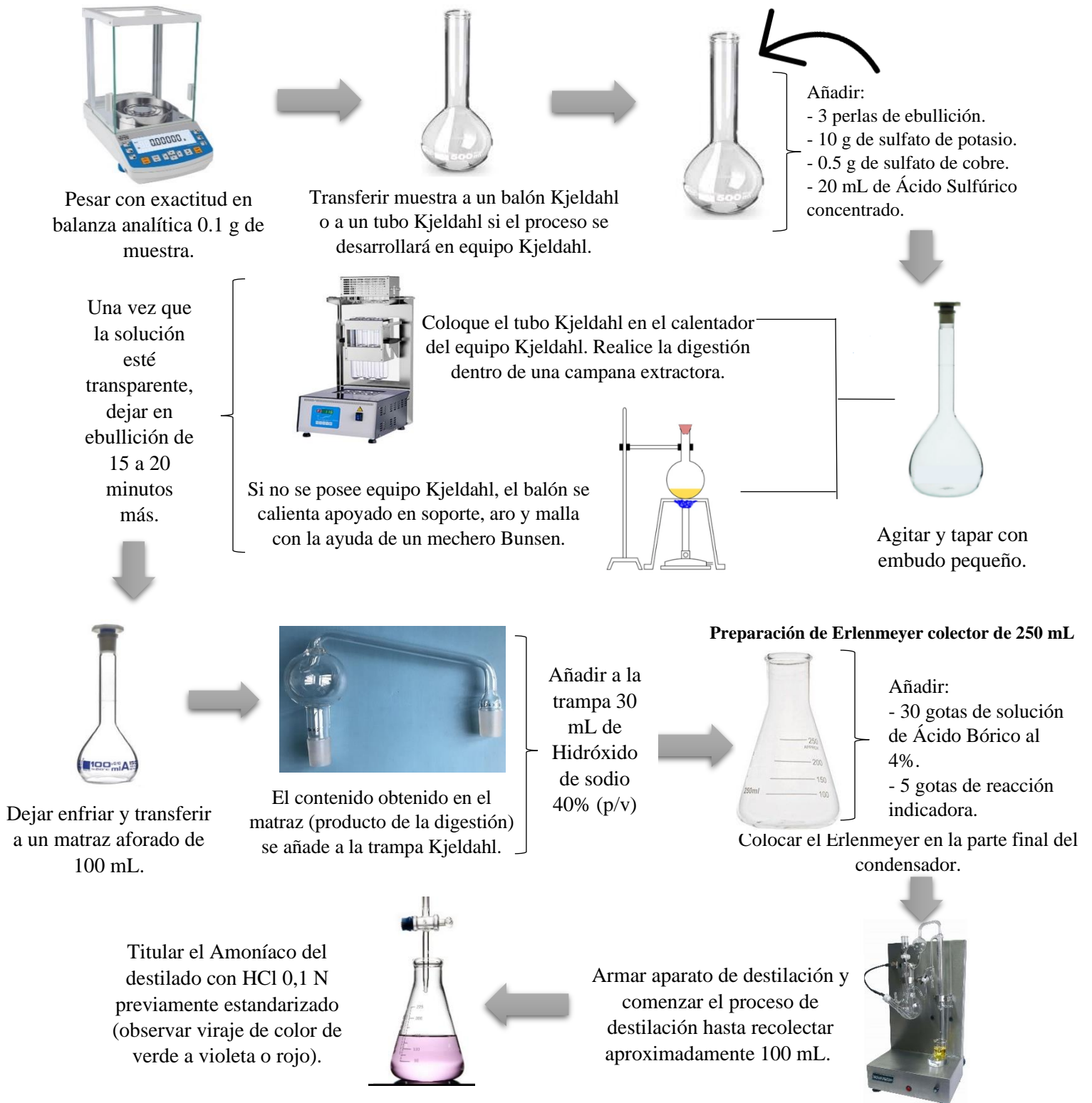


Figura N° 8. Procedimiento método de Kjeldahl.

Fuente: Elaboración propia.

4.8. Cálculos

Se calcula el nitrógeno total determinado por titulación de la siguiente manera:

$$\% N = \frac{(Va - Vb) \times N \times 14 \times 100}{m \times 1000}$$

Donde:

% N = contenido de nitrógeno total en la muestra en %.

Va = volumen de ácido clorhídrico estandarizado 0.1 N gastado en la titulación de la muestra.

Vb = volumen de ácido clorhídrico estandarizado 0.1 N gastado en la titulación en blanco.

N = Normalidad del Ácido clorhídrico estandarizado 0.1 N.

M = Peso de la muestra en gramos.

El cálculo para la posterior determinación de porcentaje de proteína es el siguiente:

$$\% \text{ Proteína Bruta} = \% N * F$$

Donde:

% N= contenido de nitrógeno total en la muestra en %.

F = Factor de conversión de Nitrógeno a Proteína.

Los principales factores de conversión se detallan en la Tabla N°3 del documento general.

Los resultados se expresan en % de proteínas y se dan aproximadamente hasta la centésima. La diferencia de los resultados de dos determinaciones realizadas simultáneamente o en rápida sucesión por el mismo analista no será mayor de 0.1 g de nitrógeno (0.625 g de proteínas) por 100 g de muestra.

4.9 Interpretación de resultados.

El porcentaje obtenido de proteína debe compararse con el porcentaje rotulado en el empaque del concentrado para aves. Este debe coincidir con lo declarado en la etiqueta nutricional del empaque.

Además, se deben comparar los resultados obtenido del análisis, estos deben estar dentro de los parámetros establecidos en las especificaciones estipuladas por la Dirección General de Ganadería,

contempladas en el "Reglamento para la producción y uso de concentrados alimenticios destinados a nutrición y alimentación animal estipulado", en este caso en particular, en la subdivisión titulada "Guía para el manejo de aves ponedoras"⁵.

En esta guía, el Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) detalla los lineamientos para el correcto manejo de las aves, de las instalaciones y de su alimentación en general.

En el apartado N°6 de la Guía, se estipulan los requerimientos para una correcta alimentación. (Ver Anexo 3). Donde se establece que:

- Las gallinas ponedoras deben recibir alimento para producción (postura) con al menos 17% de proteína.

Teniendo como referencia un diferente Reglamento, según el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación de España, a efectos prácticos se recomienda un consumo diario de proteína equilibrada en torno a 18% a las 20 semanas de vida. El mismo recomienda brindar la cantidad correcta del pienso, ya que se debe tener en cuenta que el exceso del consumo de proteína origina aves con excesiva masa muscular y un engrasamiento limitado lo que perjudica la reproducción. Además, el exceso de proteína se excreta vía orina, originando un exceso de amonio en el ave⁶.

A continuación, se brinda una tabla con un estimado de proteína en el concentrado y la dosis diaria de alimentación.

Tabla N° 5. Porcentaje de proteína diaria recomendada para concentrado para aves ⁷.

Edad en semanas	21	22	23	24	25
Consumo de pienso en g/día	105	110	115	120	125
% Proteína en el pienso	18.2 -18.7	17.7 - 18.2	17.2 - 17.6	16.7 - 17.2	16.2 - 16.7

4.10 Bibliografía

1. Adrian, J., Potus, J., Poiffait, A., & Dauvillier, P. (2000). Análisis nutricional de los alimentos. *Acribia*. (pp. 41-43).
2. European Union. (2009, December 17). Regulation - 152/2009 - EN - EUR-Lex [Internet]. Europa.eu. Retrieved March 19, 2024, from <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2009/152/oj>
3. Protocolo de muestreo para cereales y alimentos. Disponible en: <https://www.alecol.com.ar/>.
4. Association of Official Agricultural Chemists (AOAC). (2000). *Official Methods of Analysis* (17th ed.). AOAC International.
5. Ministerio de Agricultura y Ganadería de El Salvador (MAG) (2019). Programa de reproducción animal “Guía para el manejo de gallinas ponedoras”. Dirección General de Ganadería, Cantón El Matazano, Municipio de Soyapango, San Salvador. Retrieved from https://Guia_para_el_manejo_de_gallinas_ponedoras
6. Cabrera, O. (2021, July 6). Reproductoras Pesadas: Necesidades en Proteína y Aminoácidos. *aviNews*, la revista global de avicultura; *agriNews*. Retrieved from <https://avinews.com/reproductoras-pesadas-necesidades-en-proteina-y-aminoacidos/>
7. Granja Pinseque. (n.d.). MANUAL MANEJO Y ALIMENTACIÓN DE GALLINAS PONEDORAS. Retrieved from <https://www.granjapinseque.es/blog/Posts/show/porcentaje-de-proteina-para-ponedoras-388>

CAPÍTULO V

5.0 CONCLUSIONES

1. La bibliografía recopilada permitió profundizar en la comprensión del método Kjeldahl para la determinación de proteínas en alimentos, identificando así, los principios fundamentales del método y sus etapas clave para su correcta aplicación.
2. Se elaboró un manual de laboratorio detallado que describe paso a paso el procedimiento para la determinación de proteína cruda en una muestra de concentrado para aves utilizando el método Kjeldahl.
3. Al desarrollar el protocolo de la práctica de laboratorio se permitió evidenciar la importancia de conocer la cantidad de proteína cruda en los piensos.
4. Se elaboró un plan experimental detallado que contempla todas las etapas del método Kjeldahl, incluyendo la preparación de reactivos, el pretratamiento de la muestra, la digestión ácida, la destilación y la valoración volumétrica.
5. En el contenido de la práctica, se identificaron los métodos adecuados para la selección de la muestra, considerando las características específicas de la matriz alimentaria y los parámetros de análisis, esto con el fin de asegurar que los resultados obtenidos sean representativos y precisos.
6. Se identificaron las normas y regulaciones relevantes para conocer la cantidad de proteína presente en concentrados para aves con el fin de conocer la cantidad necesaria para la bioutilización.

CAPÍTULO VI

6.0 RECOMENDACIONES

1. Al analista, seguir rigurosamente los procedimientos estandarizados durante todas las etapas del análisis, ya que cualquier desviación puede introducir errores significativos en los resultados finales.
2. Al analista, prestar atención a la selección de muestras representativas para el análisis. Es importante asegurarse de que las muestras sean tomadas de manera aleatoria y que representen fielmente la composición del lote de concentrado en cuestión.
3. Al analista, implementar un programa de control de calidad periódico para monitorear la precisión y exactitud del método de Kjeldahl, este control incluye la calibración regular de los equipos de laboratorio, la verificación de la pureza de los reactivos y la validación de los procedimientos analíticos.
4. Al analista, considerar las discrepancias observadas entre los valores declarados por los fabricantes y los valores reales determinados mediante el método de Kjeldahl, ya que estos subrayan la necesidad de una verificación independiente y precisa de la composición nutricional de los concentrados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2007). Fundamentos de química analítica (8ª ed.). Editorial McGraw-Hill.
2. Day, R. A., & Underwood, A. L. (2008). Análisis químico cuantitativo (6ª ed.). Editorial Prentice Hall.
3. La cuantificación de LV se EE en QAP. Introducción al análisis volumétrico. Www.um.es. Disponible en: <https://www.um.es/documents/4874468/11830096/tema-4.pdf/0ef11661-8d05-43e3-8edb-10b8bc21351b>
4. Asociación Española de Química Analítica. (2016). La Adecuación al Uso de los Métodos Analíticos - Una Guía de laboratorio para validación de métodos y temas relacionados.
5. Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana. (2004). Análisis químico de los alimentos.
6. Farrell, D. (2016). Crops and Food Sciences (Vol. 4072). St. Lucia; Queensland, Australia: University of Queensland Press.
7. Ensminger, M. E., Oldfield, J. E., & Heinemann, W. W. (1990). Feeds & Nutrition. Clovis, California, EE.UU. Ensminger Publishing Company.
8. National Academy of Sciences. (1994). Nutrient Requirements of Poultry (9th Revised Edition). Washington D.C., DC, Estados Unidos de América: National Academies Press.
9. Universidad Tecnológica de Pereira. Facultad de Tecnología. Escuela de Química. Programa de Tecnología. (2010). Manual de Laboratorio de Laboratorio de Análisis de Alimentos. Trabajo de Grado.
10. Universidad Tecnológica de Pereira. Facultad de Tecnología. Escuela de Química. Programa de Tecnología. (2010). Manual de Laboratorio de Laboratorio de Análisis de Alimentos. Trabajo de Grado.

11. Scientificpsychic.com. (s.f.). Proteínas, Aminoácidos, Péptidos, y Polipéptidos - Estructura Química (Página 1 de 2). [se quitó una URL no válida]
12. Hunton, P. (1995). Poultry production (World Animal Science No. C9). Amsterdam, Países Bajos: Elsevier.
13. Gupta, A., & Kumar, N. (2019). Nutritional Evaluation of Feed Ingredients and Complete Feeds for Poultry. En Nutritional Evaluation of Feed Ingredients and Complete Feeds for Poultry (pp. 1–26). Springer, Singapore.
14. Zumbado, H. (2004). Análisis Químico de los Alimentos Métodos Clásicos. La Habana: Universitaria
15. Sá, L. R. D., Silva, M. A. D., Lopes, C. D. S., Maciel, M. P. O., Menezes, G. O., & Oliveira, I. M. (2018). Crude protein levels in diets for laying hens: performance, egg quality, and nitrogen metabolism. Revista Brasileira de Zootecnia, 47(1), 1–9.
16. Bremner, J. M. (1996). Nitrogen-total. Methods of Soil Analysis Part 3-Chemical Methods, 1085–121.
17. Silva, M. G., Pereira, J. C., & Oliveira, L. M. (2015). Métodos físico-químicos para análisis de alimentos. São Paulo, Brasil: Instituto Adolfo Lutz.
18. Valderrama, R. (2009). Validación de Métodos Analíticos Aplicación a Métodos volumétricos - Determinación de Sílice. Lima, Perú.
19. Association of Official Analytical Chemists. (1990). Protein (Crude) in Animal Feed Copper Catalyst Kjeldahl Method (984.13). En Official Methods of Analysis (15th ed.).
20. ProainShop. (2020). APLICACIÓN DEL MÉTODO KJELDAHL. <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/16338/Determinaci%C3%B3n%20de%20proteinas.pdf?sequence>.

21. Giménez M. Digestor - Bloque digestor para laboratorio-Ilión Analítica [internet]. Disponible en: <https://ilion.com.uy/bloque-digestor/>.
22. Tubo de vidrio borosilicato de un solo uso-Labolan [internet]. Disponible en: <https://www.labolan.es/es/producto/tubo-vidrio-borosilicato-de-un-solo-uso-sin-tapon-3ml-10x75mm-espesor-06mm-c-250uds.html>.
23. Destilador de Nitrógeno [Internet]. Disponible en: <https://www.inboxsa.com/producto/destilador-de-nitrogeno>.
24. Nielsen, S. (1998). Food Analysis, Second Edition. Gaithersburg, Maryland. USA Pág: An Aspen Publication.
25. Baeza, J. J. (2015). Química Analítica I. Introducción a la Química Analítica.
26. Reglamento (CE) No 152/2009 de la Comisión de 27 de enero de 2009 que fija los métodos de muestreo y análisis para el control oficial de los piensos. Disponible en: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/ALL/?uri=CELEX:32009R0152>.
27. Ministerio de Agricultura y Ganadería de El Salvador (MAG), D. G. de G. (Cantón El Matazano, Municipio de Soyapango, San Salvador 2019). Programa de reproducción animal “Guía para el manejo de gallinas ponedoras”. Disponible en: <https://es.slideshare.net/slideshow/guia-el-manejo-de-gallinas-ponedoraspdf/253841936>

ANEXOS

ANEXO N° 1
MÉTODOS DE MUESTREO

Reglamento (CE) N° 152/2009 de la Comisión, de 27 de enero de 2009: Métodos de muestreo y análisis para el control oficial de los piensos detallado en Anexos I y II del documento²⁶.

MÉTODOS DE MUESTREO (ANEXO I DEL REGLAMENTO)

1. Objeto y ámbito de aplicación

Las muestras destinadas al control oficial de los piensos se tomarán siguiendo los métodos que se describen a continuación. Las muestras así obtenidas se considerarán representativas de las porciones objeto de muestreo.

2. Personal encargado del muestreo

La toma de muestras correrá a cargo de personas autorizadas al efecto por los Estados miembros.

3. Definiciones

Lote objeto de muestreo: una cantidad de producto que constituye una unidad y tiene características presuntamente uniformes.

- Muestra elemental: cantidad tomada en un punto del lote objeto de muestreo.
- Muestra global: suma de las muestras elementales tomadas del mismo lote objeto de muestreo.
- Muestra reducida: parte representativa de la muestra global, obtenida por reducción de esta.
- Muestra final: parte de la muestra reducida o de la muestra global homogeneizada.

4. Instrumental

4.1. El instrumental de muestreo debe estar hecho de materiales que no puedan contaminar los productos de los que se hayan de tomar muestras. Este instrumental puede ser aprobado oficialmente por los Estados miembros.

4.2. Instrumental recomendado para el muestreo de piensos sólidos.

4.2.1. Muestreo manual

4.2.1.1. Pala de fondo plano y bordes verticales.

4.2.1.2. Sonda con hendidura larga o compartimentos. Las dimensiones de la sonda deben ajustarse a las características del lote objeto de muestreo (profundidad del recipiente, dimensiones del saco, etc.) y al tamaño de las partículas del pienso.

4.2.2. Muestreo mecánico.

Podrán utilizarse aparatos mecánicos homologados para el muestreo de piensos en movimiento.

4.2.3. Divisor.

Para tomar muestras elementales y preparar muestras reducidas y muestras finales podrán utilizarse aparatos diseñados para dividir la muestra en partes aproximadamente iguales.

5. Instrucciones para la toma, la preparación y el envasado de las muestras.

5.1. Generalidades.

Las muestras deben tomarse y prepararse lo más rápidamente posible, tomando las precauciones necesarias para evitar que el producto se altere o contamine. Los instrumentos, así como las superficies y los recipientes destinados a recibir las muestras, deben estar limpios y secos.

5.2. Muestras elementales.

5.2. A. En relación con el control de sustancias o productos repartidos de manera uniforme en el pienso. Las muestras elementales deben tomarse al azar en todo el lote objeto de muestreo y tener aproximadamente el mismo tamaño.

5.2. A.1. Piensos a granel.

El lote objeto de muestreo deberá dividirse simbólicamente en varias partes aproximadamente iguales. Deberá seleccionarse al azar un número de partes que se corresponda con el número de muestras elementales, y de cada una de esas partes deberá tomarse al menos una muestra. En su caso, el muestreo puede realizarse mientras el lote objeto de muestreo está en movimiento (carga o descarga).

5.2. A.2. Piensos envasados.

Una vez seleccionado el número requerido de envases para muestreo, deberá tomarse parte del contenido de cada envase con una sonda o una pala. Si es necesario, las muestras se tomarán

después de haber vaciado por separado los envases. Los grumos se desharán, si es necesario, apartándolos y devolviéndolos a la muestra, en cada muestra global por separado.

5.2. A.3. Piensos líquidos o semilíquidos homogéneos u homogeneizables.

Una vez seleccionado el número requerido de recipientes para muestreo, deberá homogeneizarse el contenido, si es necesario, y tomarse una cantidad de cada recipiente. Las muestras elementales pueden tomarse mientras se vacía el contenido.

5.2. A.4. Piensos líquidos o semilíquidos no homogeneizables.

Una vez seleccionado el número requerido de recipientes para muestreo se tomarán muestras en diferentes niveles. También pueden tomarse muestras mientras se vacía el contenido, pero, en ese caso, deberán desecharse las primeras fracciones. En cualquier caso, el volumen total recogido no debe ser inferior a 10 l.

El lote objeto de muestreo deberá dividirse simbólicamente en un número de partes aproximadamente iguales correspondiente al número de muestras globales. Si este número es mayor de uno, el número total de muestras elementales se distribuirá de manera aproximadamente igual en las diferentes partes. A continuación, se tomarán muestras de aproximadamente el mismo tamaño, de manera que la cantidad total en las muestras de cada parte no sea inferior al mínimo de 4 kg requerido para cada muestra global. No se unirán muestras elementales tomadas de partes diferentes.

5.3. Preparación de muestras finales.

El material de cada muestra global deberá mezclarse cuidadosamente para obtener una mezcla homogénea. Si fuera necesario, la muestra global deberá reducirse hasta un mínimo de 2 kg o 2 l (muestra reducida), bien con ayuda de un divisor mecánico o automático, bien con el método de cuarteo.

Deberán prepararse a continuación, como mínimo, tres muestras finales que tengan aproximadamente la misma cantidad y se ajusten a las exigencias cuantitativas. Cada muestra deberá introducirse en un recipiente apropiado. Deberán tomarse todas las precauciones necesarias para evitar cualquier alteración en la composición de la muestra o cualquier contaminación o adulteración que pudiera sobrevenir durante el transporte o el almacenamiento.

5.4. Envasado de muestras finales

Los recipientes o los envases deberán precintarse y etiquetarse (la etiqueta debe estar totalmente incorporada en el precinto) de manera que sea imposible abrirlos sin deteriorar el precinto.

6. Destino de la muestras.

De cada muestra global deberá enviarse cuanto antes al laboratorio de análisis autorizado, como mínimo, una muestra final, con la información necesaria para el analista.

DISPOSICIONES GENERALES SOBRE MÉTODOS DE ANÁLISIS PARA PIENSOS (ANEXO II DEL REGLAMENTO).

A. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS

1. Objeto.

Los procedimientos descritos a continuación se refieren a la preparación para el análisis de muestras finales enviadas a los laboratorios de control tras ser tomadas conforme a lo dispuesto en el anexo I. Estas muestras deben prepararse de manera que las cantidades pesadas según disponen los métodos de análisis sean homogéneas y representativas de las muestras finales.

2. Precauciones que deben tomarse.

El procedimiento que debe seguirse para preparar las muestras depende de los métodos de análisis empleados. Por tanto, es muy importante que dicho procedimiento se adecúe al método de análisis aplicado. Todas las operaciones necesarias deben realizarse de modo que se eviten en lo posible la contaminación de la muestra y los cambios en su composición.

La molienda, la mezcla y el tamizado deberán efectuarse lo más rápidamente posible, a fin de minimizar la exposición de la muestra al aire y a la luz. No se emplearán molinos ni moledoras que puedan calentar perceptiblemente la muestra.

Para los piensos especialmente sensibles al calor se recomienda la molienda manual. Deberá cuidarse también de que el propio instrumental no sea fuente de contaminación de los oligoelementos.

Si la muestra no puede prepararse sin que su contenido de humedad sufra cambios significativos, debe determinarse dicho contenido antes y después de prepararla.

3. Procedimiento.

Dividir la muestra en las submuestras adecuadas para ser analizadas y servir de referencia, empleando técnicas divisorias apropiadas como la formación de montones alternativos con pala o la subdivisión con divisores mecánicos estacionarios o rotatorios. No se recomienda la técnica de conos y cuarteo, pues las submuestras resultantes pueden presentar un elevado error de división. Guardar la muestra de referencia en un recipiente adecuado, limpio y seco, con tapa hermética, y preparar las submuestras para el análisis de al menos 100 g, según se indica más adelante.

3.1. Piensos que pueden molerse tal como se presentan.

Salvo que se especifique lo contrario en los métodos de análisis, tamizar la muestra completa por un tamiz con una luz de malla de 1 mm (conforme a la Recomendación ISO R565) tras molerla, si es necesario. No moler en exceso. Mezclar la muestra tamizada y recogerla en un recipiente limpio y seco adecuado, provisto de tapón hermético. Volver a mezclar inmediatamente antes de pesar la cantidad para análisis.

3.2. Piensos que pueden molerse tras secarse.

Salvo que se especifique lo contrario en los métodos de análisis, secar la muestra hasta que su contenido de humedad disminuya a un nivel del 8 % al 12 %. Proceder a continuación como se indica en el punto 3.1.

3.3. Piensos líquidos o semilíquidos.

Colocar la muestra en un recipiente limpio y seco adecuado, provisto de tapón hermético. Mezclar bien inmediatamente antes de pesar la cantidad para análisis.

3.4. Otros piensos.

Las muestras que no puedan prepararse conforme a uno de los procedimientos anteriores deberán someterse a cualquier otro procedimiento que garantice que las cantidades pesadas para el análisis son homogéneas y representativas de las muestras finales.

4. Almacenamiento de las muestras. Las muestras deben almacenarse a una temperatura que no altere su composición. Las destinadas al análisis de vitaminas o sustancias especialmente fotosensibles deberán guardarse en recipientes de vidrio marrón.

ANEXO N° 2
PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Tabla N° 6. Preparación de reactivos.

Reactivo de Hidróxido de sodio al 15%	Disolver 150 g de NaOH y completar a 1 litro.
Reactivo de Hidróxido de Sodio al 30%	Disolver 300 g de NaOH y completar a 1 litro.
Rojo de metilo 1%	Disolver 1 g de rojo de metilo en 100 mL de etanol (95%).
Ácido bórico al 3%	Disolver 30 g de ácido bórico y completar a 1 litro.
Reactivo de Ácido clorhídrico 0.1 N	Tomar 8.5 mL de HCl concentrado y enrasar a 1 litro. Valorar con Na ₂ CO ₃ anhidro.

Fuente: Elaboración propia

ANEXO N° 3

ALIMENTACIÓN GALLINAS PONEDORAS SEGÚN MAG

6. Alimentación

Las gallinas ponedoras deben recibir alimento para producción (postura) con 17% de proteína. Cambiar a este tipo de alimento cuando las aves alcance el 5% de producción.

A las 29 semanas de edad las aves deben estar consumiendo 26 libras por cada 100 aves por día.

Efectuar aumentos semanales:

EDAD (SEMANAS)	CONSUMO APROXIMADO DE ALIMENTO (LIBRAS/100 AVES/DÍA)
19	19
20	20
21	21
22	22
23	23
24	24
25	25
26	26

Figura N° 9. Alimentación diaria adecuada de las gallinas de postura, de acuerdo a la Guía para el Manejo de Gallinas Ponedoras, en base al Programa de reproducción animal del Ministerio de Agricultura y Ganadería, Dirección General de Ganadería²⁷.