

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA



ELABORACIÓN DE UNA MARCHA ANALÍTICA PARA LA DETERMINACIÓN DE  
PROTEÍNAS EN FÓRMULAS INFANTILES POR EL MÉTODO DE KJELDAHL

TRABAJO DE GRADO EN MODALIDAD DIPLOMADO DE ESPECIALIZACIÓN

PRESENTADO POR

JOSÉ ERNESTO SILVA CARRANZA  
MARCELA JENIFER TORRES VÁSQUEZ

PARA OPTAR AL GRADO DE

LICENCIADO(A) EN QUÍMICA Y FARMACIA

FEBRERO 2025

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

ASESORA

MAESTRA DELMY IDALIA HERNÁNDEZ HUEZO

ASESOR

LICENCIADO ALEXIS ANTONIO GUADRÓN MELÉNDEZ

TUTOR

MAESTRO LUIS GUILLERMO ESCALANTE ESCOBAR

## **DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS**

AGRADEZCO A DIOS TODO PODEROSO: Por haberme iluminado, guiado, cuidado, protegido y darme una buena salud tanto física como mental que, a pesar de no tener todas las condiciones materiales, mantuvo enaltecido en mí el espíritu de superación, de igual forma por darme la fortaleza y sabiduría para vencer cada obstáculo que se me presentó durante estos siete años de estudio.

A MI FAMILIA: en especial a mi abuela Alicia del Carmen Recinos López, a mi madre Luz Marisol Carranza y a mi padre Jorge Ernesto Silva, por todo su apoyo y sacrificio, así como el respaldo hacia mi formación, por haberme guiado durante todos sus días con amor y respeto, su corazón y su mente está lleno de sabiduría ilimitada, a ellos dedico este trabajo, a su fuerte incidencia en mi vida, así como su respaldo incondicional.

A LA UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR: Por haberme dado la oportunidad de poder realizar el curso de especialización, permitiendo organizarme con la modalidad virtual y así poder salir adelante con mi trabajo y culminar mis estudios.

A LOS DISTINTOS CATEDRÁTICOS: Que participaron en mi formación académica, cada uno con su estilo, su enfoque de mundo, posicionamiento ideológico y sobre todo su aporte científico y académico sobre las ciencias.

A TODOS(AS) MIS AMISTADES: que conforman mi red de apoyo un profundo agradecimiento ya que en todo momento estuvieron animándome a luchar y culminar esta etapa profesional.

José Ernesto Silva Carranza

## **DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS**

Doy gracias a Dios por haberme permitido finalmente terminar esta etapa de mis estudios, que a pesar de todas las dificultades en el proceso logré superar.

Gracias al esfuerzo, sacrificio y apoyo incondicional que he recibido de mis padres y mi hermano en todo momento para salir adelante.

A mi hija que me motiva día a día a superarme para poder darle lo mejor.

A mi familia que de forma directa o indirecta me han ayudado a lo largo de todo este proceso.

A mis amigos que confiaron en mí, que me ayudaron y motivaron a terminar mis estudios.

Marcela Jenifer Torres Vásquez

## ÍNDICE GENERAL

Pág N°

### ABREVIATURAS

### GLOSARIO

### RESUMEN

### CAPÍTULO I

<b>1.0 INTRODUCCIÓN</b>	13
-------------------------	----

### CAPÍTULO II

<b>2.0 OBJETIVOS</b>	16
----------------------	----

### CAPÍTULO III

<b>3.0 MARCO TEÓRICO</b>	18
--------------------------	----

3.1 Fórmulas infantiles	18
-------------------------	----

3.2 Proteínas	18
---------------	----

3.3 Determinación de nitrógeno por el método Kjeldahl	18
---	----

3.3.1 Digestión	19
-----------------	----

3.3.2 Destilación	20
-------------------	----

3.3.3 Valoración	20
------------------	----

3.4 Reactivos utilizados en el análisis de Kjeldahl	21
---	----

3.4.1 Catalizadores de Kjeldahl	21
---------------------------------	----

3.4.1.1 Catalizadores que se pueden utilizar	21
--	----

3.4.2 Ácido y oxidante para la digestión	22
--	----

3.4.2.1 Ácidos y oxidantes que se pueden utilizar	22
---	----

3.4.3 Alcalis para neutralización y liberación de amoníaco	22
--	----

3.4.3.1 Soluciones receptoras para el amoniaco	23
3.4.4 Valoración	23
3.4.4.1 Soluciones valoradas e indicadores	23
3.4.4.2 Soluciones valoradas e indicadores: valoración directa	24
3.4.4.3 Soluciones valoradas e indicadores: valoración por retroceso	24
3.5 Normativa de proteínas en alimentos	24
3.5.1 Codex alimentarius	24
3.5.2 Criterios de aceptación	25
<b>CAPÍTULO IV</b>	
<b>4.0 PRODUCTO FINAL</b>	27
4.1 Determinación del contenido de proteínas en fórmulas infantiles	27
4.1.1 Materiales y reactivos	27
4.1.2 Equipos	28
4.1.3 Método Kjeldahl	28
4.1.4 Esquema del procedimiento	28
4.1.5 Descripción del procedimiento	30
4.1.6 Cálculos	31
4.1.7 Fuentes de error a considerar	32
4.1.7.1 Principales fuentes de error	32
4.1.7.2 Pérdida de nitrógeno	32
4.1.7.3 Pérdida de amoniaco	33
<b>CAPÍTULO V</b>	
<b>5.0 CONCLUSIONES</b>	34

## **CAPÍTULO VI**

### **6.0 RECOMENDACIONES**

36

### **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

### **ANEXOS**

## ABREVIATURAS

**AOAC:** Asociación de Química Analítica Oficial Internacional (Association of Official Agricultural Chemist)

**DIN:** Instituto Alemán para la Normalización (Institut für Normung)

**FDA:** Administración de medicamentos y alimentos (Food and Drugs Administration)

**g:** Gramos

**ISO:** Organización Internacional de Normalización (International Organization for Standardization)

**M:** Molaridad

**mL:** Mililitros

**N:** Normalidad

**pH:** Medida del grado de acidez o alcalinidad de una sustancia o solución.

**RTCA:** Reglamento Técnico Centroamericano

**USEPA:** Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (United States Environmental Protection Agency)

**°C:** Grados centígrados

**%p/v:** Concentración peso sobre volumen de una solución (gramos de soluto en 100 mL de solución)



## GLOSARIO

**Blanco:** Es una muestra que no contiene la sustancia de interés que se está comprobando en un análisis<sup>1</sup>.

**Catalizador:** Es una sustancia simple o compuesta que aumenta o reduce la velocidad de una reacción química<sup>1</sup>.

**Forraje:** Son pastos secos conservados para alimentación de ganado<sup>2</sup>.

**Macronutrientes:** Son aquellas sustancias que proporcionan energía al organismo para promover el crecimiento y para regular procesos metabólicos<sup>3</sup>.

**Piensos:** Alimento que se da al ganado y otro tipo de animales, compuesto por cereales o semillas<sup>2</sup>.

**Solución estándar:** Es una solución que contiene una concentración conocida de una sustancia en específico que se emplea para conocer la concentración de otras soluciones<sup>1</sup>.

**Solución valorante:** Es una solución que contiene a la especie química que va a reaccionar con el analito en una concentración conocida<sup>1</sup>.

## RESUMEN

Las fórmulas infantiles están inspiradas en la leche materna y diseñadas para satisfacer las necesidades proteicas del bebé. Las proteínas son fundamentales para el desarrollo de los niños, ya que son necesarias para construir y reparar tejidos, fortalecer el sistema inmunológico y proporcionar energía para el crecimiento y desarrollo adecuado.

Los primeros meses del bebé son los más importantes en el desarrollo general por lo que se requiere determinar las proteínas en dichas fórmulas, el análisis químico de alimentos utiliza diversas técnicas para estudiar las características de los alimentos entre ellas la determinación del contenido de proteínas utilizando un método estandarizado.

En el presente trabajo se realizó una búsqueda bibliográfica para presentar una marcha analítica para la de determinación de proteínas en fórmulas infantiles por el método de Kjeldahl, en el cual se digieren las proteínas y otros compuestos orgánicos de los alimentos en una mezcla de ácido sulfúrico en presencia de catalizadores. El nitrógeno orgánico total se convierte en sulfato de amonio mediante la digestión, la mezcla resultante se neutraliza con una base y se destila. El destilado se recoge en una solución de ácido bórico y se titula con ácido clorhídrico para determinar el nitrógeno contenido en la muestra.

La marcha analítica propuesta describe paso a paso la preparación de los reactivos, la muestra, la determinación de nitrógeno y conversión a proteínas siguiendo los pasos de la AOAC (Official Methods of Analysis), y la interpretación de resultados, para que pueda ser implementada en los laboratorios de la Facultad de Química y Farmacia.

## **CAPÍTULO I**

## 1.0 INTRODUCCIÓN

La proteína es un macronutriente que se encuentra en todo el cuerpo, músculos, huesos, piel, cabello y tejidos. El primer año de vida es un momento crítico de crecimiento y desarrollo acelerado; este rápido crecimiento debe apoyarse de una alta tasa de síntesis de proteína. Las proteínas apoyan el crecimiento, desarrollo óptimo, maduración del sistema inmune y salud metabólica.

Las fórmulas infantiles buscan imitar la composición de la leche materna tratando de hacerla similar en cuanto a la cantidad de agua, proteína, carbohidratos, grasas, vitaminas, minerales, entre otras. Es de suma importancia el análisis de proteínas en las fórmulas infantiles ya que estas juegan un papel importante para el óptimo desarrollo de los músculos, los órganos, y el sistema inmunológico del bebé, mantienen saludables sus tejidos y células, además son una fuente de energía.

Es así que, con base en lo anterior, la presente investigación bibliográfica se enfocará en la elaboración de una marcha analítica para la determinación de proteína en fórmulas infantiles, por el método de Kjeldahl tomando como base diferentes fuentes bibliográficas como los métodos analíticos estandarizados validados, descritos en libros oficiales tales como los de la AOAC (Official Methods of Analysis), la Norma salvadoreña (NSO), el Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA) y el Codex Alimentarius.

La investigación constará principalmente de un marco teórico que fundamento el desarrollo de la marcha analítica, la cual detallará cada paso a seguir desde la preparación de las muestras, los reactivos, las soluciones estándar o valorantes, la cristalería a utilizar y el planteamiento de los cálculos a desarrollar para la determinación del contenido de proteínas, lo cual permitirá establecer si el resultado está dentro de las especificaciones bibliográficas oficiales.

El trabajo consta de dos partes: la parte I, o parte inicial en la cual se seleccionó el tipo de alimento donde se llevó a cabo la realización del perfil del producto; el cual describe en forma breve y resumida de qué tratará el producto final. En la parte II se diseñó una marcha analítica para la determinación de proteínas por el método de Kjeldahl en fórmulas infantiles, tomando

como base diferentes fuentes bibliográficas como los métodos analíticos estandarizados validados, El diseño de la marcha analítica detallo cada paso a seguir desde la preparación de las muestras, los reactivos, las soluciones estándar o valorantes, la cristalería a utilizar y el planteamiento de los cálculos a desarrollar para la determinación del contenido de peróxido, lo cual permite establecer si el resultado está dentro de las especificaciones bibliográficas oficiales.

Por otra parte, a nivel nacional existen pocos laboratorios que realicen el análisis de proteínas en alimentos, por lo que el presente trabajo, pretende generar material de apoyo de carácter bibliográfico para que pueda ser implementado en los laboratorios de la Facultad de Química y Farmacia y que permita al analista contar con una marcha de análisis detallada para la determinación de proteínas en fórmulas de leche infantil por el método de Kjeldahl y que esto conlleve a la obtención de resultados claros, veraces y reproducibles que asistan en la toma de decisiones para la verificación del desempeño de las industrias alimenticia.

## **CAPÍTULO II**

## **2.0 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo General:**

2.1.1 Diseñar una marcha analítica para la determinación de proteínas en fórmulas infantiles por el método de Kjeldahl aplicable en los laboratorios de la Facultad de Química y Farmacia.

### **2.2 Objetivos específicos:**

2.2.1 Comprender los fundamentos del método de Kjeldahl para la determinación del contenido de proteína en fórmulas infantiles.

2.2.2 Presentar un método de análisis para la determinación de proteínas en una fórmula de leche infantil con base en la Normativa NSO Codex Alimentarius A-5:95 salvadoreña y el Reglamento Técnico Centroamericano 67.04.54:18 y la AOAC 991.20.

2.2.3 Conocer las normas internacionales que dictan las tolerancias de errores en el contenido de proteínas en productos lácteos.

2.2.4 Generar material de apoyo de carácter bibliográfico que permita al estudiante, contar con una técnica de análisis detallada para la determinación de proteínas por el método de Kjeldahl.

## **CAPÍTULO III**

### 3.0 MARCO TEÓRICO

#### 3.1 Fórmulas infantiles<sup>4</sup>

La fórmula infantil es un alimento que puede ser la única fuente de nutrición para los bebés (es decir, niños de hasta 1 meses de edad) como alternativa a la leche materna. Los requisitos regulatorios de la FDA abordan, entre otras cuestiones, la inocuidad, la adecuación nutricional, el envasado y el etiquetado de estos productos y especifica cantidades máximas para 10 nutrientes dentro de estos las proteínas, las cuales deben ser 1,8-2,8 g./100 kcal.; 1,2-1,9 g./100 ml.

#### 3.2 Proteínas<sup>5</sup>

Las proteínas están formadas en mayor cantidad por Carbono, Hidrógeno, Oxígeno y Nitrógeno, coinciden en que son fundamentales en los sistemas biológicos; conforman el código genético en conjunto con los ácidos nucleicos. desempeñan un papel esencial en la alimentación humana por su aporte de aminoácidos a la dieta y por sus propiedades funcionales, las que aportan características específicas en los alimentos, siempre que se consuman de manera balanceada en la dieta, participan en la estabilidad del sistema inmune, desarrollo neuronal y cognitivo, además de la prevención de diversas patologías.

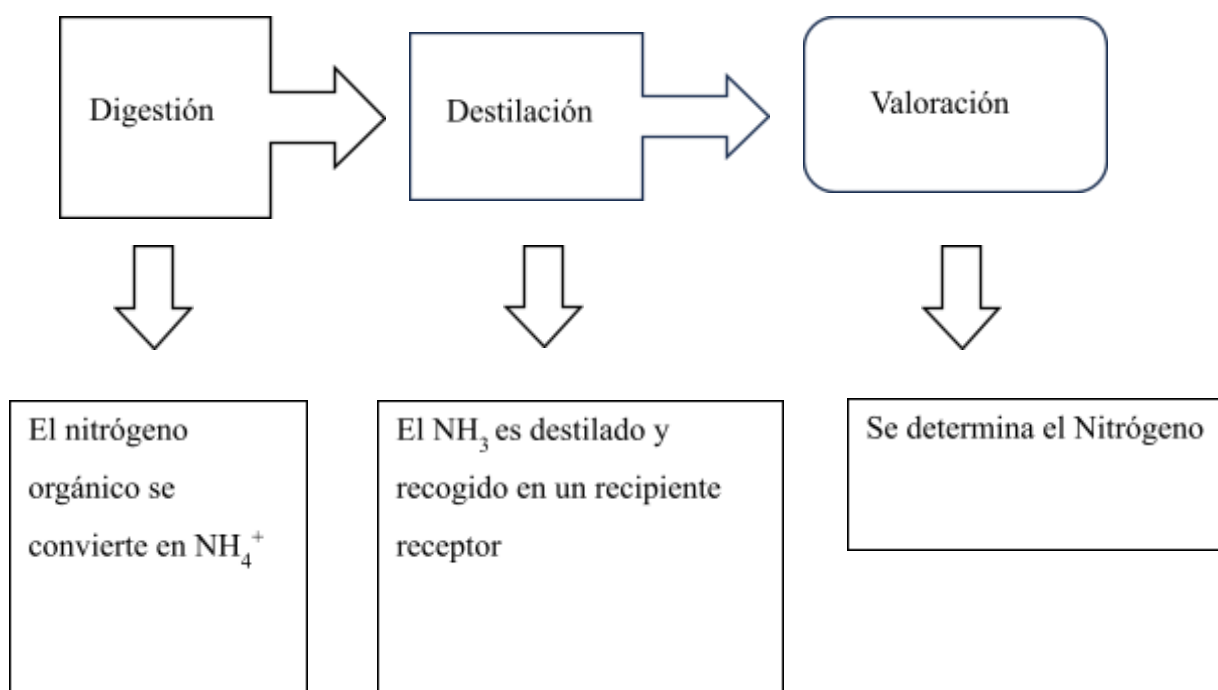
#### 3.3 Determinación de nitrógeno por el método Kjeldahl<sup>6</sup>

El método Kjeldahl se utiliza para la determinación del contenido de nitrógeno en muestras orgánicas e inorgánicas. Desde hace más de 100 años se está utilizando el método Kjeldahl para la determinación del nitrógeno en una amplia gama de muestras.

Este método ha ganado una gran aceptación y la determinación del nitrógeno Kjeldahl se realiza en alimentos y bebidas, carne, cereales y forrajes para el cálculo del contenido en proteína. También se utiliza el método Kjeldahl para la determinación de nitrógeno en aguas residuales, suelos y otras muestras.

Esto es así porque los diferentes tipos de proteínas coinciden todas ellas en una proporción similar de dicho nitrógeno orgánico. Es un método oficial y descrito en múltiples normativas: AOAC, USEPA, ISO, DIN, Farmacopeas y distintas Directivas Comunitarias, tiene la ventaja de poderse ejecutar mediante equipos no muy sofisticados y puede ser realizado por técnicos poco experimentados.

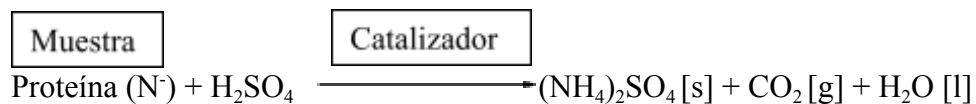
El método Kjeldahl consta de tres etapas:



**Figura N° 1.** Etapa del Método de Kjeldahl<sup>6</sup>

### 3.1.1 Digestión.

El objetivo del procedimiento de digestión es romper todos los enlaces de nitrógeno de la muestra y convertir todo el nitrógeno unido orgánicamente en iones amonio ( $\text{NH}_4^+$ ). El carbono orgánico y el hidrógeno forman dióxido de carbono y agua. En este proceso la materia orgánica se carboniza dando lugar a la formación de una espuma negra. Durante la digestión, la espuma se descompone y finalmente se convierte en un líquido claro que indica que la reacción química ha terminado. Para ello, la muestra se mezcla con ácido sulfúrico a temperaturas entre 350 y 380 °C. Cuánto más alta sea la temperatura, más rápido será el proceso de digestión. La digestión también se puede acelerar con la adición de sales y catalizadores. Se añade sulfato de potasio para aumentar el punto de ebullición del ácido sulfúrico y se añaden catalizadores para aumentar la velocidad y la eficiencia del procedimiento de digestión. También se pueden añadir agentes oxidantes para mejorar aún más la velocidad.



Una vez la digestión ha finalizado, se deja enfriar la muestra a temperatura ambiente, se diluye con agua y se trasvasa a la unidad de destilación.

### 3.3.2 Destilación.

Durante el proceso de destilación los iones amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) se convierten en amoniaco ( $\text{NH}_3$ ) mediante la adición de un álcali ( $\text{NaOH}$ ). El amoniaco ( $\text{NH}_3$ ) es arrastrado al vaso receptor por medio de una corriente de vapor de agua.



El vaso receptor para el destilado se llena con una solución absorbente para capturar el gas amoniaco disuelto. La solución absorbente más común es el ácido bórico [ $\text{B}(\text{OH})_3$ ] en solución acuosa al 2-4%. El amoniaco es capturado cuantitativamente por la solución de ácido bórico formando iones amonio solvatados.



También pueden utilizarse otros ácidos, dosificados con precisión, como el ácido sulfúrico o clorhídrico para capturar el amoniaco en forma de iones amonio solvatados.



### 3.3.3 Valoración.

La concentración de los iones amonio capturados puede determinarse por medio de dos tipos de valoración:

Cuando se utiliza el ácido bórico como solución absorbente, posteriormente se lleva a cabo una valoración ácido-base utilizando una solución estandarizada de ácido sulfúrico o clorhídrico y una mezcla de indicadores. El rango de concentración de la solución utilizada varía entre 0,01 N a 0,5N dependiendo de la cantidad de iones amonio presentes. El punto final de la valoración también se puede determinar potenciométricamente con un electrodo de pH. Esta valoración se llama valoración directa.



HX = ácido fuerte (X = Cl<sup>-</sup>, etc.)

Cuando se utiliza una solución valorada de ácido sulfúrico como solución absorbente, el ácido sulfúrico residual (es decir, el exceso que no reacciona con NH<sub>3</sub>) se valora con una solución estandarizada de hidróxido sódico y la cantidad de amoníaco se calcula por diferencia. Esta valoración se llama valoración indirecta o por retroceso.



### 3.4 Reactivos utilizados en el análisis de Kjeldahl.

#### 3.4.1. Catalizadores de Kjeldahl.

Los catalizadores están compuestos por más del 97% de una sal que provoca un aumento en la temperatura de ebullición del ácido sulfúrico y del 1-3% de un tipo de catalizador o una mezcla de catalizadores para aumentar la velocidad y la eficiencia del procedimiento de digestión. Los catalizadores típicos son selenio o sales metálicas de cobre o titanio. La selección de un determinado catalizador depende de aspectos ecológicos y tóxicos o de razones más prácticas como el tiempo de reacción o la formación de espuma y la pulverización.

Por ejemplo, el catalizador que contiene selenio reacciona más rápido, pero es tóxico, mientras que un catalizador que contiene cobre es considerablemente más seguro para las personas y el medio ambiente, pero da un proceso de digestión más lento. Un compromiso ideal es el catalizador mixto que consiste en cobre y sulfato de titanio. En muestras que contienen agua, por ejemplo, en determinaciones de nitrógeno total Kjeldahl (NTK), se pueden formar espuma y fuertes salpicaduras debido a las tabletas Kjeldahl. En estos casos es apropiado utilizar una mezcla de catalizador en polvo y perlas reguladoras de ebullición.

Además, los tiempos de digestión dependen del tipo de muestra, el volumen de ácido sulfúrico, la proporción de ácido y sal y el tipo de catalizador. Por ejemplo, las grasas, aceites y los compuestos heterocíclicos aromáticos se digieren más fácilmente si el catalizador contiene selenio. El uso de cobre como catalizador se está volviendo más común por ser más respetuoso con el medioambiente. Actualmente, el selenio o el cobre se utilizan como catalizadores en más del 90% de las digestiones de Kjeldahl que se realizan en todo el mundo.

#### 3.4.1.1 Catalizadores que se pueden utilizar.

- Catalizador Kjeldahl (Cu) (10.26% en  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) tabletas
- Catalizador Kjeldahl (Cu-Se) (1,5% C  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  + 2% Se) polvo
- Catalizador Kjeldahl (Cu-Se) (1,5%  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  + 2% Se) tabletas
- Catalizador Kjeldahl (Cu-Se) (9%  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  + 0,9% Se) tabletas

#### 3.4.2 Ácido y oxidante para la digestión.

En aplicaciones generales de alimentos y piensos, se utiliza ácido sulfúrico al 98% para las digestiones. Sin embargo, las aplicaciones especiales pueden requerir modificaciones en la concentración de ácido sulfúrico o mezclas de ácidos. Como ejemplo, las determinaciones de proteínas de la leche y derivados a menudo se llevan a cabo utilizando un ácido sulfúrico al 69% para reducir el riesgo de formación de espuma. También se pueden añadir agentes oxidantes para mejorar aún más la velocidad.

El peróxido de hidrógeno es el más ampliamente utilizado ya que acelera la descomposición del material orgánico y también tiene una acción antiespumante para controlar la formación de espuma durante la digestión. Sin embargo, es extremadamente reactivo y el riesgo de pérdidas de nitrógeno es bastante alto. Si la formación de espuma es el único problema, es mejor usar 1-3 gotas de una emulsión antiespumante comercial. Después de la digestión y antes de la neutralización del ácido sulfúrico con hidróxido sódico concentrado, la muestra se deja enfriar a temperatura ambiente y se diluye con agua destilada. Esto se hace para evitar salpicaduras de la muestra debido a la ebullición provocada por el calor de reacción desprendido al mezclar el ácido concentrado y la base. Además, si las muestras se diluyen con 10-20 mL de agua justo después del enfriamiento, se puede evitar la cristalización.

#### 3.4.2.1 Ácidos y oxidantes que se pueden utilizar.

- Ácido Sulfúrico 98% para determinación de nitrógeno
- Hidrógeno Peróxido 30% p/v (100 vol.) para análisis
- Silicona líquida antiespumante (ORG) grado técnico

#### 3.4.3 Alcalis para neutralización y liberación de amoníaco.

La muestra ácida se neutraliza por medio de una solución concentrada de hidróxido sódico. Por lo general, se agrega lentamente NaOH al 50% desde el cuello del matraz. Al ser más pesado, forma una capa debajo de la mezcla de digestión ácida diluida. Generalmente, por cada 5 mL de ácido sulfúrico concentrado usado en la digestión, se requieren 20 mL de hidróxido de sodio al 50% para hacer que la mezcla digerida sea fuertemente alcalina ( $\text{pH} > 11$ ). Los iones de amonio se convierten en amoníaco que se transfiere al recipiente receptor por medio de destilación al vapor. La destilación debería durar lo suficiente como para recuperar más del 99,5% del amoníaco en el recipiente receptor. Un tiempo de destilación típico es de 4 minutos con una potencia de vapor del 100%.

#### 3.4.3.1 Soluciones receptoras para el amoníaco.

El recipiente receptor para el destilado se llena con una solución absorbente para capturar el gas de amoníaco disuelto. Dependiendo del volumen de la mezcla de digestión y el método seguido, se deben recoger de 15 a 150 mL de condensado en el matraz receptor para asegurar la recuperación completa del nitrógeno. Las soluciones receptoras pueden ser ácido bórico al 2%, 3%, o al 4%, ácido sulfúrico al 0.05M, 0.1M o ácido clorhídrico al 0.1M o 0.2M.

#### 3.4.4 Valoración.

##### 3.4.4.1 Soluciones valoradas e indicadores.

Si la solución receptora es ácido bórico, los aniones tetrahidroxiborato formados se titulan con una solución estándar de un ácido fuerte. Esta valoración se llama valoración directa. La detección del punto final se puede realizar manualmente o con una valoración colorimétrica, utilizando una combinación de indicadores. La combinación de indicadores de rojo de metilo y azul de metileno se utiliza con frecuencia en muchos métodos.

El punto final de la valoración también se puede determinar potenciométricamente con un electrodo de pH. Es preferible ajustar el pH del ácido bórico a 4.65 antes de la destilación y usar un punto final de pH 4.65 para la valoración.

Si la solución receptora es un ácido clorhídrico o un ácido sulfúrico estandarizados, el exceso de solución ácida se neutraliza exactamente mediante una solución alcalina normalizada, como el hidróxido de sodio.

El punto final se detecta con un indicador de color, el más utilizado es el anaranjado de metilo. Esta valoración se llama valoración por retroceso.

#### 3.4.4.2 Soluciones valorantes e indicadores: valoración directa.

Ácido Clorhídrico 0.2 M.

Ácido Sulfúrico 0.05 M.

Indicador Mixto 4.8 (Rojo de Metilo-Verde de Bromocresol) Cambio de color: de rosa violeta a verde esmeralda (pH 4.8-5.5).

Indicador Mixto 4.4 (Rojo de Metilo-Azul de Metileno). Cambio de color: de rojo violeta a verde (pH 4.4-5.8).

#### 3.4.4.3 Soluciones valorantes e indicadores: valoración por retroceso.

Hidróxido de Sodio 0.1M.

Indicador Rojo de Metilo 0.1% Cambio de color: de rojo a amarillo (pH 4.2-6.2).

### 3.5 Normativa de proteínas en alimentos<sup>7</sup>

#### 3.5.1 Codex alimentarius.

De acuerdo con esta normativa, la proteína es un nutrimento básico en los procesos de producción, se considera como parámetro de calidad e influye en el color y sabor de los alimentos, por lo que es necesario conocer el contenido proteico de los alimentos el cual se estima a partir del Nitrógeno orgánico. Para ello, se utiliza el método Kjeldahl, el cual se basa en la combustión húmeda de la muestra y la oxidación de la materia orgánica con ácido sulfúrico utilizando una mezcla de catalizadores. El nitrógeno orgánico se fija como sulfato de amonio y esta sal se hace reaccionar con una base fuerte para liberar el amoníaco que se destila por arrastre de vapor y se recibe en un ácido débil que se titula con un ácido fuerte de concentración conocida.

Para convertir el nitrógeno a proteína, se emplea el factor de 6.38, el cual proviene de la consideración de que la mayoría de las proteínas tienen una cantidad aproximada de 34% de nitrógeno.

En la siguiente tabla se muestran algunos factores utilizados para transformar el Nitrógeno a proteína en algunos productos o semillas, entre ellos la leche.

**Tabla N°1.** Factores para transformar el nitrógeno en proteína<sup>8</sup>.

<b>PRODUCTO</b>	<b>FACTOR</b>
Cereales trigo entero, molido o harina	5,83
Harina de trigo (baja o mediana extracción)	5,70
Macarrones, espagueti o pasta de trigo	5,76
Salvado de trigo	6,31
Arroz todos los productos	5,95
Centeno, avena, cebada Mijo blanco, Mijo rojo, Trigo duro, trigo blando (todos los productos)	5,83
Leguminosas, nueces y semillas, nueces de tierra	5,46
Soya y subproductos	5,71
Almendras	5,18
Nuez de Brasil	5,46
Otras nueces	5,30
Coco, castañas, semillas (ajonjolí, Cártamo, girasol) otras semillas	5,30
Leche y productos de leche	6,38
Gelatina	5,55
Huevo	6,68
Yema de huevo	6,62
Galletas y productos de panadería	5,70
Ajonjolí, Alberjón, Amaranto, Avena con cascarilla, Avena sin cascarilla, Frijol flor de mayo, Frijol Negro, Frijol San Francisco, Garbanzo, Haba, Linaza, Lenteja, Maíz blanco, Maíz Dorado y otros alimentos	6,25

### 3.5.2. Criterios de aceptación.

El límite para todos los tipos de leches evaporadas es de un contenido mínimo de proteína en sólidos lácteos del 34 % según CODEX STAN 207-1999.

En términos de repetibilidad, la diferencia permitida entre dos resultados al efectuar un análisis por duplicado en la misma muestra y en forma simultánea por el mismo analista, no deberá exceder 0.10 g de nitrógeno por 100 g de muestra. En cuanto a la reproducibilidad, la diferencia entre dos resultados obtenidos por dos analistas, trabajando en el mismo o en diferentes laboratorios, siguiendo el mismo método, analizando la misma muestra, utilizando diferente equipo; no debe exceder 0.20 g de Nitrógeno por 100 g de muestra.

## **CAPÍTULO IV**

## 4.0 PRODUCTO FINAL



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA

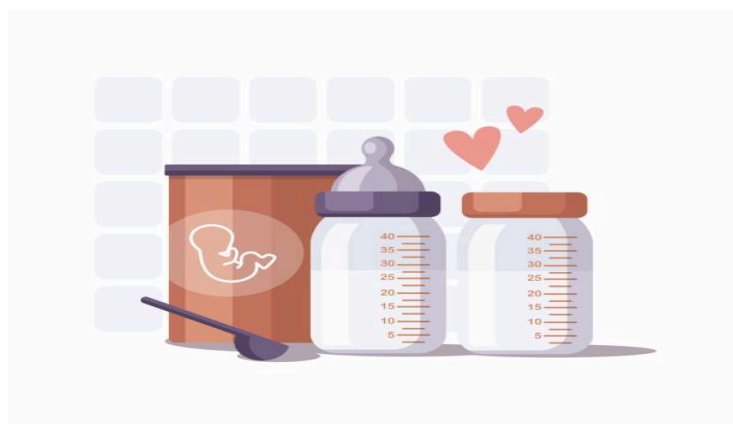


CICLO X

AÑO 202X

### PRACTICA DE LABORATORIO

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE PROTEÍNAS EN FÓRMULAS INFANTILES.



EL SALVADOR, SAN SALVADOR, AÑO 202X

## 4.1 Determinación del contenido de proteínas en fórmulas infantiles.

### 4.1.1 Introducción:

Las proteínas y el nitrógeno están estrechamente relacionados debido a que las proteínas son macromoléculas compuestas principalmente por carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno. De hecho, el nitrógeno es un elemento esencial presente en todos los aminoácidos, que son los bloques de construcción fundamentales de las proteínas. Cada aminoácido contiene un grupo amino ( $-NH_2$ ) y un grupo carboxilo ( $-COOH$ ), junto con un grupo lateral que varía entre los diferentes aminoácidos.

El grupo amino proporciona el átomo de nitrógeno que se une con otros aminoácidos mediante enlaces peptídicos durante la síntesis de proteínas. En este proceso, el grupo amino de un aminoácido reacciona con el grupo carboxilo de otro aminoácido, liberando una molécula de agua y formando un enlace peptídico entre los dos aminoácidos. Esta reacción se repite para formar cadenas largas de aminoácidos, que luego se pliegan y se organizan para formar la estructura tridimensional de las proteínas.

Por lo tanto, la cantidad de nitrógeno presente en una muestra se puede utilizar como una medida indirecta del contenido de proteínas, ya que las proteínas son la principal fuente de nitrógeno en la mayoría de los alimentos y materiales orgánicos. Este principio es la base del método Kjeldahl, un procedimiento analítico comúnmente utilizado para determinar el contenido de nitrógeno en muestras, que luego se convierte en contenido de proteínas utilizando factores de conversión estándar.

Según la AOAC 991.20 El procedimiento es beneficioso debido a que es directo, el material necesario es muy simple (aparato de destilación Kjeldahl) no requiere de una gran inversión de dinero, es fácilmente adaptable al análisis rutinario de un gran número de muestra y es el método estándar para la determinación del contenido proteico en diversos alimentos.

A continuación, se describe el procedimiento para la determinación de proteínas en una fórmula de leche infantil tomando de referencia la AOAC 991.20, la cual describe los pasos para la preparación de la muestra, materiales y reactivos a utilizar, así como los cuidados que hay que tener al ser tratada esta dicha muestra ya que de eso depende los resultados satisfactorios que queremos obtener.

#### 4.1.2 Objetivos

Objetivo general:

-Determinar el porcentaje de proteínas en fórmulas infantiles de diferentes marcas comerciales registradas en El Salvador.

Objetivos específicos:

- Conocer el procedimiento experimental del análisis de proteínas por el método de Kjeldahl, recogiendo el nitrógeno sobre ácido bórico y valorándose con una disolución de ácido clorhídrico.

- Calcular el porcentaje de proteína de la fórmula infantil a partir del contenido de nitrógeno obtenido por el método Kjeldahl.


- evidenciar correctamente cada parte del proceso que implica el método de Kjeldahl.



#### 4.1.3 Materiales y reactivos<sup>7</sup>


##### 4.1.3.1 Materiales

- Muestra de fórmula de leche infantil de una marca X.


##### 4.1.3.2 Reactivos

- **Ácido Sulfúrico concentrado** 

- **Ácido bórico al 4%**  

- **Ácido Clorhídrico 0.2 N** 

##### 4.1.3.3 Catalizadores

- **Sulfato de potasio anhidro** 

- Sulfato de cobre (II) pentahidratado



#### 4.1.3.4 Indicador

- Anaranjado de metilo

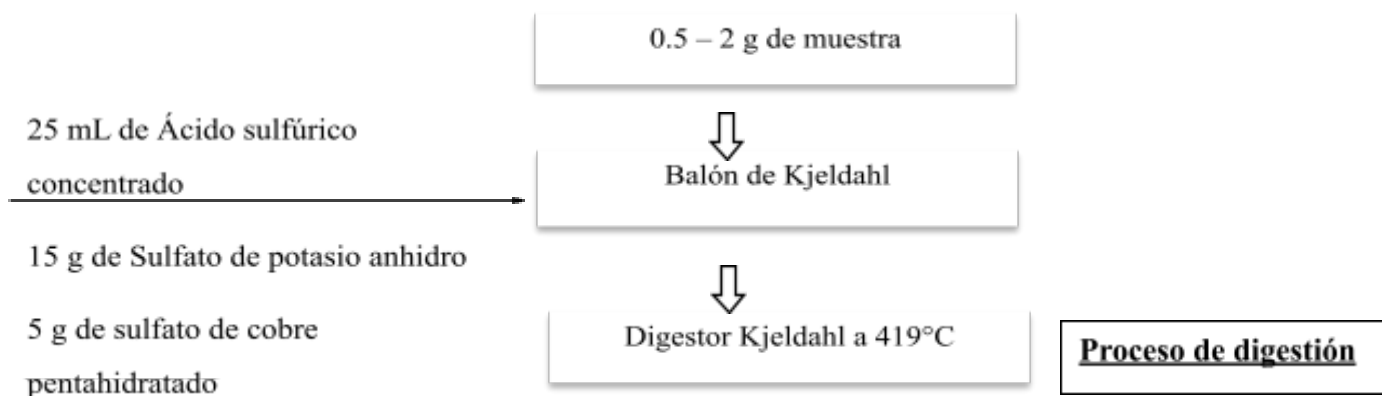
#### 4.1.4 Equipos<sup>7</sup>

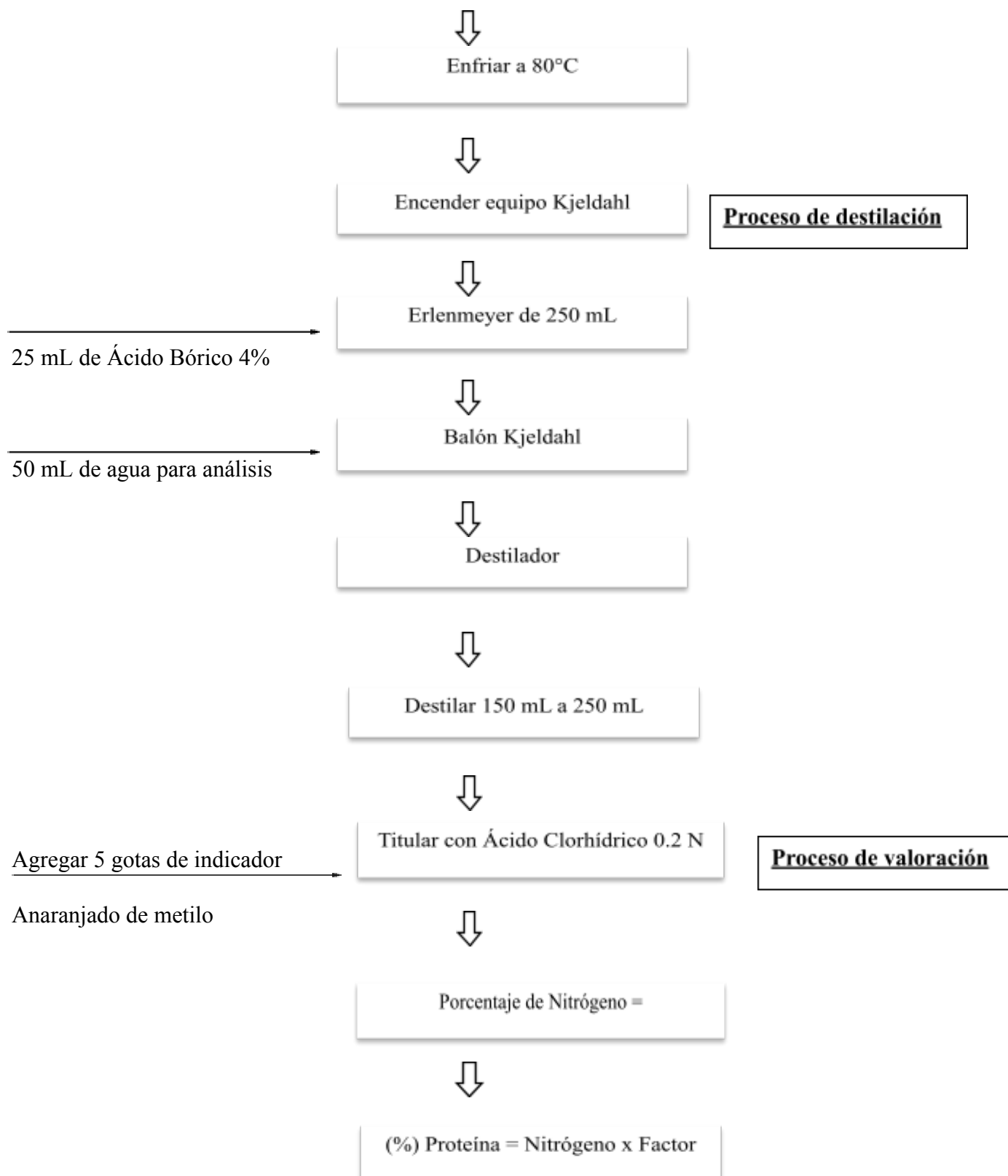
- Equipo de Kjeldahl de digestión y destilación
- Balón para Kjeldahl
- Balanza analítica
- Espátula
- Probeta de 100 mL
- Probeta de 200 mL
- Erlenmeyer de 250 mL
- Vidrio de Reloj

#### 4.1.5 Método Kjeldahl

Factor para la conversión de nitrógeno a proteína en leche y sus derivados: 6.38.

#### 4.1.6 Esquema del procedimiento.





#### 4.1.7 Descripción del procedimiento<sup>7</sup>

Preparación de la muestra.

1- Pese exactamente 2 g de muestra con exactitud de 0.1 g sobre un trozo de papel de amoníaco (papel glassine) luego colocar la muestra dentro del balón de digestión de Kjeldahl (evitar que la muestra se adhiera al cuello del balón).

Digestión:

2-Agregar al balón de digestión de Kjeldahl, 15 g de Sulfato de Potasio anhidro más 5 g de Sulfato de cobre pentahidratado y 25 mL de Ácido Sulfúrico concentrado.

3-Armar el equipo de digestión como lo muestra la “Figura N°1” literales 1), 2), 3), 4).

4-Calentar la mezcla a temperatura baja hasta que cese la formación de espuma. Luego aumentar progresivamente la temperatura.

- La digestión terminará cuando el color de la muestra sea de color verde-turquesa transparente (son partículas visibles de muestras). Y luego continúe calentado a temperatura constante durante 1 hora y 30 minutos. La digestión demora aproximadamente 2 horas. Retirar los balones del equipo y dejar enfriar.

5-Agregar a cada balón 50 mL de agua destilada con mucho cuidado ya que al agregar el agua al ácido sulfúrico se desarrolla una reacción fuertemente exotérmica.

Destilación:

6- Prepara el equipo de destilación como lo muestra la “Figura N°1” utilizando los literales 2), 3), 4), 5), 6), y 7).

7-Preparar un matraz receptor de 500 mL que contenga 50 mL de Ácido Bórico al 4% (sobre el cual se va a recoger el amoníaco destilado) (literal 7) de la “Figura N°1”), agregar de 3 a 4 gotas del indicador Anaranjado de Metilo, colocarlo a la salida del refrigerante cuidando que el extremo de la pipeta colectora quede sumergido en la solución.

8-Abrir la llave del agua de refrigeración del destilador.

9-Adicionar 1 g de perlas de vidrio al balón que contiene la muestra digerida, en seguida se conecta el matraz al pico de aparato de destilación. Se calienta el líquido pasando el mechero, hasta que hierva durante 20 minutos, al comienzo se calienta poco a poco para reducir la espuma.

- El volumen recogido de destilado deberá ser por lo menos de 150 mL.

Titulación:

10-El Ácido Bórico remanente del destilado se titula con solución de Ácido Clorhídrico 0.2 N hasta el cambio de color.

-Al titular la muestra con Ácido Clorhídrico 0.2 N. Un color violeta indica el punto final de la titulación. Compárese este color con el del blanco. Cada equivalente de Ácido Clorhídrico usado corresponde a un equivalente de amoníaco o a un equivalente de Nitrógeno en la muestra original. El peso del Nitrógeno esta dado por miliequivalentes del ácido x 14 (peso molecular del Nitrógeno).

Preparación del blanco:

Seguir los pasos desde el numeral 2 hasta el 10

#### 4.1.8 Calculos<sup>7</sup>

##### 4.1.8.1 Limite de aceptación

El límite para todos los tipos de leches evaporadas es de un contenido mínimo de proteína en sólidos lácteos del 34 % según CODEX STAN 207-1999.

4.1.8.2 De la valoración se puede calcular el número de equivalentes de nitrógeno recogidos, y con este dato se obtiene el porcentaje de nitrógeno en la muestra.

$$\%Nitrogeno = \frac{V*N*0.014}{m} * 100$$

$$\%Proteinas = \%Nitrogeno * F$$

Dónde:

V= volumen de ácido clorhídrico empleado en la titulación, en mL.

N= normalidad de ácido clorhídrico.

M= masa de la muestra en gramos.

0.014= Miliequivalente del Nitrógeno.

F = Factor de conversión de Nitrógeno a Proteína utilizado en leche y sus derivados: 6.40

Nota: El factor de cada alimento es distinto y están separados según el origen de estos mismos.

## 5.0 Principales fuentes de error o interferencias<sup>10,11</sup>.

### 5.1 Según la normativa internacional Codex alimentarius CXS 192- 1995:

5.1.1 La inclusión de nitrógeno no proteico como en el caso de los aditivos ya sea estabilizantes, reforzadores de textura, anti aglutinantes y antioxidantes, pueden aportar nitrógeno al resultado. (aunque la cantidad de este nitrógeno suele ser despreciable comparada con la del nitrógeno proteico).

### 5.2 La pérdida de nitrógeno durante la digestión<sup>9</sup>.

5.2.1 El exceso de sulfato de sodio o de potasio que se añade al ácido para elevar el punto de ebullición, puede producir una descomposición por calor y por lo tanto pérdida de nitrógeno. Por otro lado, el exceso de catalizador (de cobre generalmente) también.

5.2.2 La digestión incompleta de la muestra. Generalmente debida a falta de tiempo de reacción o falta de ácido sulfúrico.

### 5.3 Pérdida de amoníaco<sup>9</sup>.

5.3.1 Pérdida de amoníaco por refrigeración insuficiente en el condensador y por fugas en el circuito de destilación.

## **CAPÍTULO V**

## 5.0 CONCLUSIONES

1. El Fundamento del método de Kjeldahl se basa en medir el contenido en nitrógeno de una muestra. El contenido de proteínas se calcula seguidamente, presuponiendo una proporción entre la proteína y el nitrógeno. Este método puede ser dividido básicamente en 3 etapas: digestión, destilación y valoración.

El procedimiento a seguir es diferente en función de si en la etapa de destilación el nitrógeno liberado es recogido sobre una disolución de ácido bórico o sobre un exceso conocido de ácido clorhídrico o sulfúrico patrón. Ello condiciona la forma de realizar la siguiente etapa de valoración, así como los reactivos empleados. En esta marcha analítica se llevó a cabo el primer procedimiento, cuando el nitrógeno se atrapa sobre ácido bórico.

2. Implementado la técnica de análisis propuesta en esta investigación la cual se tomó de referencia el método de la AOAC 991.20 se pretende que pueda ser utilizado para la determinación de proteínas en fórmulas infantiles.
3. Las normativas internacionales como el Codex alimentarius CXS 192- 1995 nos proporcionas información sobre interferentes que pueden haber en la determinación de proteínas en leche en polvo por el método de Kjeldahl como la presencia de nitrógeno no proteico que puede provenir de diversos aditivos agregados a la formula infantil, pero no existe una especificación de tolerancia en base a estas interferencias ya que mencionan que el nitrógeno proteico es despreciable a comparación de nitrógeno proveniente de las proteínas.

El método de la AOAC 991.20 nos proporciona posibles errores que se pueden cometer al momento de realizar la determinación de proteínas en leche en polvo por el método de Kjeldahl para lo cual en la técnica de análisis propuesta se han detallado los pasos necesarios a seguir para evitar estos errores.

La norma internacional como el Codex alimentarius CXS 207-1999 nos proporciona un límite de aceptación del mínimo contenido de proteínas que deben de tener todos los tipos de leches en polvo.

4. La técnica de análisis propuesta en este trabajo de investigación proporciona apoyo de carácter bibliográfico e incluye todos los parámetros para que el estudiante pueda determinar apropiadamente las proteínas en fórmulas infantiles por el método de Kjeldahl.

## **CAPÍTULO VI**

## **6.0 RECOMENDACIONES**

- 1.0 Se recomienda a los organismos internacionales como la FDA y la AOAC que promuevan la actualización y difusión de las normativas relacionadas con la determinación de proteínas en productos alimenticios como las bebidas de soya, dirigidas a los actores relevantes del sector.
  
- 2.0 Se recomienda a la Universidad de El Salvador incorporar la determinación de proteínas en alimentos como parte de sus prácticas de laboratorio. Introduciendo el método de Kjeldahl como unidad de aprendizaje en las materias dedicadas al análisis de alimentos, esto permitirá a los estudiantes de la Facultad de Química y Farmacia desarrollar habilidades analíticas fundamentales y comprender la importancia de medir con precisión el contenido de proteínas a partir del nitrógeno proteico.
  
- 3.0 A la Asociación de Pediatría de El Salvador que exija que se cumplan los valores de proteínas en las fórmulas infantiles que se comercializan en el país.
  
- 4.0 A futuras investigaciones llevar a cabo estudios comparativos del contenido de proteína entre las diferentes fórmulas infantiles disponibles en el mercado, para conocer la que mejor contenido proteico proporcione a los bebés.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

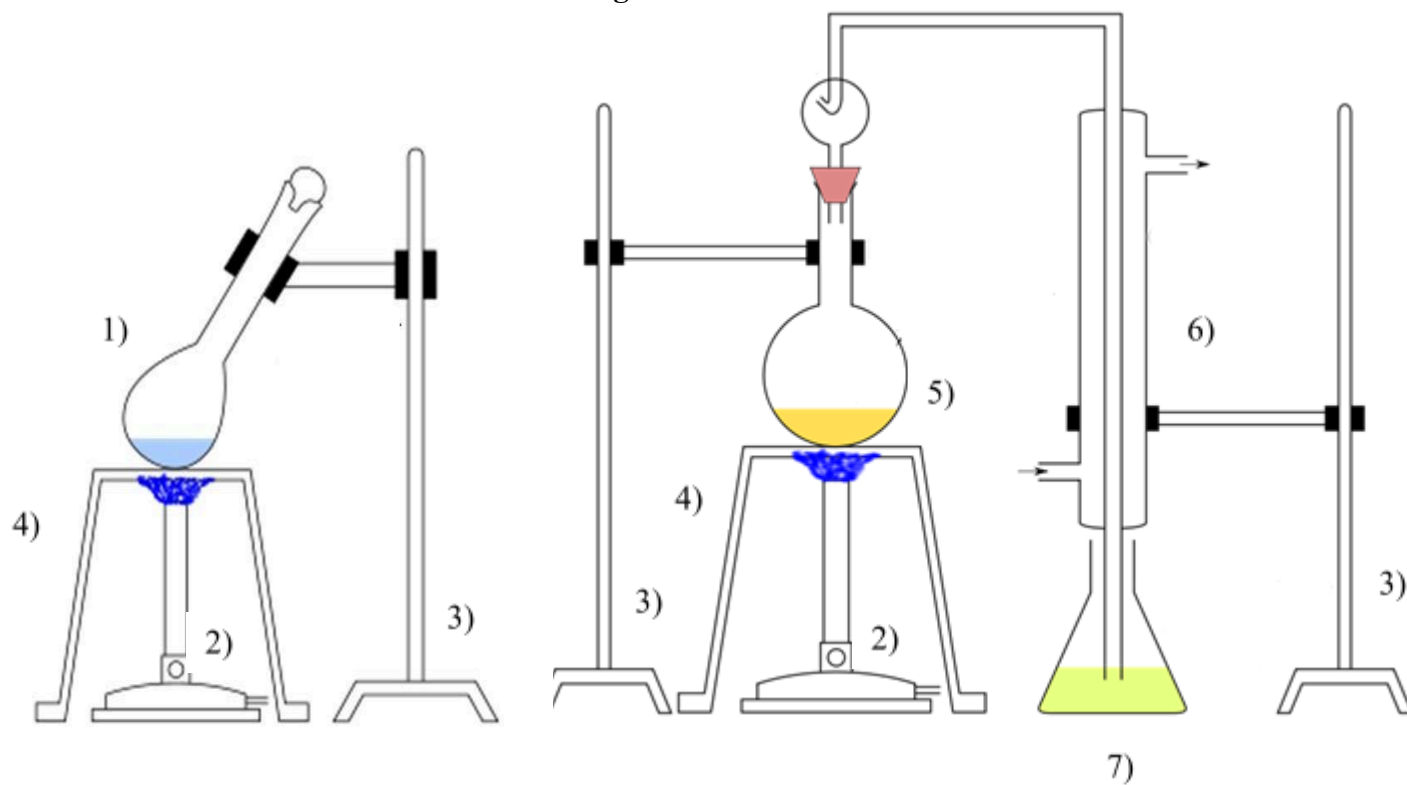
1. Sociedad Española de Química Analítica, Glosario de términos analíticos [Internet]. Disponible en [https://seqa.es/wp-content/uploads/2023/03/Glosario\\_archivo\\_final\\_compressed.pdf](https://seqa.es/wp-content/uploads/2023/03/Glosario_archivo_final_compressed.pdf)
2. Codex Alimentarius para las leches en polvo Codex Stan 207-1999 [Internet]. Disponible en <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/es/>
3. Fundación para la Salud, Novo Nordicks España [Internet]. Disponible en <https://www.fundacionparalasalud.org/infantil/202/macronutrientes>
4. Food and Drug Administration (FDA) [Internet]. Disponible en <https://www.fda.gov/food/resources-you-food/la-formula-infantil>.
5. Seguridad Alimentaria Nutricional, Conceptos Básicos. [Internet]. 2011; 3:8. Disponible en: <https://openknowledge.fao.org/server/api/core/bitstreams/f1bb882a-b059-4368-9022-c70840d77ce5/content>
6. Méndez L. Manual de Análisis de Alimentos, Facultad de Química Farmacéutica Biológica de la Universidad Veracruzana. 2020. [Internet]. Disponible en <https://www.uv.mx/qfb/files/2020/09/Manual-Analisis-de-Alimentos-1.pdf>
7. Alimentos-Determinación de Proteínas en Alimentos - Método de Ensayo (Pruebas). Norma Mexicana NMX-F-608-NORMEX-2011 Mexico; 2011.
8. Diario oficial de la Federación, Aclaración a la Norma Mexicana NMX-F-608-NORMEX-2011. [Internet]. Disponible en [https://www.dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5360486 &fecha=18/09/2014#gsc.tab=0](https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5360486 &fecha=18/09/2014#gsc.tab=0)
9. AOAC (Association of Official Analytical Chemistry), Official 1989. Official Analytical Chemists- 14th Ed. Washington. DC. Publisher by the Association of Official Chemists 1015 p.
10. Equipos y laboratorios de Colombia S.A.S. 2011 - 2022 [Accedido el 7 de abril de 2024]. <https://equiposylaboratorio.com>.
11. FAO y OMS. 1995. Norma general para los contaminantes y las toxinas presentes en los alimentos y piensos. Norma del Codex Alimentarius, n.º CXS 193-1995. Comisión del Codex Alimentarius. Roma.

12. FAO y OMS. 1995. Norma general para los aditivos alimentarios. Norma del Codex Alimentarius, n.º CXS 192- 1995. Comisión del Codex Alimentarius. Roma.

## ANEXOS

## ANEXO N°1

Figura N°1



Equipo básico de Kjeldahl

Fuente: Ilión Analítica equipos para laboratorios e industria.

DONDE:

- 1) Balón de digestión Kjeldahl
- 2) Mechero bunsen
- 3) Soporte metálico
- 4) Soporte y malla de asbesto
- 5) Balón de destilación
- 6) Condensador
- 7) Matraz receptor

**Figura N°2**



Equipo de Kjeldahl moderno

Fuente: Behr-Labor behrotest® Kjeldahl Complete System, BASIC, Block Digestion - Team Medical & Scientific Sdn Bhd.