

NOTA PRELIMINAR

**DETERMINACION COLORIMETRICA DE PROTEINA BRUTA
EN MUESTRAS VEGETALES**

Por A. Calleja

El objeto de esta técnica consiste en la determinación de la proteína bruta de una muestra vegetal como resultado de multiplicar el nitrógeno liberado en forma amoniacal, por un factor de transformación ponderal del nitrógeno en proteína.

El ataque se realiza partiendo de 0,5 g de muestra, que se introduce en un matraz micro-Kjeldahl de 100 ml de capacidad. Se añaden 5 ml de ácido sulfúrico concentrado y una tableta catalizadora cuyos componentes son 1 g de sulfato sódico y el equivalente a 0,05 g de selenio.

Después de una ligera agitación, el matraz se coloca sobre una fuente de calor provista de termostato. La temperatura al comienzo del ataque ha de ser suave, agitando de vez en cuando el matraz hasta desaparición de los humos blanquecinos. A continuación se calienta fuertemente hasta ebullición, y se deja atacar el tiempo suficiente hasta la obtención de un líquido transparente. Se deja enfriar hasta temperatura ambiente y se lava el matraz repetidas veces con agua desmineralizada, llevando el líquido resultante a un volumen de 250 ml.

Para controlar la pureza de los reactivos se efectuará un ensayo en blanco del ataque con otro matraz micro-Kjeldahl en el que únicamente se han puesto los 5 ml del ácido sulfúrico y la tableta catalizadora.

Para hacer la curva patrón se ha partido de sulfato amónico, haciendo, en primer lugar, una solución madre de 1.000 ppm de nitrógeno, de la cual se hacen las diluciones pertinentes hasta llegar en matraces de 50 ml, a una concentración final de 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 y 1 ppm de nitrógeno, añadiendo en cada matraz 3 ml del reactivo de Nessler.

La preparación de la muestra se hace a partir de 1 ml de la solución

problema, llevado a un matraz de 50 ml al que se añade igualmente 3 ml del reactivo. Es muy importante que antes de añadir éste, el matraz tenga agua en una tercera parte de su contenido, pues en caso contrario suele producirse una turbidez que podría darnos resultados erróneos.

Transcurridos 10 minutos se efectuará la lectura de los patrones y de los problemas en un fotolorímetro a una longitud de onda de 420 nm. El cero de la escala debe hacerse con 1 ml de la solución obtenida del ataque del ácido sulfúrico sin muestra, con 3 ml del reactivo y llevado todo a 50 ml. Este ml del blanco ha de ser añadido a todos los patrones con el fin de mantener todas las soluciones en idéntica acidez.

Para comparar los resultados obtenidos en la determinación colorimétrica del nitrógeno se han tomado como referencia dos métodos clásicos como son, el macro-Kjeldahl (norma UNE 64012), en el cual el destilado final es recogido sobre ácido sulfúrico, haciéndose la valoración del exceso de éste con hidróxido sódico; y el semi-micro Kjeldahl (norma UNE 64011), en el cual el amoníaco destilado se recoge sobre ácido bórico, valorándose con ácido clorhídrico.

Los resultados obtenidos en los tres casos en tanto por ciento de proteína ($N \times 6,25$), se expresan en la Tabla I.

TABLA I
Comparación de tres métodos en la determinación de proteína
(Medias de cinco repeticiones)

	% proteína	D. típica	C. variación
Macro-Kjeldahl	11,75	0,279	2,37 %
Semi-micro Kjeldahl	10,79	0,466	3,82 %
Colorimétrico	11,71	0,126	1,07 %

Se utilizó la prueba «t» de Student para ver si las diferencias de los valores encontrados en cada uno de los métodos eran significativas, resultando negativas entre la determinación con el macro Kjeldahl y los valores obtenidos por colorimetría, pero sí había diferencias significativas al comparar el semi-micro con los otros dos métodos.

Además de la contrastación con los dos métodos anteriormente expuestos, se han realizado pruebas de adición estándar con amoníaco, en estos casos la recuperación ha sido del 99,68 %.

La ventaja fundamental en la determinación del nitrógeno por colorimetría es la desaparición de la destilación, que es precisamente la fase donde suelen producirse pérdidas de amoníaco debido al mal ajuste de los elementos que componen el equipo de destilación, así como la valoración final en presencia de un colorante, que es igualmente otro momento donde se pueden cometer grandes errores.

RESUMEN

Se describe un método para la determinación colorimétrica del nitrógeno liberado en forma amoniacal usando el reactivo de Nessler.

SUMMARY

A method is described for the determination of free nitrogen under amoniacal form using Nessler reagent.