

Microdeterminación de Prótidos en Harinas

ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS QUIMICAS

U. N. A. M.

T E S I S

Que para su Examen Profesional
Presenta

M^o DE LOS ANGELES DEL CASTILO
CUERVO - ARANGO

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO

216



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A Mis Padres

MICRODETERMINACION DE PROTIDOS EN HARINAS

- 1°—Introducción.
- 2°—La mineralización de alimentos. Los métodos conocidos.
- 3°—La determinación de prótidos por Kjeldahl y Nessler.
 - a) Discusión teórica.
 - b) Comparación de resultados obtenidos.
- 4°—Conclusiones.
- 5°—Bibliografía.

México, D. F.

INTRODUCCION

Los alimentos que consumen tanto los seres humanos como los animales, están compuestos principalmente de proteínas, carbohidratos y grasas. El grupo más importante de estas substancias lo constituyen las proteínas que con su inestabilidad química y complejidad de las moléculas, resultan esenciales para el fenómeno de la vida ya que el protoplasma se forma a base de estos compuestos. Algunos animales pueden subsistir con una dieta de proteínas, formando de éstas las grasas y carbohidratos que necesitan.

Resalta por tanto la importancia primordial que tiene la determinación de prótidos en alimentos de todas clases. Desgraciadamente no concuerda con esta importancia la facilidad y precisión de los métodos usados para dicha determinación, que se basan en la conversión de los compuestos de nitrógeno en sales minerales de amonio, seguida por el cuanteo de este último.

A base del amoniaco encontrado se calcula su contenido de nitrógeno y de éste se deduce la cantidad de prótidos que corresponden, mediante el uso de factores empíricos que difieren ligeramente para cada clase especial de alimentos. Dichos factores se calculan a base de los correspondientes contenidos de nitrógeno de las proteínas, que varían de 15 a 17.6%. Las proteínas vegetales tienen un contenido de nitrógeno ligeramente mayor del promedio y las proteínas animales algo menor, siendo el promedio de 16%, con el que la fórmula para calcular prótidos a base del contenido de nitrógeno resultaría $N \times 6.25$, siendo este último factor el más usado.

En el método explicado se prescinde del nitrógeno que pueden tener los alimentos sin estar contenido en los prótidos, que aunque por lo

general es en cantidades pequeñas en algunos alimentos especiales, como son las setas y las trufas, sí puede tener importancia, haciendo muy pocos precisos los resultados de esta determinación.

No ha sido el objeto de este estudio eliminar todos los inconvenientes de los métodos usados en la determinación de prótidos, lo que solo se conseguiría elaborando un método más directo, pero si ha sido posible encontrar una simplificación apreciable para el cuanteo del amoniaco formado, basándose en los razonamientos que se indican a continuación.

Para la determinación de nitrógeno en materiales orgánicos, ya sean compuestos individuales puros o mezclas, combinaciones (como son los alimentos), etc., se conocen varios procedimientos de los cuales es el de *Dumas* el más preciso y consiste en quemar la sustancia en un tubo de combustión ordinario, en ambiente de CO_2 y recoger sobre potasa los gases desprendidos, observando ciertas precauciones. Los gases están constituidos por CO_2 , vapor de agua y nitrógeno; el primero es absorbido por el álcali, los vapores de agua son condensados y el nitrógeno se mide volumétricamente.

El tiempo de trabajo es de 2 a 3 horas, siendo necesaria una vigilancia continua en todas las fases de la determinación.

Con el método *Micro-Dumas* el tiempo de trabajo se reduce a media hora, pero necesita, además del aprendizaje cuidadoso, una práctica continua, por lo que resulta poco apropiado para un laboratorista dedicado además a otros análisis y que practica esta determinación solo en forma esporádica.

El método de *Kjeldahl* consiste en efectuar una destrucción de la materia orgánica por calentamiento con ácido sulfúrico, en presencia de catalizadores, para acelerar la operación en la que se forma sulfato de amonio, que se descompone por tratamiento con un álcali desprendiendo amoniaco, que se destila y valora volumétricamente.

Los inconvenientes de este método son, el molesto desprendimiento de gases al mineralizar la materia orgánica y lo lento de la operación.

Los inconvenientes del *Micro-Kjeldahl* son los mismos apuntados al referirnos al *Micro-Dumas* y son debidos a la delicadeza de las operaciones.

El método de *Nessler* mide colorimétricamente la cantidad de amoniaco formado. Como reactivo se usa una disolución de yoduro mercúrico en yoduro de potasio, que con el amoniaco da un compuesto colorido. Este método se utilizaba usando los conocidos tubos de *Nessler* y

comparando directamente con una escala colorida lo que daba lugar a errores personales a veces muy elevados.

Actualmente se dispone de colorímetros foto-eléctricos, con lo que se elimina el error personal y por esto se ha pensado en lo que constituye el objeto del presente estudio: utilizar para la determinación de prótidos un procedimiento que aproveche las ventajas de la mineralización por el método Micro-Kjeldahl y abrevie la segunda fase o sea la determinación del amoníaco formado, utilizando para esto la nesslerización.

Se ha hecho especialmente un detenido estudio de la mineralización de las harinas de maíz mediante los ácidos sulfúrico y perclórico y de la subsiguiente determinación del amoníaco formado, por destilación y nesslerización, siguiendo en todo las ideas y valiosas orientaciones del Dr. F. L. Hahn, a quien se debe todo el mérito que pueda tener este trabajo, lo que nos complacemos en hacer público con nuestro personal agradecimiento.

CAPITULO SEGUNDO

LA MINERALIZACION DE LOS ALIMENTOS. LOS METODOS CONOCIDOS

Todos los métodos que se usan para la mineralización de los alimentos tiene por objeto la destrucción de la materia orgánica, por oxidación, y la transformación de los componentes inorgánicos en sales minerales. El oxígeno necesario para la destrucción de la materia orgánica se obtiene del aire, si se calcina el producto, o de sustancias oxidantes que pueden ser sólidas, como oxilita, mezclas de nitrato de potasio y carbonato de sodio etc., o líquidas entre las cuales están los ácidos nítrico o sulfúrico concentrados.

Como el presente estudio se refiere a la determinación de proteínas en los alimentos, es natural que en este caso no puede emplearse para la mineralización ningún oxidante que contengan nitrógeno y como por otra parte en los métodos por calcinación o por vía seca existe la posibilidad de que se produzcan pérdidas de nitrógeno, en forma de óxidos volátiles, en lo que sigue vamos a tratar exclusivamente de los métodos de mineralización por vía húmeda que utilizan como oxidante el ácido sulfúrico.

En estos métodos de mineralización se pueden diferenciar dos fases:

a) Carbonización de la materia orgánica, con separación del grupo amigéno formándose amoniaco que se fija en forma de sal de amonio. Para esta reacción no hace falta añadir reductores ya que el exceso de hidrógeno, producido por la descomposición de la materia orgánica, actúa aun en presencia del oxidante fuerte que es el ácido sulfúrico concentrado y caliente.

b) Destrucción del resto de materia orgánica, por una segunda oxidación más energética; en ella el carbono y el hidrógeno se pierden como anhídrido carbónico y agua respectivamente, mientras que el nitrógeno se mantiene como sulfato de amonio, del que más tarde se libera amoniaco por un tratamiento alcalino.

Como el proceso de mineralización empleando ácido sulfúrico solamente, como se hacía en los primeros métodos, resultaba demasiado lento, se estudió la forma de acelerar la reacción por distintos procedimientos que se pueden agrupar en tres clases principales:

1—Métodos en los que se acelera la reacción por el empleo de catalizadores, siendo los más empleados con este objeto el mercurio metálico, el óxido de mercurio, los sulfatos de cobre o hierro y el selenio en forma elemental o de óxido.

2—Uso de sustancias que tienen la propiedad de aumentar la temperatura de ebullición del ácido sulfúrico, con lo que se puede verificar la reacción a una temperatura más elevada, disminuyendo el tiempo necesario para la misma.

3—Empleo, para la segunda fase de la operación, de otros oxidantes, en unión del ácido sulfúrico, para conseguir una reacción más rápida y energética, como son el persulfato, el agua oxigenada, o el ácido perclórico.

El método usado aquí para la mineralización de harinas de maiz, utiliza el ácido sulfúrico, con el ácido perclórico. Este último destruye al carbón formado en la primera parte de la reacción, o sea en el tratamiento con el ácido sulfúrico, y oxida el resto de la materia orgánica.

Los pasos que se siguen son:

Se pesan 2.5 gr. de harina, usándose precisamente esta cantidad para facilitar las operaciones numéricas posteriores, y se colocan en un pequeño matraz de Kjeldahl. Se les agregan unos 5 ml. de ácido sulfúrico concentrado y se calienta hasta completa carbonización de la materia orgánica. Una vez conseguido esto, se enfría el matraz y se añaden unos 5 ml. de ácido perclórico. Se inicia de nuevo el calentamiento muy suave y la masa negruzca y granulosa que se obtuvo al calentar con ácido sulfúrico, va adquiriendo primero una consistencia pastosa y luego líquida, cambiando el color a rojo anaranjado, amarillo e incoloro. En este momento se suspende la operación.

De este modo se logra primero, por el tratamiento por el ácido sulfúrico, la transformación del nitrógeno orgánico en sulfato de amonio,

en tanto que el ácido perclórico destruye por completo la materia orgánica sobrante.

Corresponde a Ernest Kahane (Bibl N° 2) el mérito de haber estudiado e indicado las condiciones bajo las cuales el uso del ácido perclórico, como oxidante en tales reacciones, no implica peligros. Encontró que practicando primero una desintegración de material orgánico mediante el ácido nítrico concentrado, seguida de la oxidación completa con el ácido perclórico o con una mezcla de éste con el sulfúrico concentrado, no se producían explosiones.

Como ya hemos dicho que en nuestro caso no se debe usar como oxidante el ácido nítrico, se estudió la posibilidad de conseguir la primera fase con el ácido sulfúrico sólo, agregando luego el perclórico. En ningún caso se han observado una descomposición violenta, difícil de controlar, o explosiones; pero es indispensable el ataque previo con ácido sulfúrico sólo, pues cuando hemos usado desde la primera fase, la mezcla de sulfúrico y perclórico, se produjeron detonaciones fuertes al iniciarse el calentamiento.

Otra de las precauciones que se deben tener en la utilización de este método, también indicada por E. Kahane, es la de suspender la operación cuando se consigue un líquido incoloro, pues si se continúa el calentamiento, la solución vuelve a adquirir un color amarillo intenso decolorándose luego definitivamente y los resultados que se obtienen son bajo en nitrógeno. La aparición de esta nueva coloración puede deberse a la existencia de compuestos orgánicos simples, solubles en ácido sulfúrico, que solo se destruyen mediante una nueva carbonización y oxidación. Quizás en esta nueva reacción el ácido perclórico forme con la materia orgánica óxidos menores de cloro, que con el amoniaco dan productos de sustitución inestables, y que se descomponen formando nitrógeno elemental, lo que ocasiona los resultados bajos en el cuanteo.

CAPITULO TERCERO

La determinación de prótidos por Kjeldahl y Nessler.

a) Discusión teórica.

Para la determinación de prótidos, cualquiera que sea el método empleado, se empieza primero por la mineralización de la sustancia orgánica procediendo después al cuanteo de la sal de amonio formada.

Como en el capítulo anterior ya hemos hablado de la mineralización de los alimentos, vamos a referirnos ahora a la segunda parte o sea al cuanteo de la sal.

Dos han sido los métodos estudiados: el de Kjeldahl y el de Nessler.

En el primero se puede dividir esta segunda parte en dos fases:

1.—Destilación del amoniaco.

2.—Determinación del amoniaco en el destilado recolectado.

Para la destilación del amoniaco se procede de la manera siguiente: Una vez conseguida la transparencia en la solución mineralizada se enfría el matraz, se diluye su contenido con agua, se agrega luego solución de hidróxido de sodio en cantidad suficiente para que la reacción sea fuertemente alcalina y se destila el amoniaco formado, recogién dose sobre una cantidad conocida de un ácido valorado.

Varias son las precauciones necesarias para evitar los posibles errores de esta destilación.

Al agregar la solución de hidróxido de sodio, debe hacerse resbalar por las paredes del matraz a fin de que se acumule en el fondo y se formen una capa superior ácida y otra inferior alcalina, lo que previene un desprendimiento de amoniaco antes de que esté conectado el aparato. Como todas las soluciones alcalinas, ésta tiende a hervir tumultuosamen-

re, lo que se evita agregando granalla de Zn, para que el burbujeo de hidrógeno que se desprende regule la ebullición. En caso de que en la mineralización se haya usado como catalizador el mercurio, se prescribe agregar sulfuro de sodio o potasio, o lo que es más cómodo, tiosulfato de sodio (que se descompone con las sales de metales pesados en soluciones alcalinas) para formar el sulfuro de mercurio y evitar así que se retenga amoniaco en forma de compuestos mercúricos aminados.

Sin embargo esta precaución no es necesaria si se usa granalla de Zn para aplacar la ebullición, ya que el Zn es un fuerte reductor y hace que se deposite mercurio metálico, impidiendo así la formación de dichos compuestos.

Una dificultad muy conocida de esta destilación, es la posibilidad del arrastre de pequeñas gotas de solución de hidróxido de sodio que al incorporarse al destilado, reaccionarían con el ácido valorado determinándose un contenido de amoniaco mayor del real.

Para evitar esta fuente de errores, varios autores aconsejan alcalinizar la solución con óxido de magnesio en lugar de sosa cáustica, aduciendo que la magnesia es un álcali menos fuerte que la sosa, pero aun haciéndolo así sigue existiendo la posibilidad de que la ebullición de la solución arrastre una suspensión de magnesio que al reaccionar con el ácido haría falsos los resultados de la titulación del amoniaco.

La solución real y efectiva del problema consiste por lo tanto, en evitar en absoluto que los vapores arrastren gotitas del líquido en ebullición. Para este efecto se usan las conocidas alargaderas o trampas de gotas, formadas por bulbos de forma esférica o cilíndrica con tubos de entrada y salida para el vapor en forma curva o de T, que proyectan el chorro de vapor contra la superficie interior de la trampa, dando lugar a la condensación de las gotitas sobre las paredes de la misma y su eliminación con el líquido de reflujo. Estas trampas presentan el inconveniente de que su eficacia está en relación directa con su superficie, ya que cuanto mayor sea ésta será más efectiva la condensación de gotitas de líquido, pero por otra parte al ser mayor la superficie de las paredes aumenta también el volumen inerte o nocivo del aparato y esto nos obliga a prolongar el tiempo de destilación para la recolección completa del amoniaco y con ello se hace también mayor la cantidad de solución recolectada que, al estar más diluida, dificulta la observación del vire en la titulación final.

Ya hace tiempo se ha conseguido subsanar por completo este inconveniente, introduciendo una trampa sumamente eficiente para las gotas en

el interior del cuello del matraz de destilación, procedimiento que se ha usado también en este estudio.

El dispositivo consta de dos tubos concéntricos de vidrio pyrex; cuyas dimensiones dependen del tamaño del matraz de destilación que se use. Los tres tubos, es decir, el cuello del matraz y los dos tubos de la trampa, deben estar lo más próximos posible para aumentar la velocidad del paso del vapor y dejar el mayor espacio para la parte más importante, C. (fig. 1), en la que van los "anillos de Raschig" que están formados por trozos de un tubo delgado de vidrio, cortados a una longitud igual a su diámetro, con los que se llena por completo el tubo C; estos "anillos" por sus pequeñas dimensiones se colocan irregularmente y de este modo se consigue que el vapor a su paso por el tubo choque con un sin número de superficies. El tubo exterior de la trampa D, está provisto de orificios de 4 mm; F, que sirven para la entrada de vapor y de una pequeña boquilla P, con abertura de 1 mm. en el fondo, para el regreso al matraz de las gotas condensadas.

El vapor sube por el pasaje exterior G, pasa a través de los orificios F, descendiendo por el tubo intermedio H y por último asciende a través de los anillos que llenan el amplio tubo central C, donde, como hemos dicho, se producen innumerables choques antes de que el vapor salga por el tubo E. La pequeña cantidad de líquido condensado regresa al matraz a través de la punta capilar P.

Los ensayos de eficiencia practicados, han demostrado que, usando esta trampa, no pasan ni huellas de hidróxido de sodio al hervir una solución normal de éste con granalla de Zn.

2.—La determinación del amoniaco formado y destilado.

Para evitar que en la destilación del amoniaco formado se pierdan partes de éste, se recibe usualmente en un volumen medido de ácido valorado, introduciendo ligeramente la parte inferior del refrigerante de condensación en el ácido; es cómodo y conveniente alargar para este fin el extremo del refrigerante mediante un tubo estirado (fig. 2).

Conviene agregar al recipiente recolector unas gotas del indicador que debe usarse en esta titulación (rojo de metilo; véase adelante), para observar si se conserva en éste la reacción ácida; por supuesto, si en un momento cercano ya al fin de la operación, llega a establecerse reacción alcalina, esto no implica el peligro de pérdidas de amoniaco, ya que en este momento el volumen recolectado es siempre suficiente para disolver el pequeño exceso de amoniaco que ya no se volatiliza.

La operación se termina retitulando el exceso de ácido o, si se produce un pequeño exceso de amoniaco, titulando inmediatamente éste con la cantidad necesaria del mismo ácido valorado. En cualquiera de los dos casos, las propiedades de la solución exactamente titulada deben corresponder a una disolución de sal de amonio pura (cloruro o sulfato) sin exceso de ácido o amoniaco, ya que el producto que se forma en la retitulación de un exceso de ácido o de sosa (cloruro o sulfato de sodio) es una sal neutra que no influye en la reacción o sea en el pH de la solución final.

Es importante discutir el problema del cual de los indicadores conocidos y recomendados para practicar la titulación, corresponde en sus propiedades a la exigencia de que vire lo más cercano posible al pH de una solución de cloruro de amonio de la concentración aproximada que se obtiene en el proceso descrito. Es de anotar que el único indicador que se ha usado en tiempos pasados para esta titulación es la Heliantina (nombre breve para el anaranjado de metilo), en tanto que se sabe hoy en día que es preferible el rojo de metilo; la indicación que proporcionan algunos autores de que ambos indicadores pueden usarse indistintamente no puede ser correcta ya que entre sus vires hay una diferencia de una unidad entera de pH, de modo que solamente uno de ellos puede ser recomendable. Daremos a continuación las razones por las que este indicador correcto es el rojo de metilo.

El pH que existe en la solución de una sal formada por una base débil con un ácido fuerte depende de la constante de disociación de la base, que se conoce con toda la precisión deseable y, en menor grado, de la concentración de la sal disuelta. Este último factor no es de importancia tan decisiva que la concentración deba conocerse exactamente; es suficiente saberla con la aproximación realizable en nuestro caso.

Las fórmulas que determinan la concentración de iones hidronio y el pH en el caso de referencia son:

$$h = \sqrt{\frac{W \cdot C_s}{K_b}}$$

y por consiguiente:

$$\text{pH} = \frac{1}{2} (\text{p}W - \log C_s - \text{p}K_b)$$

en las que significan respectivamente:

W — el producto de ionización del agua o sea 10^{-14}

$\text{p}W$ — su log negativo o sea 14

K_b — la constante de disociación de la base de referencia que es 1.17×10^{-5} en el caso del amoniaco.

pK_b — su log negativo o sea 4.76

C_s — la concentración molar o lo normalidad de la sal disuelta.

Si al final de la destilación tenemos un volumen de 100 ml. de líquido y si en ellos existe la cantidad de amoniaco correspondiente a 20 ml. de ácido 0.1N neutralizado, tenemos en la solución de titulación en el punto final una concentración de 2×10^{-2} normal igual a N/50; para formarnos un concepto acerca de la variación producida en el pH por diferentes concentraciones de la sal, se indican a continuación los valores del pH que corresponden a la indicada y a concentraciones mayores y menores.

Concentración en cloruro de amonio	N/25	N/50	N/100	N/200
pH	5.31	5.46	5.61	5.76

El rojo de metilo es puramente amarillo en soluciones cuyo pH es mayor de 6.2 y completamente rojo en soluciones cuyo pH es menor de 4.4; de esto se deduce que en todas estas concentraciones indicadas, una sal de amonio con un ácido fuerte colorea al rojo de metilo a un tinte intermedio; la solución N/25 corresponde exactamente al "pH de semi-transformación" del indicador, en el cual la forma amarilla y la roja coexisten en cantidades iguales, en tanto que en las soluciones más diluidas prevalece algo la forma amarilla (en la solución N/100, dos partes de amarillo por una de rojo).

Es erróneo por lo tanto el concepto que se encuentra muchas veces, de que una titulación deba terminarse con el "vire completo" del indicador; en nuestro caso nos hallamos en el punto de equivalencia si el indicador toma un tinte intermedio. Si se retitula un exceso de ácido, la operación puede terminarse tan pronto como se aprecie una transformación notable del rojo al anaranjado (si una gota produce un color puramente amarillo, una parte de esta gota ya significa un exceso de álcali); titulando con ácido puede terminarse la operación tan pronto como se note el primer tinte anaranjado, diferente del amarillo puro que tiene el indicador en solución alcalina.

La zona del pH en la que vira la Heliantina es de 3.1 (rojo) a 4.4 (anaranjado) que al compararse con los pH calculados anteriormente para las distintas concentraciones en cloruro de amonio, nos indica que ninguna de ellas es capaz de iniciar el vire de este indicador y ni siquiera

se logra con una solución normal, que jamás se obtiene en las operaciones que nos ocupan, ya que su pH es de 4.62.

Resalta de esto que usando en esta titulación Heliantina como indicador siempre se gasta un exceso, a veces notable de ácido.

Además, es un fenómeno conocido, que la variación que sufre el pH por adiciones de pequeñas cantidades de ácido o base, tiene su máximo en el punto de equivalencia (se aprovecha esta propiedad para determinar, con precisión extrema, el punto de equivalencia en las determinaciones potenciométricas); por esta razón, el vire de la Heliantina no se obtiene solamente con un volumen incorrecto de reactivo, sino además el cambio de coloración es mucho menos brusco y menos perceptible que con el indicador propio que es el rojo de metilo, que está en el punto de equivalencia.

Algunas veces, en lugar de recibir directamente el amoniaco en un ácido fuerte valorado, se recoge primero en una solución de ácido bórico, para disminuir su volatilidad y se titula después el amoniaco mediante un ácido fuerte. En este caso, como la constante de disociación del ácido bórico es de 6×10^{-10} ($pK_b = 9.22$), se obtiene para una solución saturada de este ácido de concentración aproximadamente 0.5N, un pH de 4.7 y como esta solución se diluye con el destilado el pH sería de 4.9 aproximadamente; éste es algo más bajo que el producido por las concentraciones de las sales de amonio consideradas anteriormente y por lo tanto al titular, usando el rojo de metilo, se puede llegar hasta un color más rojo, pero todavía no hace virar la Heliantina, por lo que su uso sería igualmente incorrecto.

Como este tópico tiene bastante importancia, consideraremos finalmente el caso teórico de que el vire correcto de una titulación, teniendo en cuenta las propiedades de la sal que se forma, fuese exactamente entre las zonas de vire de los dos indicadores, rojo de metilo y Heliantina, o sea un pH de 4.4. En tal caso, es aconsejable usar aquel indicador cuya zona de vire se halle más cercana a la neutralidad, porque el agua, disolvente del compuesto problema, necesita también una cantidad determinada de ácido o álcali para que se produzca un cambio del pH y esta cantidad es tanto mayor cuanto más lejos nos encontremos del punto de neutralidad, lo que quiere decir que aun en este caso, sería más conveniente usar como indicador el rojo de metilo.

Para formarnos una idea de la diferencia que existe en este caso en el empleo de uno u otro de los indicadores citados, basta observar que la solución que consideramos por tener un pH de 4.4 tendría una con-

concentración de iones hidronio de 4×10^{-5} mval/ml (el logaritmo negativo de 10^{-5} es 5 y el de 4 es -0.6 , $\text{pH} = 5 - 0.6 = 4.4$). Si queremos que este valor suba por ejemplo a 4.7, la concentración tendría que ser 2×10^{-5} ($\text{pH} = 5 - 0.3 = 4.7$) lo que quiere decir que será necesario neutralizar la mitad de los iones H^+ presentes por adición de 2×10^{-5} mval/ml de NaOH o sea 0.02 ml de solución 0.1 N por cada 100 ml de solución. Si por el contrario, queremos disminuir el pH de la solución en la misma cantidad, es decir, obtener un pH de 4.1, la concentración de iones hidronio deberá ser en este caso 8×10^{-5} mval/ml ($\text{pH} = 5 - 0.9 = 4.1$) y por lo tanto tendremos que agregar una cantidad de ácido igual a la contenida en la solución o sea 4×10^{-5} mval/ml o 0.04 ml de solución 0.1 N por cada 100 ml. Vemos pues que en el caso estudiado se necesita el doble de cantidad de reactivo si nos alejamos de la neutralidad que si nos acercamos a ella.

Teniendo en cuenta que esta variación de 0.3 en el pH es la variación mínima que se puede observar con seguridad por el cambio de color del indicador, se deduce también de lo anterior la importancia que tiene no emplear un exceso muy grande de ácido, para disminuir los errores que se pueden cometer en la retitulación del mismo. Si suponemos, como lo hemos hecho, que el nitrógeno transformado en amoníaco equivale a 20 ml de solución 0.1N y que el exceso de ácido es de 10 ml, el error posible, empleando el rojo de metilo como indicador, no será mayor de 0.002 ml de solución 0.1 N o sea un 0.01% que puede despreciarse. En este mismo caso, si se emplea como indicador la Heliantina, el error posible sería el doble del indicado. Con un exceso de ácido de por ejemplo 50 ml, los errores posibles serían 5 veces mayores, es decir del 0.05 y 0.1% respectivamente.

METODO DE NESSLER

El uso del reactivo de Nessler para reconocer la presencia de amoníaco en una solución, es ya conocido desde tiempos remotos. Se basa en la formación de un compuesto colorido, en presencia de amoníaco; como la intensidad de color varía según la cantidad de amoníaco existente, la prueba también se usa como determinación cuantitativa. Hoy en día en casi todos los laboratorios existen colorímetros fotoeléctricos con los que esta determinación puede hacerse con gran rapidez y en forma muy precisa y por esto creemos de interés hacer un estudio comparativo

de la facilidad con que pueden practicarse determinaciones según Kjeldahl (destilación) y Nessler (colorimetría) y de sus precisiones relativas.

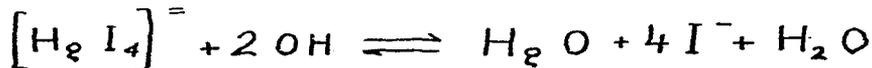
El reactivo de Nessler está formado por el complejo K_2HgI_4 que resulta de la combinación del yoduro potásico con el yoduro mercúrico; en una solución fuertemente alcalina el aion complejo es bastante estable. Varios han sido los métodos empleados hasta la fecha para la preparación de este reactivo. Al principio se partía de yodo elemental y mercurio puro según las siguientes indicaciones:

30 g. de yoduro potásico con 22.5 g. de yodo elemental se disuelven en 20 ml de agua, se agita la solución con 30 g. de mercurio puro, enfriándose de vez en cuando bajo la llave, hasta obtener la decoloración completa. Se deja reposar y se decanta la solución del exceso de mercurio. Debía producir con el almidón un color azul débil (ausencia de yoduro mercurioso); si nó, se tenía que agregar gota a gota solución de yodo en yoduro de potasio.

Se diluye luego a 200 ml y agitando se agregan 975 ml de hidróxido de sodio (en una solución al 10%). Ya bien mezclado se deja reposar y se decanta de cualquier precipitado que pudiera existir.

Actualmente el método se ha simplificado con la existencia del yoduro mercúrico q.p. y el procedimiento aquí utilizado para la preparación de dicho reactivo es:

30 g. de yoduro de potasio se disuelven en 20 ml de agua, se agregan 40.4 g. de yoduro mercúrico y se agita hasta disolución total. Se diluye a 200 ml y se vierte sobre 975 ml de solución al 10% de sosa cáustica. Después de bien mezclado se deja reposar y se decanta. Los precipitados que se forman puede deberse a la reacción reversible:



o a la existencia de huellas de amoníaco en el agua.

Aunque el reactivo produce también coloraciones con aldehidos, alcohol vinílico y compuestos derivados del amoníaco (hexametilentetramina, alcaloides etc.), si para el empleo de este método se hace primero una mineralización esto no puede dar lugar a interferencias.

Su sensibilidad es:

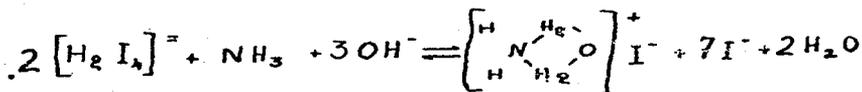
2 ml de solución de Nessler producen coloración con 50 ml de agua que contengan 50 gammas de amoníaco.

En condiciones propias, dilución suficiente, se forma con el reactivo una coloración amarilla, proporcional al contenido de amoníaco.

Si la concentración de éste es exagerada, se forman precipitados de color café-anaranjado, lo que debe evitarse.

La solución del reactivo de Nessler bien preparado, es clara, ligeramente amarillenta y miscible sin alteración con el agua.

Se le atribuye la manera de formarse y la constitución que se indica a continuación:



Se desprende de esta fórmula, como ya se dijo anteriormente, que la reacción es reversible por un exceso de iones yoduro, por lo que, al preparar el reactivo, se deben seguir exactamente los métodos descritos.

El reactivo así preparado se usó en la determinación de las proteínas en las harinas de maíz en lo forma siguiente:

Después de que en la mineralización se llegó al primer aclaramiento, se dejó enfriar el matraz y se diluyó su contenido con agua destilada hasta aforar un volumen de 50 ml; de aquí se tomó un ml y se llevó a 250, con lo que la dilución total es de 2.5 g. de harina mineralizados en... 12,500 ml.

Para determinar el amoníaco, se tomaron 5 ml de la última dilución y se les agregaron 2 ml del reactivo de Nessler; bien mezclados se midió la intensidad del color en el foto-colorímetro.

Es obvio que para esta operación se puede usar cualquier instrumento de sensibilidad suficiente; el aparato usado en este trabajo era un Leitz modelo lumetrón, en el cual el circuito para el foco, formado por un transformador de corriente, se substituyó por un acumulador de tres celdillas, para evitar las variaciones producidas en la intensidad de la luz, por las oscilaciones de voltaje de la red de alumbrado. El filtro usado fué de 415 micromicras, o sea el de color violeta, complementario del color amarillo de la solución por medir.

Para interpretar las medidas de transmisiones obtenidas en el foto-colorímetro, se procede a la construcción de gráficas; en nuestro caso y conociendo el factor de conversión (5.7) de nitrógeno a proteínas del maíz, con el fin de evitar cálculos, la curva se hizo tomando como orde-

nadas las transmisiones y como abscisas las gammas de prótidos/ml correspondientes a aquellas.

Se partió de una solución tipo N/10 en cloruro de amonio y de ella se hicieron las diluciones siguientes:

- a) $0.3 \text{ ml}/100 = 0.42 \text{ mg}/100 \text{ ml} = 4.2 \text{ } \gamma \text{ N/ml} = 21.94 \text{ } \gamma \text{ Prótidos/ml}$
- b) $0.1 \text{ ml}/50 = 0.14 \text{ mg}/50 \text{ ml} = 2.8 \text{ } \gamma \text{ N/ml} = 15.96 \text{ } \gamma \text{ Prótidos/ml}$
- c) $0.1 \text{ ml}/100 = 0.15 \text{ mg}/100 \text{ ml} = 1.4 \text{ } \gamma \text{ N/ml} = 7.98 \text{ } \gamma \text{ Prótidos/ml}$
- d) $0.1 \text{ ml}/250 = 0.14 \text{ mg}/250 \text{ ml} = 0.56 \text{ } \gamma \text{ N/ml} = 3.19 \text{ } \gamma \text{ Prótidos/ml}$

De cada una de estas diluciones se tomaron 10 ml y se les agregó 2 ml. de Nessler midiéndose entonces las transmisiones correspondientes:

- a) 15.5% b) 33.0% c) 51.5% d) 63.0%

Como al añadir los 2 ml de Nessler se produce una nueva dilución, hay que tener en cuenta este nuevo factor para expresar las gammas reales de prótidos que existen en cada ml y que serán:

$$\frac{21.94 \times 12}{10} = 26.4 \text{ } \gamma \text{ de pr\u00f3tidos/ml} \quad \text{dil a)}$$

$$\frac{15.96 \times 12}{10} = 19.1 \text{ } \gamma \text{ de pr\u00f3tidos/ml} \quad \text{dil b)}$$

$$\frac{7.98 \times 12}{10} = 9.6 \text{ } \gamma \text{ de pr\u00f3tidos/ml} \quad \text{dil c)}$$

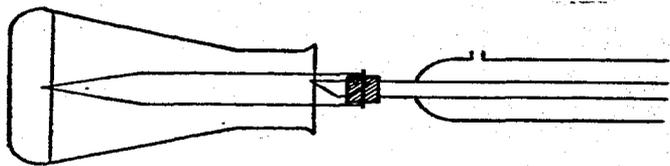
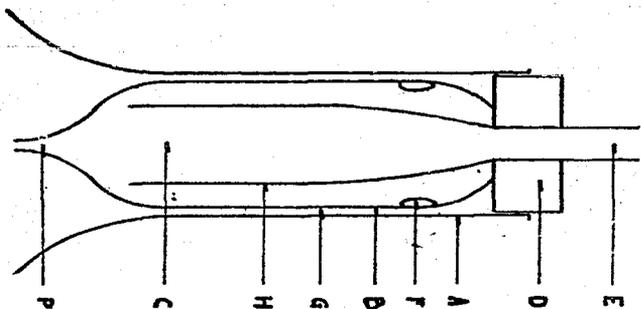
$$\frac{3.19 \times 12}{10} = 3.8 \text{ } \gamma \text{ de pr\u00f3tidos/ml} \quad \text{dil d)}$$

b) Comparación de resultados obtenidos.

Pesada gramos	Datos observados Kjeld ml	Nessler % trans	Datos calculados Kjeld % protéidos	Nessler
1.6045	15.6	46.2	7.7	9.2
1.4321	14.4	49.3	8.0	8.4
1.2560	11.6	55.1	7.4	7.4
1.3472	13.7	44.0	8.1	9.7
1.3516	12.9	53.9	7.6	7.4
1.4825	14.3	53.2	7.7	7.6
1.8219	16.0	51.5	7.0	7.9
1.1346	12.5	48.1	8.8	8.8
1.7582	16.7	54.6	7.6	7.2
1.5334	16.7	50.0	8.7	8.3
1.3285	13.8	46.0	8.3	9.2
1.5427	16.8	49.2	8.7	8.5
1.7492	17.8	51.8	8.1	8.0
1.6520	16.6	47.6	8.0	8.0
1.9085	18.4	49.0	7.7	8.5
1.3548	13.6	44.2	8.0	9.7
1.4993	14.3	53.2	7.6	7.6
1.7698	16.9	53.2	7.6	7.6
1.6521	15.3	50.8	7.4	8.1
1.5433	15.3	49.2	7.9	8.5

Pesada gramos	Datos Kjeld ml	observados Nessler % trans	Datos calculados Kjeld % próticos	Nessler
1.5548	16.0	45.3	8.2	9.4
1.6732	18.2	45.0	8.7	9.5
1.3928	14.5	46.0	8.3	9.2
1.7654	16.6	50.0	7.5	8.3
1.8972	17.9	50.0	7.6	8.3
1.5021	14.1	48.8	7.5	8.4
1.7324	16.1	51.4	7.4	8.0
1.6222	15.7	50.9	7.7	8.2
1.9355	17.2	54.6	7.1	7.2
1.4207	15.1	46.6	8.5	9.1
1.3928	14.3	49.2	8.2	8.4
1.7217	17.5	50.0	8.1	8.3
1.6650	16.9	51.8	8.1	8.0
1.2966	13.0	47.6	8.0	8.6
1.3301	14.3	47.9	8.6	8.9
1.5432	15.9	43.9	8.2	9.7
1.6011	17.3	47.8	8.6	8.8
1.8244	17.1	51.5	7.5	7.9
1.4460	14.3	50.8	7.9	8.1

Las pesadas corresponden al Kjeldahl. El Nessler se hizo en todos los casos con 2.5 g. de harina.



CAPITULO CUARTO

CONCLUSIONES

1.—Se describe una modificación a la técnica de mineralización de la sustancia orgánica, que es usual en el método de Kjeldahl, que consiste en el empleo adicional de ácido perclórico, obteniéndose con ello resultados que concuerdan con los del método original.

2.—Se desarrolla un nuevo procedimiento para determinación de proteínas, basado en la mineralización por el método de Kjeldahl modificado, seguida de la nesslerización para cuanteo del nitrógeno. Se aplica el procedimiento a la determinación de proteínas en harinas de maíz y se comparan los resultados obtenidos por esa técnica con los que da la aplicación del método de Kjeldahl, observándose su concordancia.

CAPITULO QUINTO
BIBLIOGRAFIA

- 1.—*F. L. Han.*
Z. f. Anal. Ch. 61 (1922) 51
Anal. Ch. 19 1947) 811
- 2.—*E. Kahane*
L'action de l'Acide Perchlorique, sur les matières organiques
et ses applications a la chimie analytique Hermann & Cie.,
Editeurs. Paris 1934. Tomos I y II.
- 3.—*E. V. Zappi.*
Tratado de Química Orgánica.
Tomo I. Parte 1ª
- 4.—*Marjorie R. Mattice. A. B., Sc. M.*
Bridges' Food and Beverage Analyses.
3ª edition Philadelphia 1950
- 5.—*Snell & Snell.*
Colorimetric Methods of Analysis.
Vol. II 2ª Printing. New York 1937.
- 6.—*Methods of Analysis of the*
Association of Official Agricultural Chemists
6ª Edition 1945 Washington. D. C.