

FACULTAD DE QUIMICA "BERZELIUS" - U. I. A.  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

---

ESTUDIO DE UN METODO FOTOCOLORIMETRICO  
PARA ANALIZAR PROTEINAS EN  
HARINAS DE TRIGO

TESIS  
QUE PARA EL EXAMEN PROFESIONAL DE  
QUIMICO  
presenta  
MARIA ESTHER DEL REY LEÑERO

MEXICO, D. F.

1958



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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 adorados Padres.**  
con inmenso cariño y gratitud y  
a quienes debo todo cuanto soy.

**A mis hermanos.**  
con fraternal cariño.

**A mis maestros,  
con profundo agradecimiento  
por sus sabias enseñanzas.**

**A Don Luis Verca,  
Director de mi querida Facultad  
de Química "Marcelus"  
con respeto y gratitud.**

**Al R. P. Marcelo Izaguirre, S. J.  
con mi estimación y reconocimiento.**

**Al Sr. Ing. Vicente San José,  
por su valiosa y desinteresada  
dirección de este trabajo.**

**ESTUDIO DE UN METODO FOTOCOLORIMETRICO  
PARA ANALIZAR PROTEINAS  
EN HARINAS DE TRIGO**

**CONTENIDO.**

- CAPITULO I** — Importancia del análisis de proteínas en las harinas de trigo.
- CAPITULO II** — Exposición del método de Doyle C. Ddy.
- CAPITULO III** — Comparación de los resultados obtenidos con este método y con el de Kjeldahl.
- CAPITULO IV** — Conclusiones.
- CAPITULO V** — Bibliografía.

## CAPITULO I

### IMPORTANCIA DEL ANALISIS DE PROTEINAS EN HARINAS DE TRIGO

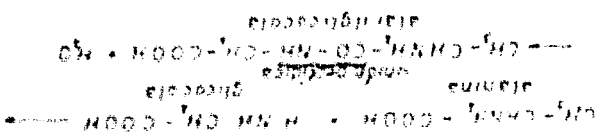
La alimentación, tanto de los seres humanos como de los animales, está constituida por glúcidos, lípidos, proteínas, sales minerales, agua y vitaminas. De este grupo de sustancias las proteínas desempeñan un papel muy importante, ya que están formando parte de todas las células vivas, siendo su metabolismo la señal más definida de la vida. Se les encuentra como constituyentes de las diastasas, lo mismo que de algunas hormonas, entre las que se encuentran la paratirina y diversas hormonas hipofisarias como la insulina.

Desde hace mucho tiempo se ha llamado proteínas a este grupo de sustancias (Frutos primeros), ya que se cree que son el origen de la vida.

Las proteínas se encuentran siempre en estado coloidal, debido a que el tamaño de sus moléculas alcanza el de las micelas (0.1 a 0.001 $\mu$ ), permitiendo así que se efectúen los cambios intercelulares. Son los vehículos que transportan el agua al organismo.

Por lo general, las proteínas están formadas de carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno; pero también pueden contener azufre o fósforo; otras contienen hierro, como la hemoglobina. Estas sustancias tienen un peso molecular sumamente elevado, así se ha encontrado para la ovalbumina 34000 y para la hemoglobina 68000, otros protidos complejos tienen pesos moleculares que se expresan por millones.

Gracias a los trabajos de Fisher se ha llegado a conocer la constitución de las proteínas. Por medio químicos o por la acción de ciertas enzimas hidrolizan dando lugar a sustancias cada vez menos complicadas como son las proteínas, peptonas



Los aminoácidos son ácidos orgánicos que tienen grupos amino (NH<sub>2</sub>) y grupos carboxílicos (COOH), teniendo por lo tanto propiedades ácidas y básicas, a esto se debe que se unen entre sí formando así una unión peptídica, como ejemplo una molécula de agua en cada unión de un grupo carboxílico con un amino y formando así una unión peptídica, como ejemplo

Y pesar de que no se conocen las fórmulas exactas de estas sustancias se sabe que están constituidas por la unión de estas

3.—Reacción de Millon.—Se produce al agregar a una proteína el reactivo de Millon, que es una mezcla de nitrato mercurioso / nitrato mercurioso en presencia de ácido nítrico y nítrico, la solución hervida con una pequeña cantidad del reactivo produce un precipitado rojo o anaranjado.

2.—Reacción de Biuret.—Esta reacción se origina al calentarse una solución que contiene la proteína, según la clase de proteína de que se trate. goma de solución diluida de sulfato de cobre, se produce una coloración que varía de rosa a morada, según la clase de proteína.

1.—Reacción xantoprotéica.—Para producirse se añade a la sustancia albuminosa ácido nítrico, formando un color que tiene un color amarillento, el cual se puede oscurecer agregando una gota de yodo.

Las proteínas se identifican por ciertas reacciones características entre las que se encuentran la coagulación por el calor, por los ácidos o por el alcohol, se conocen además algunas reacciones coloradas como son

polipéptidos y aminoácidos. El método general de Fisher consiste en tratar a las proteínas con una cantidad de ácido clorhídrico igual al triple de su peso, durante 5 ó 10 horas, hasta que la reacción de Biuret sea negativa e identificar después los aminoácidos que se originan. Los aminoácidos y los polipéptidos se llaman sustancias abituréticas porque no dan la reacción de Biuret.

Fisher estudió el problema de la constitución de las proteínas en su aspecto sintético, consiguiendo preparar a partir de aminoácidos sencillos, polipéptidos complejos similares a las proteínas naturales, que se originan por hidrólisis parcial de las proteínas.

De la misma manera que en los vegetales se forma almidón a partir de agua y anhídrido carbónico por acción de los rayos solares es probable que las distintas proteínas se originen del agua, anhídrido carbónico y los nitratos y nitritos.

El organismo no es capaz de sintetizar de esta manera a las proteínas, por lo que las toma ya elaboradas. Mediante el proceso digestivo las proteínas sufren una serie de simplificaciones en su complicada molécula, dando lugar a productos cada vez más sencillos como acidalbúmina o alcalialbúmina, proteosas, peptonas, polipéptidos y aminoácidos; por medio de esta hidrólisis enzimática se realiza la absorción de los aminoácidos, que en esta forma llegan a la sangre.

Cuando los aminoácidos llegan a las células, parte de ellos son absorbidos directamente y usados en las síntesis de las proteínas de las células de los tejidos vivos, que reemplazan a los que normalmente se gastan en el complicado proceso catabólico; otras van al hígado donde sufren un proceso de desaminación, que consiste en la separación del nitrógeno que forma parte de las moléculas para dar lugar a la formación de amoniaco, que se une al ácido carbónico para dar urea, que es excretada por el riñón; esta es la forma de eliminación del nitrógeno ingerido.

El aprovechamiento de los prótidos en los seres vivos es de primordial importancia, ya que mediante él se reponen las pérdidas que la célula sufre constantemente; y además porque desempeñan una función energética.



## CLASIFICACION DE LAS PROTEINAS.

Las proteínas se clasifican de acuerdo con sus propiedades físicas; estas clasificaciones varían según los autores. En el Jones indica la clasificación inglesa que es la siguiente:

### 1.—PROTEINAS SIMPLES

- a) Protaminas
- b) Histonas
- c) Globulinas
- d) Albúminas
- e) Glutelinas (gluteninas)
- f) Gliadinas (Protaminas solubles en alcohol al 80%, insolubles en agua: gliadina)
- g) Escleroproteínas (Forman la estructura esquelética de los animales)
- h) Fosfoproteínas

### 2.—PROTEINAS CONJUGADAS.

- a) Cromoproteínas
- b) Nucleoproteínas
- c) Glucoproteínas

### 3.—PROTEINAS HIDROLIZADAS.

- a) Metaproteínas.
- b) Alburcitos o proteosos
- c) Peptonas
- d) Polipeptidos.

En el trigo se han identificado cinco proteínas distintas:

- 1.—Una albúmina
- 2.—Una proteosa
- 3.—Una prolumina (gliadina)
- 4.—Una glutelina (glutenina)
- 5.—Una globulina

La albúmina, proteosa y globulina se encuentran en pequeñas cantidades. La albúmina (aproximadamente 0.3% del trigo) y la globulina (0.6 a 0.7%) pueden extraerse mediante soluciones salinas diluidas. La proteosa (0.3%) se puede formar por degradación de las otras, durante el proceso de extracción.

En el trigo la gliadina se encuentra en una proporción de 4% (dependiendo de la cantidad total de proteínas). La gliadina se extrae fácilmente con alcohol de 70%.

Las proteínas del trigo no se encuentran distribuidas uniformemente en el grano; el salvado y el germen son más ricos que el endospermo. Este factor se ha tomado mucho en cuenta en los países europeos, donde se consume pan elaborado con trigo entero o pan integral, que tiene un poder nutritivo mucho mayor, pero desgraciadamente en muchos otros países, México entre ellos, existe la tendencia a consumir "pan blanco", elaborado con harina llamada "flor", la cual ha sido despojada de su salvado y de su germen, perdiendo así gran parte de su contenido proteico.

La harina es un producto sumamente fino e impalpable, libre de impurezas, que proviene del endospermo del grano; se obtiene como producto de la molenda del trigo, seguida de tamizado. Entre sus principales constituyentes se encuentran las proteínas, las cuales deben estar presentes en una cantidad adecuada, ya que de ellas depende tanto el valor nutritivo del pan, como su estructura, aproximadamente la harina contiene del 8 al 13% de proteínas.

Las proteínas de la harina son responsables de que al ponerse ésta en contacto con el agua se forme el gluten.

La harina contiene principalmente dos proteínas: La glutelina y la gliadina; ambas se combinan al formarse la masa y forman una nueva proteína, el gluten, que se encuentra en la masa, pero no en la harina.

La masa está formada por partículas de almidón y de proteínas, recubiertas por una fina película de agua; las fuerzas de tensión superficial de esas películas, unen entre sí a las partículas de almidón y también contribuyen a unir las partículas de proteínas.

La glutenina y la gliadina deben encontrarse en la proporción de 1 a 3, en la cual el gluten adquiere propiedades muy especiales para la panificación.

La gliadina da expansión al pan y la glutenina le dará la fuerza necesaria para conservarlo. Además la glutenina comunica solidez al gluten, y la ligazón entre gluteninas y gliadinas se debe a esta última.

Las harinas de bajo contenido de proteínas no son satisfactorias para la elaboración del pan. Las características generales y en especial la naturaleza coloidal de las proteínas, determinan las principales propiedades de la harina con vistas a la panificación.

Así resulta la enorme importancia que tiene la determinación de proteínas en la harina, al grado de que en algunos países, el valor comercial del trigo varía con respecto al porcentaje de proteínas.

La mayoría de los métodos que se conocen para la determinación de proteínas, se basan en la conversión de los compuestos orgánicos del nitrógeno en sales minerales de amonio, seguidas del cuanteo de este último.

Esta es la base del método de Kjeldahl, que se trata ampliamente en el capítulo III. Este método presenta los inconvenientes: 1o —del molesto desprendimiento de gases al mineralizar la materia orgánica y 2o —La lentitud de la operación, que generalmente dura de dos a tres horas y el excesivo cuidado que debe tenerse durante la misma.

A base del amoníaco encontrado se calcula la cantidad de proteínas que le corresponden, mediante el uso de factores empíricos que difieren para cada clase especial de alimentos. Estos factores se han calculado partiendo de los correspondientes contenidos de nitrógeno de las proteínas, que varían entre el 15 y el 17.6%. Para el caso particular del trigo, Keat Jones indica que para convertir el porcentaje de nitrógeno de la harina y del trigo a proteínas puede usarse el factor 5.7, sin embargo Breeze Jones duda que sea correcto.

Existe un método llamado "Método Dumas", de combustión, para determinar el nitrógeno en materiales orgánicos y es

más exacto. Consiste en quemar la sustancia en un tubo de combustión ordinario en ambiente de oxígeno y recoger sobre una solución concentrada de hidróxido de potasio los gases desprendidos. los cuales están formados por anhídrido carbónico, vapor de agua y nitrógeno; el primero es absorbido en potasa, el agua se condensa y el nitrógeno se mide voluméticamente. Este método es muy exacto, pero requiere un tiempo de trabajo de dos a tres horas y necesita una vigilancia continua en todas sus fases.

El objeto del presente trabajo consiste en efectuar un estudio sobre el método propuesto en Estados Unidos por el químico Doyle C. Udy, en el Depto. de química agrícola perteneciente a la Estación de Agricultura Experimental de Pullman, Washington; para la determinación fácil y rápida del contenido de proteínas en trigo o harinas de trigo. Este método se basa en la reacción que se efectúa a pH comprendidos entre 2 y 3 entre los grupos sulfónicos ácidos disociados del colorante anaranjado "G" y los grupos básicos de las moléculas de proteínas, para formar un complejo colorido e insoluble con ellas.

Este método reduce el tiempo de operación a 25 minutos, no requiere excesiva vigilancia mientras se efectúa la reacción, evita el molesto desprendimiento de gases y la destilación; además de que el procedimiento seguido es sumamente sencillo.

## CAPITULO II

### EXPOSICION DEL METODO DE DOYLE C. UDY.

El método propuesto por Doyle C. Udy está basado en la reacción que tiene lugar entre los grupos básicos de las moléculas de las proteínas del trigo y los grupos sulfónicos ácidos del colorante anaranjado G, a un pH de 2.2, para formar un complejo insoluble y colorido. La cantidad de materia colorante que reacciona con un gramo de muestra puede usarse para determinar el contenido de proteínas en trigo o harina de trigo.

El anaranjado G es un colorante azoico, de carácter ácido, soluble en agua, cuya fórmula corresponde a la unión de la diazoanilina con el ácido 2 naltol disulfónico y es la siguiente:



Acido 2 naltol; 6.8. disulfónico; 3 diazoanilina.

Este colorante se usa después de secarlo a 80° C; con él se prepara una solución que contenga 1 mg. de colorante por ml. de solución a 20 C, a esta solución se agregan 1.25 ml. de solución alcohólica de timol al 1% por litro de solución para evitar la precipitación del colorante y se ajusta a un pH de 2.2 con reactivo Buffer de Mc Ilvaine (cuya preparación se detalla en el capítulo III)

Las soluciones del colorante son sumamente estables y siguen la ley de Beer, es decir:

La intensidad de la luz transmitida a través de una solución colorada, está afectada por un cambio en la concentración ó en el espesor del material absorbente

## METODO SEGUIDO PARA HARINAS DE TRIGO

Se pesan muestras de un gramo y se colocan en tubos de ensayo, se les añade, con una pipeta graduada, un exceso conocido de solución colorante ajustada a un pH de 2.1. Después de la adición de la solución colorante, se tapán los tubos con tapones de polietileno y se agitan con un agitador mecánico durante 15 min., hasta que la reacción entre los grupos catiónicos de las moléculas de proteínas y los grupos aniónicos del colorante sea completa.

El complejo colorado e insoluble, formado con las proteínas y el colorante, y demás compuestos insolubles de la harina, se separan de la solución centrifugación a 4000 r. p. m. durante 5 min., hasta obtener un líquido sobrenadante claro, que contiene al colorante que no reaccionó.

La cantidad de colorante que entró en la reacción se determina por diferencia, restando del exceso de colorante añadido, el colorante no usado en la reacción.

Para determinar la concentración del colorante no usado que quedó en la solución sobrenadante se emplea un fotocolorímetro Evelyn (en este caso se usó un espectrofotómetro Beckman, cuyo galvanómetro sensible da lecturas que indican hasta décimas del % de transmisión).

La cantidad de colorante no usado puede conocerse si se tiene el % de transmisión por medio de una gráfica previamente construida que relacione la concentración del colorante no usado en función del % de transmisión.

Los mg. de colorante usado por gramo de muestra se calculan de la siguiente relación que da la diferencia entre el colorante añadido y el colorante que no reaccionó, divididos entre el peso de la muestra:

$$B = \frac{V \text{ Co-VC}}{W}$$

en donde:

B — mg. de colorante usado.

V — ml. de colorante añadido.

Co — Concentración de la solución del colorante añadido.

C — Concentración de la solución del colorante no ligado.

W — Peso de la muestra.

Como se usa un gramo de muestra y el volumen es constante:

$$B = V(\text{Co}-\text{C})$$

Con este dato se construye una gráfica que relaciona el % de proteínas determinado por el método de Kjeldahl con los mg. de colorante usados en la reacción.

Con estas gráficas se puede obtener fácil y rápidamente el % de proteínas en una harina sin necesidad de seguir el método de Kjeldahl, determinando:

1.—La concentración de colorante no usado.

2.—Los mg. de colorante usado, con los cuales se leerá directamente el % de proteínas en una gráfica o tabla previamente construida.

## CAPITULO III

### COMPARACION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS CON ESTE METODO Y CON EL DE KJELDAHL

El objeto de este capítulo es establecer una relación entre el porcentaje de proteínas determinadas por el método de Kjeldahl y los miligramos de colorante usada por gramo de muestra; con este propósito se han hecho determinaciones por ambos métodos del contenido de proteínas de varias muestras de harina de diferentes tipos cuyos porcentajes proteicos varían ( ) el 7.55 y 13.55% (en base seca)

Las determinaciones por el método Kjeldahl se hicieron por duplicado muy cuidadosamente y se verificaron tantas veces como fué necesario para que el error no fuera mayor que el 0.1%; de la misma manera las lecturas del espectrofotómetro se verificaron hasta obtener lecturas constantes en cada determinación.

### DISCUSION TEORICA

#### a) METODO KJELDAHL —

Este método está basado en la conversión de los compuestos orgánicos de nitrógeno en sales minerales de amonio el cual se cuantifica posteriormente.

A base del amoniaco encontrado se calcula el contenido de nitrógeno y de éste se deduce la cantidad de proteínas que



le corresponden, mediante el uso de factores empíricos que difieren para cada clase especial de alimentos. Estos factores se han calculado partiendo de los correspondientes contenidos de nitrógeno de las proteínas que varían entre el 15 y el 17.5%. Para el caso particular del trigo Kent Jones indica que para convertir el porcentaje del nitrógeno de la harina y del trigo a proteínas puede usarse el factor 5.7.

El método Kjeldahl puede dividirse en dos fases:

- 1.—Mineralización de la materia orgánica
- 2.—Valoración del sulfato de amonio formado

## **MINERALIZACION DE LA MATERIA ORGANICA**

Esta fase consiste en efectuar una destrucción de la materia orgánica por la acción del ácido sulfúrico y el calor en presencia de catalizadores para acelerar la reacción, en la cual se forma sulfato de amonio, esta fase puede dividirse en dos partes:

### **1.—Carbonización de la materia orgánica.**

En esta fase se separa el grupo amoniacal ( $\text{NH}_2$ ), formándose se amoníaco que reacciona con el ácido sulfúrico formando sulfato de amonio, no hace falta añadir reductores en esta fase, pues la descomposición de la materia orgánica libera un exceso de hidrógeno que actúa con en presencia del ácido sulfúrico concentrado y caliente que es un fuerte oxidante.

### **II.—Destrucción del resto de materia orgánica.**

En esta parte se efectúa una segunda oxidación mucho más enérgica, en la cual el carbono y el hidrógeno forman anhídrido carbónico y agua respectivamente que se desprenden, mientras que el nitrógeno se mantiene en forma de sulfato de amonio.

## **VALORACION DEL SULFATO DE AMONIO FORMADO**

Esta fase de la reacción también puede dividirse en dos partes:

## I.—Destilación del amoníaco.

La destilación del amoníaco consiste en tratar el producto resultante de la mineralización con un exceso de un álcali fuerte, con objeto de producir el desprendimiento del amoníaco, que se destillará y condensará en un refrigerante, recogiénndose en una solución valorada de ácido tartárico o sulfúrico.

Durante la destilación deben tenerse en cuenta las siguientes producciones:

1.—La solución alcalina debe añadirse cuando el producto mineralizado este completamente frío; es aconsejable colocar el matraz sobre hielo.

2.—La adición de la solución alcalina debe hacerse muy cuidadosamente, resbalándose por las paredes del matraz, para que se forme una capa superior ácida y una inferior alcalina y prevenga un desprendimiento de amoníaco antes de que esté colectado el aparato de destilación.

3.—La mezcla anterior, por ser fuertemente alcalina tiende a hervir tumultuosamente, por lo que es conveniente regular la ebullición durante la destilación. Esto se logra mediante la adición de polvo de zinc, ya que éste, en presencia del álcali produce hidrógeno que mantiene tranquila la ebullición.

4.—La cantidad de solución alcalina que debe agregarse para obtener un medio fuertemente básico se calcula titulando un mililitro del ácido usado para mineralizar, con una dilución de la solución concentrada del álcali que va a usarse y relacionar esta cantidad con los mililitros de ácido empleados; de este modo se sabe la cantidad de lejía que es necesario agregar, debe considerarse además un exceso de álcali.

5.—Para evitar arrastres de álcali por el vapor de agua debe usarse una trampa Kjeldahl (atajagadera) que hace que los líquidos sean detenidos, dejando pasar solamente el amoníaco desprendido.

6.—Las conexiones del aparato deben estar perfectamente ajustadas para evitar pérdidas de amoníaco; es conveniente alargar la parte inferior del refrigerante que va a penetrar dentro del ácido, mediante un tubo de vidrio entrado.

7.—La destilación debe prolongarse por cuarenta minutos más o menos, hasta que una gota del destilado no de reacción básica al papel tornasol, conviene añadir al recipiente receptor unas gotas del indicador que se usará en la titulación (rojo de metilo) para asegurar que se concentre en éste la reacción ácida y en caso que en un momento cercano al final de la operación se le pare a la neutralidad o basicidad poder corregir más ácido si fuera necesario sin peligro de pérdidas de amoníaco, ya que en ese momento el volumen recobrado es suficiente para disolver el pequeño exceso de amoníaco que ya no se volatiliza.

8.—Terminada la operación debe quitarse primero el matraz donde se está recogiendo el destilado y después el mechero con el que se estaba calentando, para evitar que haya reabsorción.

9.—El refrigerante debe lavarse bien con agua destilada, la cual se recoge en el mismo matraz donde se recogió el destilado.

## II.—Valoración del amoníaco destilado.

El amoníaco procedente de la destilación se recoge en un exceso de ácido valorado, éste se calcula suponiendo que en la muestra tratada existe el máximo posible de proteínas; terminada esta operación se titula el exceso de ácido con una solución valorada (0.1 N generalmente) de NaOH usando como indicador rojo de metilo.

Se usa rojo de metilo en esta reacción como indicador porque en ella se forma cloruro de amonio, que es una sal fuertemente ionizada, pero en tanto que el ion cloruro no tiende a formar ácido clorhídrico con los iones  $H^+$  del agua, el ion amonio si forma con los iones  $OH^-$  del agua moléculas no disociadas de amoníaco, dando por resultado que habra un excedente de iones  $H^+$  los cuales imparten a la solución reacción ácida, este fenómeno hidrolítico es suficiente que la solución tenga un pH ácido a pesar de que las cantidades de ácido y base que reaccionaron fueren equivalentes.

El cloruro o sulfato de sodio formados en la titulación del

exceso de ácido no influyen en el pH de la solución final ya que el cloruro de sodio es una sal neutra.

La variación producida en el pH a diferentes concentraciones de cloruro de amonio está comprendida entre 5.31 para una solución 0.25N y 4.76 para una solución 0.005N. El rojo de metilo es amarillo en soluciones cuyo pH es mayor de 6.2 y completamente rojo en soluciones cuyo pH es menor a 4.4; de aquí se deduce que éste es el indicador adecuado porque su color de transición se encuentra alrededor de un pH 5 que es el pH en el cual se neutralizan los iones cloruro  $\text{Cl}^-$ . Una vez calculado el % de  $\text{N}_2$  se calcula el % de proteínas, multiplicando el %  $\text{N}_2$  por el factor 5.7

$$\% \text{ P} = \% \text{ N}_2 \times 5.7$$

A este método se le han efectuado algunas modificaciones para tratar de simplificarlo, algunas de ellas reducen la primera fase o sea la mineralización y algunas otras la destilación del amoníaco.

Para simplificar la primera fase del método de Kjeldahl se ha ensayado el uso de catalizadores, siendo los más usados el mercurio, óxido de mercurio, los sulfatos de cobre o hierro y el selenio o su óxido.

También se ha ensayado el uso de otros oxidantes en unión con el  $\text{H}_2\text{SO}_4$  para que se efectue una reacción más rápida y energética, entre ellos tenemos el persulfato de sodio, agua oxigenada, o ácido perclórico.

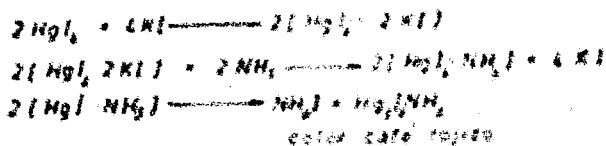
El Dr. Ernesto Kahane estudió e indicó las condiciones bajo las cuales el uso del ácido perclórico como oxidante en este tipo de reacciones no implica peligros.

Encontró que efectuando primero una desintegración de la materia orgánica con ácido sulfúrico o nítrico seguida de una oxidación completa con ácido perclórico no se producían explosiones (en este caso no puede usarse ácido nítrico). Esta simplificación reduce el tiempo de mineralización a veinte minutos.

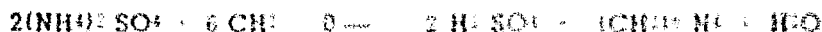
Entre las simplificaciones hechas a la segunda fase del método de Kjeldahl o sea a la destilación del amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) se tienen los métodos de Nessler y Rouleau.

El método Nessler mide colorimétricamente la cantidad de

amoníaco formado. Como reactivos usa yoduro de potasio y yoduro mercúrico que con el amoníaco dan un complejo colorido mediante la siguiente reacción.



El método Ronchest se basa en la reacción que se produce cuando se trata una sal de amonio, en este caso sulfato de amonio, en un medio completamente neutro, con una solución de formol también neutralizado, en dicha reacción se forma ácido sulfúrico, que equivale cuantitativamente a la sal de amonio, y ureotropina



El producto resultante de la mineralización se neutraliza exactamente con ácido clorhídrico empleando como indicador fenolftaleína, se alota y se toma una parte alícuota, a la que se agregará una solución al 25% de formol, neutralizando de la misma manera, el ácido formado se titula con solución valorada de hidróxido de sodio.

El método empleado en este estudio para harinas de trigo usa en la mineralización de la materia orgánica los ácidos sulfúrico y perclórico, este último destruye al carbón formado en la primera fase de la reacción o sea el tratamiento con ácido sulfúrico y oxida al resto de materia orgánica

### REACTIVOS USADOS.

- 1.—Acido sulfúrico densidad 1.98
- 2.—Acido perclórico de 70-75%
- 3.—Solución concentrada de NaOH (50%).
- 4.—Solución de ácido clorhídrico 0.1 N
- 5.—Solución de Hidroxido de sodio 0.1 N
- 6.—Indicador rojo de metilo 0.1 g de indicador en 50 ml de alcohol y diluir con 40 ml de agua.

## MATERIAL

- 1.—Matraz Kjeldahl.
- 2.—Trampa de Kjeldahl.
- 3.—Refrigerante.
- 4.—Bureta.
- 5.—Vasos, erlenmeyer, probetas, pipetas, mechero, etc. (material usado comunmente).

## PROCEDIMIENTO

Se pesan muestras de 25 g y se colocan cuidadosamente en un matraz de Kjeldahl si es posible con ayuda de un papel satinado para que no se peguen partículas de harina al cuello del matraz; se agregan 25 mililitros de ácido sulfúrico concentrado, se calienta hasta completa carbonización de la materia orgánica, aproximadamente quince minutos, se observa que ya se ha carbonizado porque se obtiene una pasta negra semiliquida.

El matraz de Kjeldahl es de un material Pyrex, muy grueso para que resista temperaturas elevadas como la del ácido sulfúrico concentrado y caliente; tiene un cuello muy alargado para proveer un mejor reflujó; durante el calentamiento debe colocarse inclinado para que las proyecciones de la sustancia contenida en el matraz no alcancen a salir de éste y para que se efectúe una condensación de los gases mejor, ya que el calor del mechero no llega hasta el cuello del matraz.

Una vez efectuada la carbonización de la materia orgánica se deja enfriar el matraz, después de lo cual se agregan 5 ml. de ácido sulfúrico y 5 ml. de ácido perclórico y se vuelve a calentar muy suavemente observando que la pasta semiliquida negra se va diluyendo y cambiando a color café rojizo, luego a rojo, anaranjado, amarillo e incoloro; en este momento debe suspenderse el calentamiento, pues si se continúa calentando la solución vuelve a adquirir un color amarillo intenso decolorándose luego definitivamente, lo que ocasiona resultados bajos en nitrógeno. La aparición de éste nuevo color, según el Dr. Kahane puede deberse a la existencia de compuestos orgánicos

simples solubles en ácido sulfúrico, que solo se destruyen mediante una nueva carbonización y oxidación; quizá en esta nueva reacción el ácido perclórico forme con la materia orgánica óxidos menores de cloro que con el amoníaco dan compuestos de sustitución inestables que se descomponen formando nitrógeno elemental que ocasiona los resultados bajos en el cuantico.

La muestra así tratada ya se ha mineralizado se deja enfriar y se diluye con agua destilada en cantidad doble de su volumen, como al diluir se vuelve a calentar se calienta nuevamente, se coloca hielo durante unos minutos y enseguida se van resbalando por las paredes del Kjeldahl y procurando que no se mezclen con el líquido contenido en el matraz, 60 ml. de solución concentrada de hidróxido de sodio. Se conecta el tapón que mediante un tubo lo une a la trampa Kjeldahl y luego al refrigerante, el cual desemboca sobre un etienmeyer que contiene 40 ml. de una solución 0.1 N de HCl y 2 gotas de rojo de metilo. Se agita el matraz de Kjeldahl para que se mezclen las dos soluciones y se calienta para que empiece la destilación, que se prolonga durante 40 minutos, al final de los cuales se retira el matraz donde se ha recolectado el destilado y se termina la operación retirando el mechero y desconectando el aparato.

El refrigerante se enjuaga con agua destilada que se recoge sobre el matraz de recolección y se procede a titular con solución 0.1 N de NaOH. El % de proteínas se obtiene mediante la siguiente ecuación:

$$\% P = \frac{(40-A) \times 0.01 \times 0.014 \times 100 \times 5.7}{2.5}$$

- A = ml. de NaOH que neutralizaron el exceso (40 ml.) de ácido clorhídrico 0.1 N  
 0.1 = Normalidad de la solución de NaOH  
 0.014 = Miliequivalente del nitrógeno  
 5.7 = Factor de conversión de nitrógeno a proteínas.  
 2.5 = Peso de la muestra

Si llamamos C a los ml. de ácido clorhídrico 0.1 N que neutralizaron al amoníaco desprendido

$$C = 40 - A$$

tendremos que:

$$\% P = C \times 0.3192$$

Los resultados se indican en la tabla I

## b) METODO DEL DR. UDY.

En el capítulo anterior se ha hecho una exposición del fundamento de este método, ahora dentro de este capítulo se explicará el método desarrollado en este trabajo

### 1.—SOLUCIONES.

1.—**SOLUCION COLORANTE**—Esta solución debe contener 1000 mg l de colorante o sea 1 mg/ml; para evitar la precipitación del colorante se le añaden 125 ml. de solución alcohólica de timol al 1 % por l. de solución

2.—**REACTIVO BUFFER DE Mc ILVAINE** (pH = 2.2). Se prepara esta solución estabilizadora del pH a 2.2., pesando exactamente 0.2694 g. de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y 5.175 g. de ácido cítrico monohidratado para 250 ml. de solución.

3.—**SOLUCION COLORANTE ESTABILIZADA A UN pH = 2.2.** Se pesan 1.0776 g. de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y 20.7 g. de ácido cítrico monohidratado, se agrega 1 g. del colorante anaranjado G puro, se disuelven los 3 reactivos en agua y se añoran a 1 lt.

### MATERIAL EMPLEADO.

- 12 tubos de ensayo.
- 1 centrifuga.
- Matraces alorados
- 1 pipeta de 25 ml. de preferencia automática.
- 1 bureta.
- 1 espectrofotómetro o fotocolorímetro muy sensible.



En el método propuesto por el Dr. Udy se usa un fotocoloímetro de "Evelyn", en este trabajo se ha usado un espectrofotómetro muy sensible "Beckman". La diferencia que existe entre estos aparatos es la siguiente:

Un fotocoloímetro es un aparato que sirve para determinar la intensidad de un rayo de luz monocromática cuya longitud de onda se seleccionará mediante el uso de diversas fuentes luminosas que emitirán luz de distintos colores, mediante una corriente eléctrica que se genera al incidir la luz sobre una placa de Se u otro material que tenga la propiedad de activarse y de emitir electrones al incidir sobre él un rayo de luz. Dicha corriente hace que deflexione la aguja de un galvanómetro proporcionalmente a la intensidad de la luz.

Un espectrofotómetro, como su nombre lo indica es una combinación de dos aparatos, un espectrómetro y un fotómetro.

Un espectrómetro es un aparato que se usa para producir una luz monocromática de cualquier color seleccionando y cuando se usa como parte de un espectrofotómetro se le llama monocromatizador y está calibrado para expresar el color de la luz monocromática que produce, en términos de la longitud de onda.

Un fotómetro es un aparato que sirve para medir la intensidad de la luz y cuando está formando parte del espectrofotómetro se usa una para medir la intensidad del rayo de luz monocromática producida por el monocromatizador.

Generalmente las medidas fotométricas se hacen primero con una referencia estándar y luego con una muestra colorida e interpuesta entre el rayo de luz monocromática, la razón de las dos medidas de la intensidad viene a ser una medida de la transmitancia de la muestra a la longitud de onda de la prueba.

$$T = \frac{P}{P_0}$$

T = Transmitancia.

P = Energía radiante transmitida a través de la muestra.

P<sub>0</sub> = Energía radiante que incide sobre la muestra.

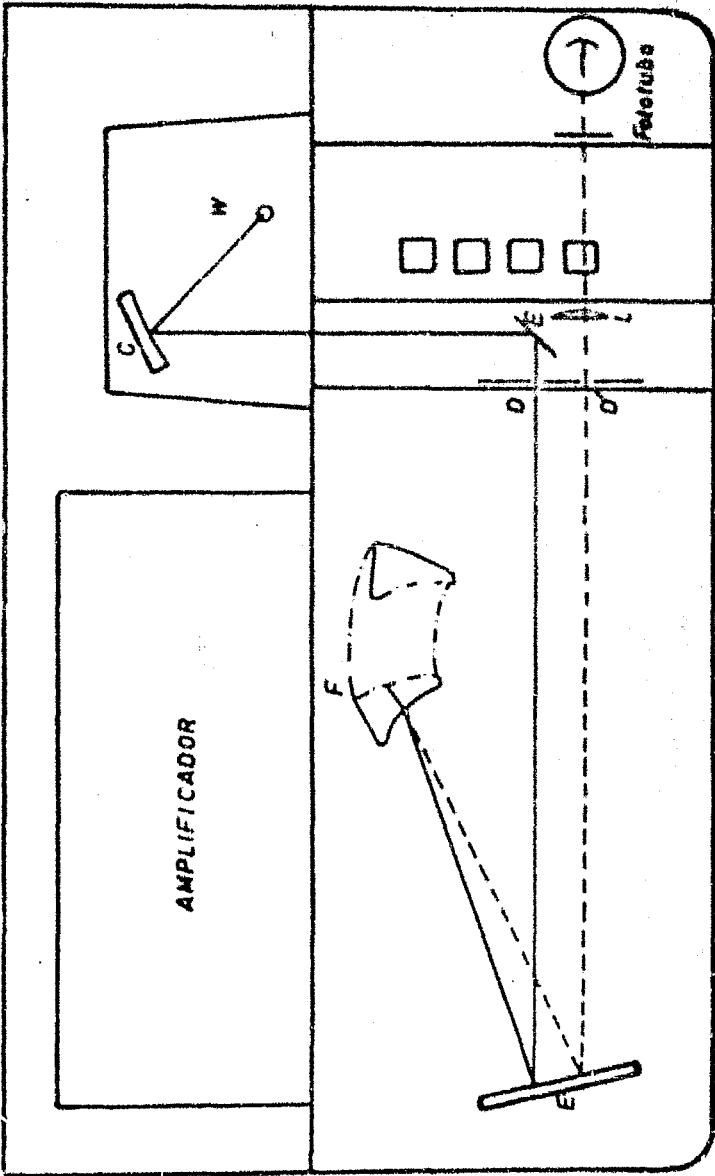


FIGURA No. 1

La transmitancia generalmente se expresa en unidades de %.

La referencia estándar con la cual se relaciona la luz transmitida a través de la muestra es por lo general una celda llena con el líquido en el cual se va a disolver la muestra, y la transmisión de ella es 100%.

El espectrofotómetro usado "Beckman" Modelo B consta de un sistema óptico, fuente luminosa, celdas de absorción, fotorecibidor y un amplificador.

1.—El amplificador empleado en este instrumento hace posible que exista una corriente en el fototubo de sensibilidad hasta de  $5 \times 10^{-11}$  amperes.

Tiene además un regulador de voltaje electrónico que mantiene un nivel casi constante en la amplificación, con fluctuaciones en la línea de voltaje de  $\pm 10\%$ .

2.—Sistema óptico.—Consta de una lámpara de tungsteno (W) colocada en el foco de un espejo cóncavo, (C) el cual hace que los rayos de luz reflejados sean paralelos e incidan nuevamente sobre un espejo plano (E) colocado a 45° los rayos reflejados, desviados 90° de la dirección de los incidentes, atraviesan el diafragma de entrada (D) que permite el paso de un haz de rayos luminosos. El diafragma puede abrirse o cerrarse según se desee para dejar pasar mayor o menor cantidad de luz.

El haz de rayos luminosos que atravesó el diafragma incide sobre un espejo plano E' que refleja el haz de rayos hacia el prisma de Fery (F), que actúa como monocromatizador, donde se dispersa en sus componentes de diferentes longitudes de onda. La superficie posterior del prisma está aluminizada para que la luz refractada en la primera superficie y transmitida a través del prisma se refleje hacia atrás experimentando una refracción más amplia al emerger del prisma.

La longitud de onda deseada se obtiene por rotación del selector de longitud de onda, el cual ajusta la posición del prisma. La luz de la longitud de onda deseada se regresa hacia el espejo plano donde se vuelve a reflejar y pasa a través del diafragma de salida D', enseguida pasa por una lente para que esté completamente horizontal y luego atraviesa la celda que contiene la muestra. La luz transmitida a través de la muestra llega al fototubo o sea la celda fotoeléctrica causando

una corriente eléctrica al activarse, la cual se registra en la escala.

3.—La lámpara de tungsteno es una lámpara piloto que actúa como fuente luminosa.

4.—Las celdas de observación son recipientes rectangulares donde se coloca la muestra que se va a observar.

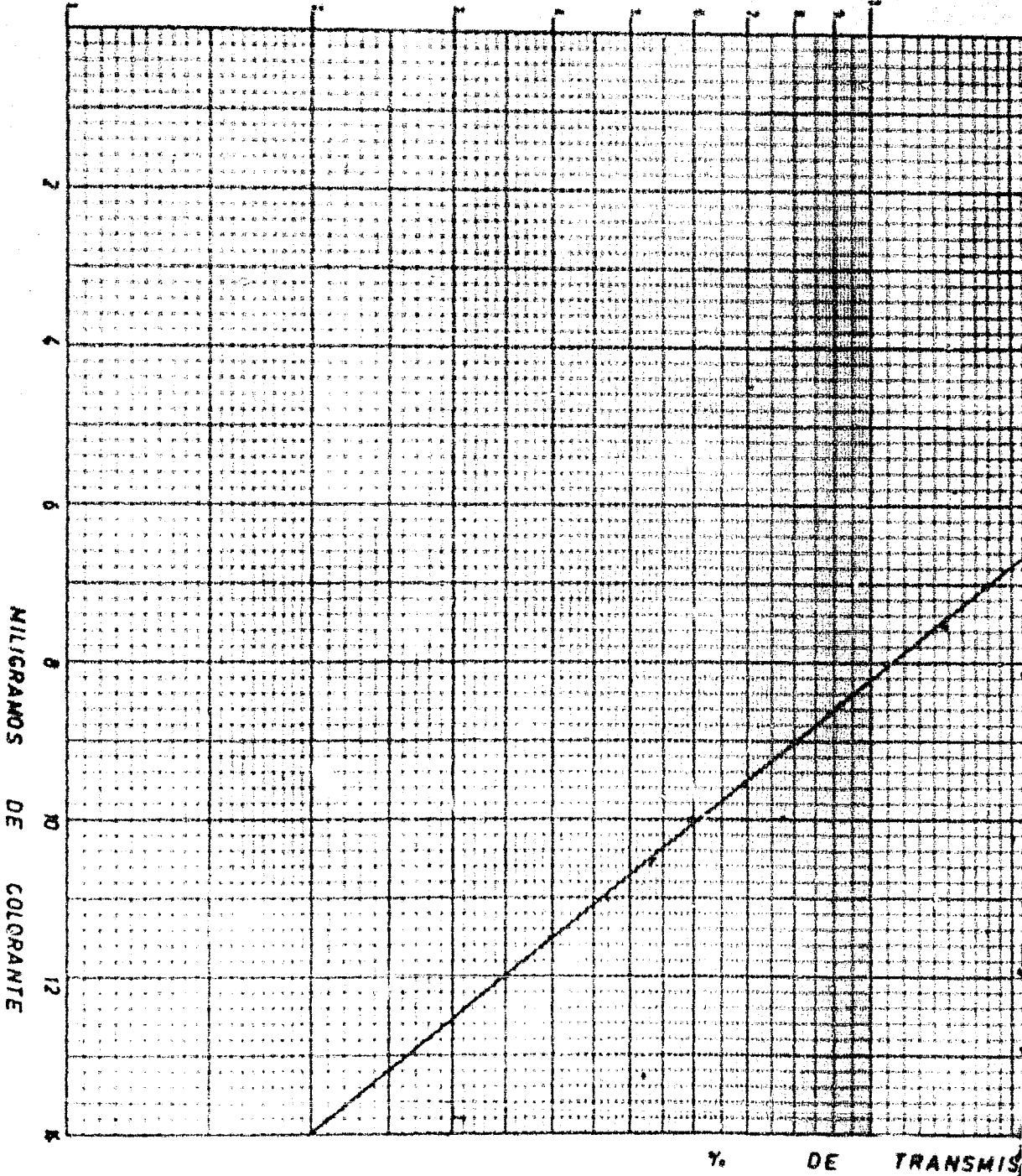
5.—El fotorecibidor ó fototubo es una celda fotoeléctrica muy sensible que como ya se ha indicado, tiene una placa de un material activable (como el Scl) al paso de la luz, emitiendo electrones que cierran el circuito y generan una corriente eléctrica que hace deflexionar la aguja del galvanómetro sensible.

### PROCEDIMIENTO.

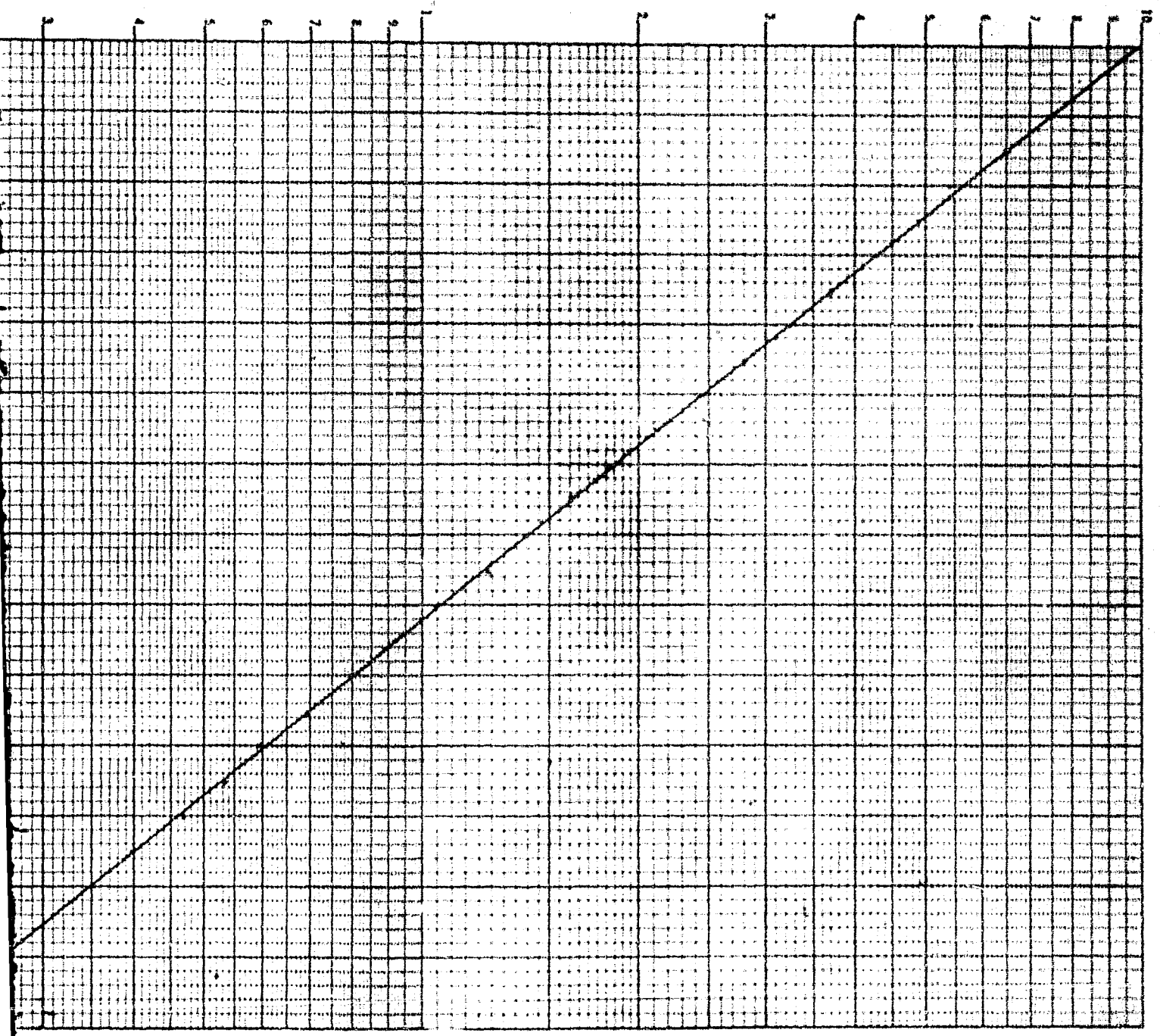
1.—Con la solución preparada de colorante se hace una serie de soluciones tipo en 25 tubos de ensayo que contengan desde 0.5 ml. de esta solución, hasta 15, a cada tubo se le agregan 10 ml de reactivo Butler de Mc Ilvaine, y se añoran a 25 ml. con agua destilada.

Con esta serie de soluciones tipo se hace una gráfica, leyendo en el espectrofotómetro la transmitancia de cada uno de ellos a 548 m $\mu$ . Experimentalmente se obtuvieron las siguientes lecturas.

ml. de solución MG de colorante.	% transmisión.
0	100
0.5	81
1	75
2.5.	65
2.	56
2.5.	50
3	43.5
3.5.	37.5



% DE TRANSMISIÓN



GRAFICA No. 1

% DE TRANSMISION

4	33
4.5	28.5
5	25
5.5	22
6	18
6.5	11
7	14
7.5	13
8	10
8.5	9.4
9	8.5
9.5	7.3
10	6
10.5	5.4
11	5
11.5	4
12	3.6
12.5	3

Las soluciones del colorante se estabilizan para poder hacer diluciones en caso necesario.

La gráfica obtenida es la No. 1.

2.—Se pesan muestras de harina de 1 g y se colocan en tubos de ensayo que tengan tapones de polietileno, se agregan 25 ml. de la solución colorante estabilizada a un pH 2.2., se tapan y se agitan durante 15 minutos con un agitador mecánico; al cabo de este tiempo se centrifugan a 4000 R.P.M., durante 5 minutos hasta que el líquido sobrenadante esté perfectamente claro; con este líquido se llenan las celdas del espectrofotómetro.

tro y se hace la lectura a 548  $\mu$  de longitud de onda, tomando como estándar de referencia agua destilada

El pH de la solución que reacciona con la harina debe mantenerse constante, tanto para poder efectuar alguna dilución en caso necesario como para que se efectúe una unión mejor entre las moléculas de colorante y las de proteínas; además, evitar que al aumentar el pH se produzca una hidrólisis en las moléculas de proteínas

Las soluciones estabilizadoras son aquellas que tienen a mantener constante el pH de una solución, a pesar de que se le añadan un ácido o una base o se efectúen diluciones, se ha observado que la presencia de un ácido débil y sus sales o de una base débil y sus sales en una solución, permite la adición de ácidos o bases sin que se produzca un cambio notable en la concentración de iones hidrógeno; esta propiedad se le llama acción reguladora y depende de la concentración y de la naturaleza de las sustancias que constituyen el sistema, así como de la cantidad del ácido o de la base que se le adicionen y de la naturaleza de los mismos. Por otra parte, una solución con sistema regulador puede ser diluida notablemente sin que se produzca un cambio considerable en el valor del pH; este hecho es muy importante en las determinaciones fotométricas, ya que en algunos casos, como cuando se investigan soluciones muy coloradas o turbias, éstas se pueden diluir para poder observarse mejor, sin que su pH se modifique precisamente por la presencia de un sistema regulador apropiado, esta propiedad es importantísima en la determinación colorimétrica del pH o en casos como el presente, en que es de tanta importancia mantener constante el pH

Varios autores han propuesto métodos para preparar una serie de soluciones reguladoras

Sørensen preparó estas soluciones mezclando determinados volúmenes de soluciones M. 15 de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , e indicó sus resultados en tablas; también preparó tablas usando solución de citrato de sodio mezclada con ácido clorhídrico y de citrato de sodio con hidróxido de sodio.

Clark y Lubs también recomiendan una serie de soluciones tipo en las cuales intervienen diversas sustancias, como citrato



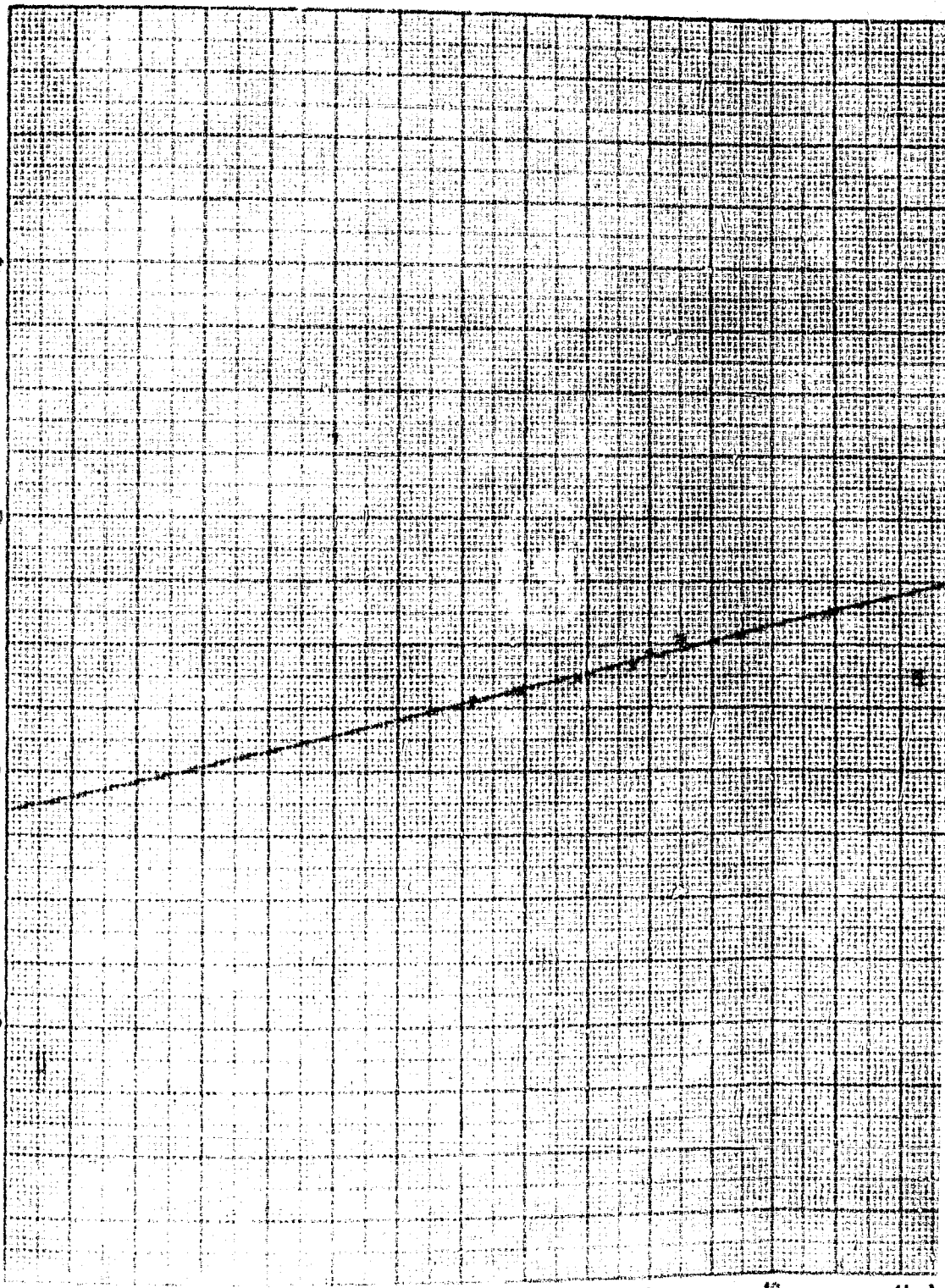
T A B L A N° 1

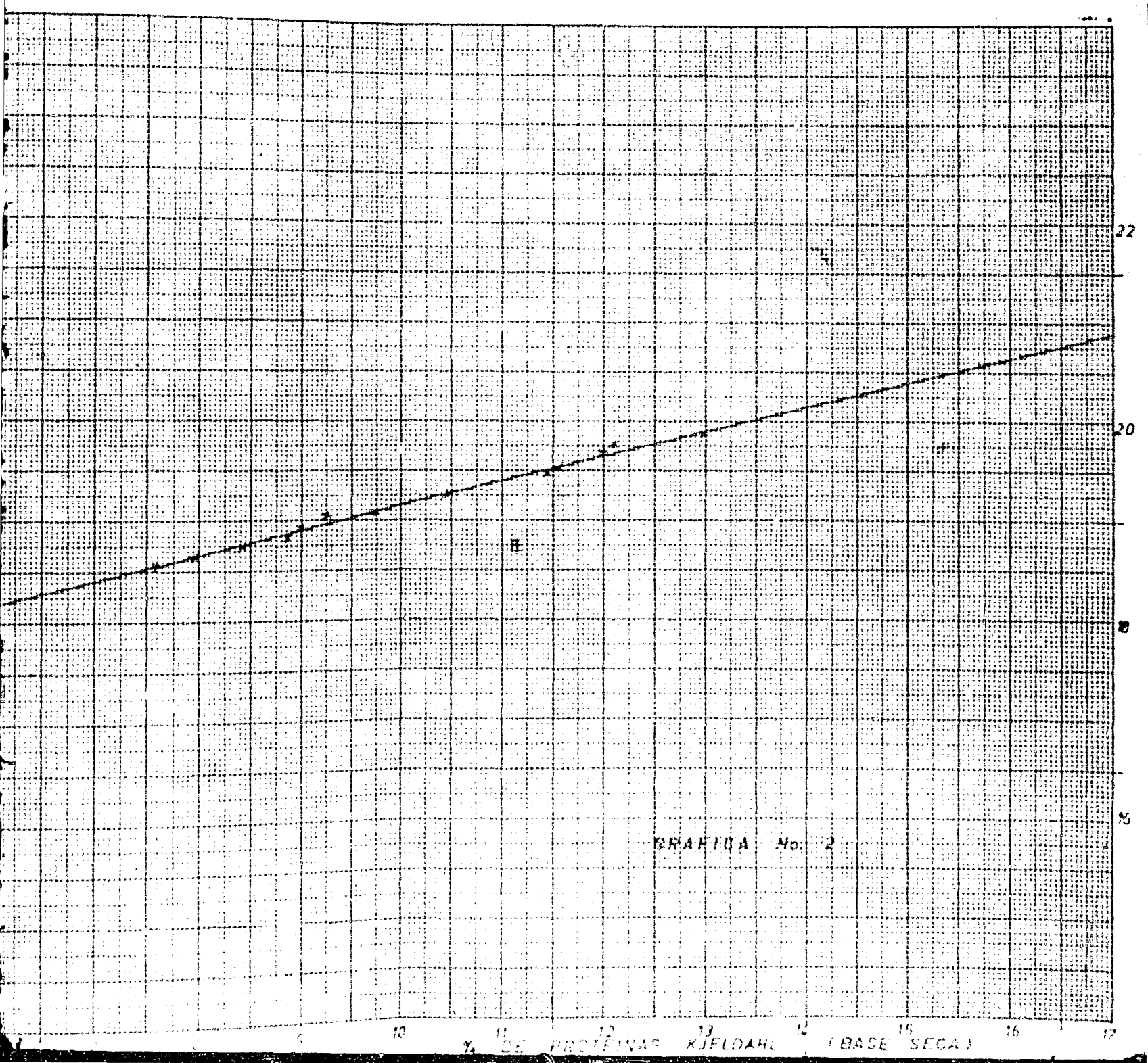
CLASE DE HARINA	% Humedad	% Proteína bruta (Kjeldahl)	% Proteína (base seca)	Peso de muestra tra tratada con colorante	Corrección por humedad en el peso
1-Harina para pan "Tres Estrellas"	13.5	9.99	11.55	1	0.855
2-Harina "Pastames" especial para pastas	15.0	7.663	9.0	1	0.85
3-Harina de trigo colorado de Zacatecas	10.0	7.27	7.93	1	0.90
4-Harina de trigo colorado de Sinaloa	11.3	12.302	13.85	1	0.887
5-Harina para pan "Medalla de Oro"	14.7	9.4533	11.09	1	0.853
6-Harina de trigo colorado de Guamuchi Sin	11.0	8.6733	9.95	1	0.89
7-Harina de trigo colorado de Los Mochis Sin	12.0	12.10	13.75	1	0.88
8-Harina para pan "Mercurio"	14.5	10.338	12.0871	1	0.855
9-Harina de trigo Gabo	10.1	8.281	9.2133	1	0.899
10-Harina para pan "Martil"	14.3	7.201	8.40	1	0.857
11-Harina para pan Lance Hnos	14.0	8.782	10.45	1	0.86
12-Harina para pan "San José"	15.1	8.72	9.70	1	0.849

T A B L A N° 1

% Humedad	% Proteína bruta (Kjeldahl)	% Proteína (base seca)	Peso g de mues- tra tratada con colorante	g Corrección por humedad en el peso	% Transmisión	mg colorante no ligado en la harina	mg colorante li- gado y harina	mg colorante li- gado y harina (en base seca)
13.5	9.99	11.55	1	0.855	10.5	8.04	16.96	19.60
15.0	7.663	9.0	1	0.85	8.2	8.90	16.10	18.95
10.0	7.27	7.93	1	0.90	9.7	8.32	16.68	18.53
11.3	12.302	13.85	1	0.887	19.5	5.782	19.218	21.7
14.7	9.4533	11.09	1	0.853	7.7	9.15	15.85	18.57
11.0	8.8733	9.95	1	0.89	9.5	8.36	16.64	18.75
12.0	12.10	13.75	1	0.88	11.7	7.65	17.35	19.7
14.5	10.338	12.0871	1	0.855	10.4	8.08	16.92	19.8
10.1	8.281	9.2133	1	0.899	11.0	7.90	17.10	19.05
14.3	7.201	8.40	1	0.857	8.6	8.78	16.22	18.74
14.0	8.782	10.45	1	0.86	9.4	8.40	16.60	19.30
15.1	8.22	9.70	1	0.849	8.61	8.77	16.23	19.15

MILIGRAMOS DE COLORANTE LIGADO  $\sqrt{\text{G DE HARINA (BASE SECA)}}$





de potasio y ácido clorhídrico; fosfato ácido de potasio y ácido clorhídrico; fosfato ácido de potasio y hidróxido de sodio, etc.

Muchos otros autores, han hecho tablas que contienen series de soluciones reguladoras para distintos pH. En este estudio se ha usado de la serie de Mc Ilvaine la solución estabilizadora correspondiente a un pH de 2.2 y da la siguiente proporción.

g	g	Quitar con agua a
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	$\text{H}_2\text{CH}_2\text{O}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	250 ml
0.2694	5.175	-----

La longitud de onda (548 m $\mu$ ) se toma en el punto en que el % de transmisión es máxima, tomando como referencia una solución diluida de anaranjado G (0.4 mg/ml) y hace girar el selector de longitud de onda del aparato haciendo deslizar la aguja del galvanómetro, marcando cada vez mayor lectura, hasta que llegando a una determinada longitud de onda, la aguja retrocede. A esa longitud de onda se obtiene el máximo de transmisión.

3.—Se determina la humedad de cada muestra de harina; puede hacerse por cualquier método, pero en este caso se pesó un g. de harina en una caja de humedad previamente tarada se coloca 1/2 hora en la estufa a 110° C. se deja enfriar 1/2 hora en el desecador y se vuelve a pesar. Por diferencia de pesos se calcula el porcentaje de humedad.

4.—Se construye una tabla (tabla No. 1) que indique (1) la clase de harina, (2) su humedad, (3) el % de proteínas bruta, (4) el % de proteínas en base seca, (5) el peso de la muestra tratada con la solución colorante, (6) la corrección de este peso por la humedad, (7) el % de transmisión de la solución remanente del tratamiento de la harina con el colorante, (8) la lectura tomada de la gráfica No. 1 que indica directamente los mg. de colorante no ligado en el peso de harina (base seca) tratada, (9) los miligramos de colorante ligado por el peso de harina tratada (seca) o sea la diferencia de 25 mg. que se agregaron menos los mg. de colorante no usados, expresados en la columna anterior, y por último (10) los mg. de colorante ligado por gramo de muestra de harina en base seca.

5.—Con estos datos se construye una gráfica que da el % de proteínas Kjeldahl en base seca, en función de los miligramos de colorante líquido por gramo de muestra (gráfica No 2)

En la gráfica II, que relaciona los mg de colorante líquido por gramo de muestra y el % de proteínas Kjeldahl, se observa que la intersección de la recta con las coordenadas, no pasa por cero, esto es debido a que otras constituyentes, además de las proteínas también ligon parte del colorante.

Los valores del almidón son aproximadamente 4.6 mg de colorante por gramo de harina a un pH de 2.1, aunque el contenido del almidón no es exactamente igual en todas las muestras de harina, se puede tomar como valor promedio 67%, ya que su variación no es muy grande, en un caso extremo, una fluctuación de 10% en este valor equivale a menos del 0.2 mg de colorante líquido y está dentro de los límites del error estimado.

## CAPITULO IV

### CONCLUSIONES.

Con el uso de este método se simplifica notablemente el análisis de proteínas en harinas de trigo, de manera muy especial en el tiempo de operación, ya que en lugar de hacer dicho análisis de dos o tres horas puede hacerse en veinte minutos; además el método expuesto es muy sencillo y creo que este procedimiento será de aplicación en todas aquellas industrias y panificadoras donde se desee controlar el contenido proteico de las harinas.

## CAPITULO V.

### BIBLIOGRAFIA.

1.—Kahane E.

L'action de l'Acide Perchlorique, sur les Matières Organiques, et ses Applications a la Chimie Analytique.

Hermann y Cie.—Editeurs.—Paris.—1a. Edición.—  
Pág. 189-256.—1934.

2.—Kent Jones D. M. y Amca A. J.

Modern Cereal Chemistry.

J. Willey and Sons Inc. — Liverpool — 4a. Edición —  
Pág. 148-188 y 402-406 — 1947.

3.—Casares R.

Química de los alimentos.

Editorial Saeta — 2a. Edición — Pág. 7 al 27 — 1935.

4.—Udy C. D.

Determinación de Proteínas en Trigo y Harina por unión de Iones.

Cereal Chemistry — Mayo 1956 — Vol. 33.

5.—Lille J.

Biología General.

Editorial Porrúa — 3a. Edición — Pág. 27-31 — 1942.



6.—A. O. A. C.

Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists

American Book — 3/a. Edición — Washington D. C. —  
347 a 349 — 1945

7.—Daniels F.

Outlines of Physical Chemistry.

J. Wiley and Sons Inc. — 2/a. Edición — New York —  
Págs. 87 a 91 — 1948

8.—Orozco P.

Análisis Químico Cuantitativo.

Editorial Porrúa — 3/a. Edición — Págs. 120 a 130 y 210  
a 217 — 1952

9.—Castillo, Cuervo A.

Microdeterminación de Protéidos en Harinas.

Tesis Profesional — México — Págs. 2 a 8 — 1953.