

## Estandarización de un método micro-Kjeldahl para la determinación de proteína en granos de quinua

Sthefany A. Villanueva M., Sonia Torrico V.<sup>1,\*</sup>, Sergio M. Espinoza<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Tecnología Agroindustrial, Facultad de Ciencias y Tecnología, Universidad Mayor de San Simón, Cochabamba, Bolivia

\*soniatorrico.v@fcyt.umss.edu.bo

### Resumen

El método Kjeldahl es frecuentemente utilizado para la determinación de proteína en productos alimenticios y su aplicación es cada vez más demandada en el Centro de Tecnología Agroindustrial. Con el objeto de facilitar a estudiantes de grado y tesis un protocolo alternativo a la normativa oficial (AOAC, IBNORCA) que no siempre es de fácil acceso, en el presente trabajo se estandarizó un método micro-Kjeldahl para la determinación de proteína en granos de quinua. El método consta de 3 etapas: la digestión, destilación y titulación; la estandarización del método se basó en los lineamientos del Consejo Internacional de Armonización (ICH) y el análisis estadístico se realizó con el software RStudio versión 4.0.4 empleando un nivel de significancia de 0,05. El método estandarizado presenta una relación lineal entre la cantidad de proteína determinada y la masa de quinua procesada ( $R^2=0,9967$ ) con un límite de detección y límite de cuantificación de 0,0144 g y 0,0174 g de proteína respectivamente. El método es exacto, expresado como % de recuperación (107% en la parte media y alta de la línea de regresión); mientras que la repetibilidad, expresada como el coeficiente de variación es menor a 4,2%. La determinación de proteína mediante el protocolo planteado no depende del día ni del analista que lo aplique. El proceso seguido para la estandarización del método puede aplicarse a otros productos alimenticios además de la quinua.

**Palabras clave:** *Método micro-kjeldahl, Proteína, Quinua.*

### 1. Introducción

La quinua es una planta nativa de la región Andina que es ampliamente cultivada debido a las notables propiedades nutricionales de su semilla (Jacobsen, S.E. 2006); (Bazile, D., Jacobsen, S.E, Verniau, A. 2016). Si bien el contenido proteico de esta (aproximadamente 15% (Abugoch James, L.E. 2009) es ligeramente superior al de alimentos como la cebada, trigo o avena (Abugoch James, L.E. 2009; Repo-Carrasco, R., Espinoza, C., Jacobsen, S.E. 2003) lo que en realidad la hace notoria es el balance de aminoácidos que presenta, cubriendo un rango más amplio que los cereales y legumbres además de exhibir un contenido alto de lisina y metionina, aminoácidos limitantes en la mayoría de estos alimentos (Abugoch James, L.E. 2009). A esto se suma su alto valor biológico (proporción de la proteína del alimento que es incorporado a las proteínas del cuerpo) así como la baja huella hídrica y de carbono que representa el crecimiento de la planta (Gordillo-Bastidas, E., Díaz-Rizzolo, D.A., Roura, E., Massanés, T., Gomis, R. 2016).

Dada la importancia del consumo de proteínas en la dieta humana, determinar el contenido de estas en los alimentos es una tarea frecuente en el control de calidad y caracterización de productos alimenticios; lo cual es particularmente cierto en el caso de alimentos con una

alta calidad proteica como la quinua. Para determinar el porcentaje de proteína en los alimentos se pueden aplicar principalmente dos métodos químicos, el método de Kjeldahl que estima el contenido de proteína a partir de la medición del nitrógeno orgánico total, y el método de Dumas, que se basa en la combustión de la muestra y en la cuantificación de su proteína a partir de la reducción de los óxidos de nitrógeno formados a nitrógeno gaseoso ( $N_2$ ) (Nielsen, S.S., 2010). El método de Kjeldahl es tradicionalmente el más usado, aunque la facilidad de automatización, rapidez y la ausencia de reactivos peligrosos en el procedimiento han provocado que el método de Dumas sea aplicado cada vez más frecuentemente en la actualidad (Müller, J., 2017).

La determinación de proteína mediante el método de Kjeldahl involucra tres etapas: digestión, destilación y titulación. En la primera etapa se busca transformar el nitrógeno orgánico del producto alimenticio (mayormente asociado a proteínas) en una sal inorgánica donde este nitrógeno se encuentre accesible para un procesamiento posterior. En la destilación, el nitrógeno proveniente de la digestión es transformado en amoníaco, el cual es colectado en una solución ácida de donde es determinado por titulación o retro-titulación con un ácido o base estandarizada

respectivamente (Buffler, M., 2017).

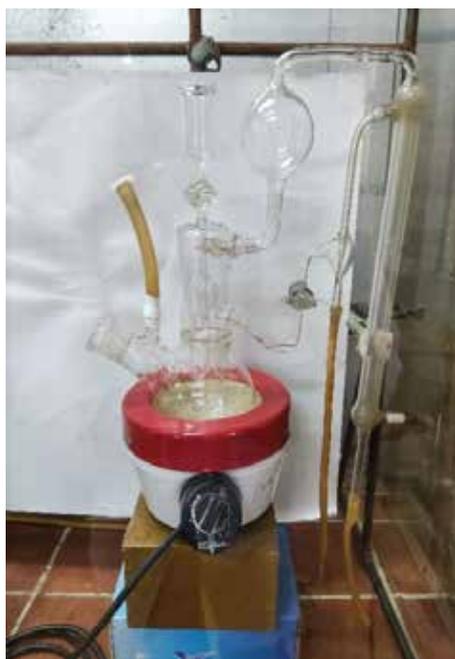
Debido a la creciente necesidad de contar con equipamiento y un procedimiento accesible para determinar el contenido proteico de productos alimenticios en el Centro de Tecnología Agroindustrial es que se plantea el presente trabajo con el propósito de reacondicionar el instrumental disponible y desarrollar un protocolo propio estandarizado con el cual estudiantes de grado puedan llevar a cabo la determinación de proteína en quinua o desarrollar protocolos similares para otros productos alimenticios.

## 2. Materiales y Métodos

### Equipamiento

El método para la determinación de proteína en granos de quinua se estandarizó empleando un destilador micro-Kjeldahl (Figura 1A) que fue reacondicionado para tales fines mediante la incorporación de una resistencia eléctrica nueva y un controlador de potencia (Figura 1B). El aparato fue instalado en una campana de extracción para lograr la expulsión de los gases desprendidos durante el procesamiento de las muestras. Adicionalmente se utilizaron una balanza analítica (Mettler Toledo ME104, Ohio, EUA), balanza de precisión (Mettler Toledo ME4002, Ohio, EUA), desionizador de agua (Merck Simplicity®), Darmstadt, Alemania), hornilla eléctrica (Fisatom 500, Saõ Paulo, Brasil) y termómetro infrarrojo (Surpeer IR5D, Guangdong, China).

A)



B)



Figura 1. Equipo micro-Kjeldahl para determinar proteína en quinua. A) Destilador micro-Kjeldahl B) Resistencia eléctrica y controlador de potencia

### Reactivos

Todos los reactivos empleados en el trabajo experimental fueron de grado analítico e incluyeron ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  95%, Merck), hidróxido de sodio (NaOH 99%, Merck), sulfato de cobre (II) pentahidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  99%, Sigma), sulfato de sodio anhidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$  99%, Merck), rojo de metilo (Scharlau), verde de bromocresol (Scharlau), fenolftaleína (Scharlau), carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  99%, Merck), biftalato de potasio (99%, Scharlau), glicina (99%, Sigma, sustancia de referencia) y alcohol isopropílico (99%, Sigma-Aldrich). Se utilizó agua desionizada para todas las corridas experimentales y en la preparación de todas las soluciones acuosas.

### Preparación de las muestras

Para la estandarización del método se emplearon granos de quinua comercial (Quinua real Salem®), los cuales fueron molidos con ayuda de un molino manual para luego ser tamizados a través de una malla de acero inoxidable de 20 mesh (0.841 mm). La harina resultante fue guardada en un envase de vidrio seco hasta su utilización respectivamente (Chang, S.K.C. 2010).

### Procedimiento general para la determinación de proteína

Una cantidad de quinua molida (entre 0.1 y 0.4 g) y tamizada (< 1mm) se agregó al matraz Kjeldahl junto con 2 g de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y 0.1 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ . A la mezcla resultante se agregaron 5 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y el

matraz se llevó a calentamiento durante 65 minutos a una temperatura aproximada de 370°C (medida con un termómetro infrarrojo). Finalizada la etapa de digestión (se obtiene una solución de apariencia verde-azulada tenue) se dejó enfriar por 10 minutos y se adicionaron aprox. 5 mL de agua desionizada para trasvasar completamente el contenido digerido del matraz al destilador ya en calentamiento (ver Material Suplementario Sec. 1). Para iniciar la destilación se agregaron 20 mL de una solución de NaOH 50% p/v y el destilado se recibió en 25 mL de solución estandarizada de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (ver Material Suplementario Sec. 2) hasta lograr un volumen final de 100 mL. El exceso de ácido sulfúrico sin neutralizar de esta solución fue entonces titulado (retro-titulación) con una solución estandarizada de NaOH (ver Material Suplementario Sec. 3) utilizando rojo de metilo como indicador (Nielsen, S.S., 2010; da Silva, T.E., Detmann, E., de Oliveira Franco, M., Nobre Palma, M.N. and Rocha, G.C. 2016). A partir del volumen consumido de esta solución de NaOH se determinó el porcentaje de proteína en las muestras de quinua empleando las Ecuaciones 1 y 2:

$$\text{Proteína [g]} = \left\{ \frac{V_{H_2SO_4} \times N_{H_2SO_4} - V_{NaOH} \times N_{NaOH}}{2000} \times 2 \times 14 - N_B \right\} \times 6,25 \quad (1)$$

$$\% \text{ Proteína} = \frac{\text{Proteína [g]}}{\text{Masa inicial de quinua [g]}} \times 100 \quad (2)$$

Donde  $V_{H_2SO_4}$  corresponde al volumen de ácido sulfúrico donde se recibe inicialmente el destilado (los 25 mL),  $N_{H_2SO_4}$  es la normalidad del H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> estandarizado,  $V_{NaOH}$  es el volumen consumido (en mL) de NaOH estandarizado al momento de la titulación,  $N_{NaOH}$  es la normalidad estandarizada de la solución de NaOH y  $N_B$  es la cantidad (en gramos) de nitrógeno que contiene el blanco. El factor 6,25 permite realizar la conversión entre nitrógeno-proteína para el caso de la quinua (Gonzalez, J.A., Konishi, Y., Bruno, M., Valoy, M., Prado, F.E. 2012; Elsohaimy, S.A., Refaay, T.M., Zaytoun, M.A.M. 2015) siendo el mismo valor asumido para gran parte de los alimentos, aunque varía en varios casos.

### Estandarización del método

La estandarización del método se basó tanto en los lineamientos del Consejo Internacional de Armonización (ICH por sus siglas en inglés) en su guía Q2(R1) “Validación de procedimientos analíticos: texto y metodología” (ICH Harmonized Tripartite Guideline,

2014) así como en el libro “Estadística y quimiometría para química analítica” (Miller, J.C. 2005). Todo el análisis estadístico se realizó con el software RStudio versión 4.0.4 empleando un nivel de significancia de 0,05.

### Linealidad

La linealidad del método se evaluó mediante una regresión lineal simple entre la cantidad de nitrógeno orgánico y la masa de quinua molida, para lo cual se consideraron inicialmente 5 puntos: 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 y 0,5 g de quinua. Adicionalmente se determinaron el coeficiente de correlación de Pearson, el coeficiente de determinación, los intervalos de confianza al 95% de la ordenada y al origen y la pendiente, así como la suma de cuadrados de los residuales. Los valores de nitrógeno orgánico para cada masa de quinua fueron determinados por triplicado y el blanco fue el promedio de 5 corridas experimentales consecutivas.

### Límite de detección, límite de cuantificación y límite de blanco

El límite de blanco (Ec. 3), límite de detección (Ec. 4) y límite de cuantificación (Ec. 5) se determinaron con base en las ecuaciones indicadas por Armbruster & Pry (Armbruster, D.A., Pry, T. 2008) como se muestran a continuación:

$$LoB = \text{media}_{\text{blancos}} + 1,645(sd_{\text{blancos}}) \quad (3)$$

$$LoD = LoB + 1,645(sd_m) \quad (4)$$

$$LoQ = LoB + 1,645(sd_m) \times 3 \quad (5)$$

En estas ecuaciones  $LoB$  es el límite de blanco,  $LoD$  es el límite de detección,  $LoQ$  es el límite de cuantificación,  $\text{media}_{\text{blancos}}$  es el promedio de los blancos medidos,  $sd_{\text{blancos}}$  es la desviación estándar de los blancos medidos y  $sd_m$  es la desviación estándar de muestras con baja concentración de analito (en nuestro caso 0.1 g de quinua, cuyas cantidades de proteína corresponden a valores muy cercanos al blanco). El factor de multiplicación 3 para  $LoQ$  es arbitrario y fue definido de forma análoga a las ecuaciones presentadas en Miller & Miller (Miller, J.N., Miller, J.C. 2005). Para determinar estos parámetros se consideraron 6 réplicas de blancos que consistieron en agua desionizada.

### Exactitud: sesgo y ensayo de recuperación

La exactitud del método se evaluó determinando tanto el sesgo como realizando ensayos de recuperación empleando glicina como sustancia de referencia (Bufferck, M., Muhleiss, A. 2018). Los ensayos de

recuperación se realizaron por triplicado en la parte baja, media y alta de la línea de regresión, para lo cual se pesó una cantidad base de quinua molida (0,100 g) a la que se agregaron 0,010; 0,020 y 0,027 g de glicina de tal forma que se obtuvieron cantidades totales de nitrógeno en la zona baja, media y alta de la línea de regresión. Dado que esta cantidad determinada de nitrógeno proviene tanto de la quinua como de la glicina añadida, la cantidad que aporta específicamente esta última se puede determinar por diferencia (valor experimental) luego de calcular la cantidad de nitrógeno aportado por la quinua mediante la ecuación de regresión lineal. Este valor puede ser comparado con el valor teórico de nitrógeno en la glicina, el cual se calcula a partir de la masa añadida de esta y su fórmula molecular. Del cociente entre la cantidad de nitrógeno experimental y teórico para la glicina es que se define la exactitud del método como porcentaje de recuperación.

El sesgo se evaluó determinando la masa experimental de glicina a partir de la masa de nitrógeno hallado experimentalmente con el método propuesto y comparando estos valores con las masas teóricas conocidas de glicina que fueron añadidas a las muestras de quinua molida. La comparación se realizó mediante una prueba t de Student para varianzas desiguales donde la hipótesis nula (no hay diferencia significativa) es aceptada para valores de  $P$  mayores a 0,05.

### Rango

El rango de aplicabilidad del método se determinó a partir de la evaluación de la regresión lineal y considerando la exactitud del mismo en la zona baja, media y alta de esta misma regresión. A través del rango se buscó definir que del 80% al 120% de la cantidad recomendada de quinua para realizar el ensayo se encuentren dentro del rango abarcado por la regresión lineal.

### Precisión: repetibilidad y precisión intermedia

La precisión se evaluó como: repetibilidad y precisión intermedia. La repetibilidad se determinó como el coeficiente de variación de 6 muestras consecutivas de quinua (0,4 g); mientras que la precisión intermedia se evaluó mediante un diseño experimental de dos factores (Día y Analista) a dos niveles cada uno ( $2^2$ ) (sin réplicas) donde cada corrida experimental correspondió a la determinación del porcentaje de proteína en muestras de 0,3 g de quinua.

### 3. Resultados y Discusión

La regresión lineal se muestra en la Figura 2A. La curva se obtuvo con 4 puntos porque las corridas experimentales que se probaron con 0,5 g de quinua fueron infructuosas, ya sea porque la muestra no se digería completamente, o debido a pérdidas importantes de material producto de salpicaduras por la excesiva cantidad de material orgánico para el volumen de  $H_2SO_4$  empleado en la digestión. Emplear una mayor cantidad de  $H_2SO_4$  no fue factible dado que su volumen define la cantidad de NaOH de neutralización (PanReac AppliChem. 2018). Sumados ambos volúmenes, cuando se emplean más de 5 mL de  $H_2SO_4$ , sobrepasan la capacidad de la cámara del destilador micro-Kjeldahl.

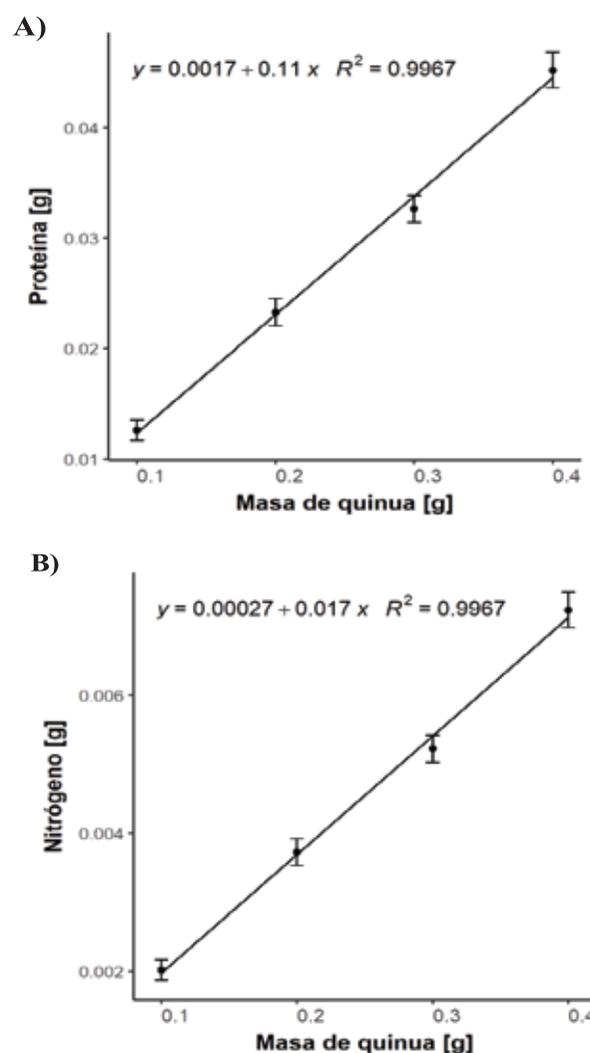


Figura 2. (A) Regresión lineal entre la cantidad de proteína [g] y la masa de quinua empleada [g]. (B) Regresión lineal entre el contenido de nitrógeno [g] y la masa de quinua [g].

Las ecuaciones resultantes de esta regresión lineal tanto para la cantidad de proteína como para la de nitrógeno en función de la masa de quinua (Figura 2B) se muestran en las Ecuaciones 6 y 7, respectivamente. Las características más importantes de la regresión lineal entre la masa de proteína y la masa de quinua se encuentran resumidas en la Tabla 1:

$$\text{Proteína [g]} = 0,11 \times \text{Quinua [g]} + 0,0017 \quad (6)$$

$$\text{Nitrógeno [g]} = 0,017 \times \text{Quinua [g]} + 0,00027 \quad (7)$$

El valor cercano a 1 del coeficiente de correlación de Pearson da cuenta del ajuste adecuado de los datos experimentales con la línea de regresión. Esta misma bondad se ve reflejada en el coeficiente de determinación y en la suma de cuadrados de los residuales, cuyo valor hallado al ser cercano a cero, reafirma la buena adecuación del modelo a los datos. Por otro lado, el límite de blanco para el método fue 0,0129 g de proteína de quinua, mientras que el límite de detección y límite de cuantificación corresponden a 0,0144 g y 0,0174 g de proteína respectivamente. Es importante notar que la cantidad de proteína correspondiente a 0,1 g de quinua se encuentra por debajo del límite de cuantificación y aunque esto no trajo consecuencias negativas para la regresión lineal que se realizó, indica que la cantidad mínima de quinua que tendría que analizarse mediante este método debe ser mayor o igual a 0,2 g.

Tabla 1

Características de la regresión lineal entre la cantidad de proteína [g] y la masa de quinua [g]

Característica	Valor $\rho$ intervalo
Intervalo de confianza del 95% para el intercepto	[-0,0035;0,0068]
Intervalo de confianza del 95% para la pendiente	[0,0884;0,1258]
Coefficiente de determinación ( $R^2$ )	0,9967
Coefficiente de determinación ajustado ( $R^2$ ajust.)	0,9951
Coefficiente de correlación de Pearson ( $r$ )	0,9983
Suma de cuadrados de los residuales	$1,8955 \times 10^{-6}$

En cuanto a la exactitud, puede verse claramente que el método mejora a medida que la evaluación pasa de la

zona baja de la línea de regresión a la zona media y alta (Tabla 2). Esto indica que se tiene una mejor exactitud (107% expresada como recuperación) a medida que la cantidad de quinua sujeta a análisis aumenta, siendo el límite superior 0,4 g y el límite inferior los ya mencionados 0,2 g. Ambos valores entonces delimitarían el rango de aplicabilidad del método e indican que la masa más adecuada de quinua para realizar el ensayo es de 0,3 g considerando que el 80% de este valor se encuentra cabalmente por encima del límite inferior, mientras que el 120% se encuentra por debajo del límite superior.

Tabla 2

Exactitud del método micro-Kjeldahl (evaluado como % recuperación) para determinar proteína en granos de quinua

Zona <sup>a</sup>	Masa quinua [g]	Masa glicina [g]	$V_{\text{NaOH}}$ [mL] <sup>b</sup>	$N_t$ glicina [g] <sup>c</sup>	$N_{\text{exp}}$ glicina [g] <sup>d</sup>	Recuperación [%]
Baja	0,1005	0,0104	23,0	0,0019	0,0023	121,1
	0,1012	0,0107	22,9	0,0020	0,0024	120,0
	0,1004	0,0100	23,0	0,0018	0,0023	127,8
Media	0,1051	0,0202	21,5	0,0037	0,0042	113,5
	0,1057	0,0200	21,9	0,0037	0,0037	100,0
	0,1013	0,0201	21,7	0,0037	0,0040	108,1
Alta	0,1008	0,0270	20,6	0,0050	0,0055	110,0
	0,1005	0,0271	20,8	0,0050	0,0052	104,0
	0,1008	0,0271	20,7	0,0050	0,0053	106,0

<sup>a</sup> Zona baja, media y alta de la línea de regresión

<sup>b</sup> Volumen de NaOH estandarizado empleado en la titulación

<sup>c</sup> Cantidad de nitrógeno en la glicina (valor teórico)

<sup>d</sup> Cantidad de nitrógeno en la glicina determinado experimentalmente

Como era de esperarse, el método es más inexacto cuando se hacen mediciones con 0,1 g de quinua dado que se encuentra muy cercano a los valores del blanco y por debajo del límite de cuantificación. Adicionalmente puede observarse que el método exhibe una tendencia a sobre-estimar la cantidad de nitrógeno presente en las

muestras; esto se explica por la titulación del H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> remanente con NaOH estandarizado empleando rojo de metilo como indicador, el cual vira en un rango de pH entre 4,4-6,2. Como se titula hasta un pH ligeramente ácido y no hasta neutralización, hay un exceso de ácido que se contabiliza como neutralizado por el amoníaco proveniente de la muestra. Si en lugar de rojo de metilo se empleara un pH-metro para monitorear la neutralización se conseguirían resultados más exactos. Por otro lado, se ha reportado que la principal fuente de incertidumbre en el método Kjeldahl para la determinación de nitrógeno es el material volumétrico que se emplea en el proceso (Anglov, T., Petersen, I.M., Kristiansen, J. 2003). Basándonos en la experimentación realizada y el protocolo establecido, la bureta empleada en la etapa de titulación final sería la que afecta más en la determinación de proteína y tendría que ser de la mejor precisión posible.

Por otro lado, los resultados de la evaluación del sesgo muestran en todos los casos, ya sea en la parte baja, media o alta de la regresión lineal, que no hay diferencias significativas entre los valores teóricos conocidos de la sustancia de referencia (glicina) y los valores determinados experimentalmente (ver Tabla 3); indicando que el método es aceptable y de una veracidad adecuada.

Tabla 3

*Exactitud del método micro-Kjeldahl (evaluado como sesgo) para determinar proteína en granos de quinua*

Zona <sup>a</sup>	Masa quinua [g]	Masa glicina [g]	Masa experimental de glicina [g]	Valor de P <sup>b</sup>
<b>Baja</b>	0,1005	0,0104	0,0099	0.44
	0,1012	0,0107	0,0106	
	0,1004	0,0100	0,0099	
<b>Media</b>	0,1051	0,0202	0,0205	0.32
	0,1057	0,0200	0,0176	
	0,1013	0,0201	0,0191	
<b>Alta</b>	0,1008	0,0270	0,0268	0.14
	0,1005	0,0271	0,0254	
	0,1008	0,0271	0,0261	

<sup>a</sup> Zona baja, media y alta de la línea de regresión

<sup>b</sup> Valor de P determinando mediante la prueba t de Student para muestras con varianzas desiguales

En lo que concierne a la evaluación de la precisión del método, esta se realizó considerando tanto la repetibilidad como la precisión intermedia. Para determinar la primera se empleó 0,4 g de quinua molida en concordancia con los lineamientos de la ICH, los cuales indican realizar 6 determinaciones al 100% de la concentración de prueba (ICH Harmonised Tripartite Guideline 2014) Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4

*Repetibilidad del método micro-Kjeldahl para determinar proteína en granos de quinua*

Réplica	Masa de quinua [g]	V <sub>NaOH</sub> [mL] <sup>a</sup>	Masa de proteína [g]	Contenido de proteína [%]
1	0,4002	19,1	0,0591	14,77
2	0,4002	19,0	0,0599	14,97
3	0,4001	18,6	0,0632	15,80
4	0,4002	19,1	0,0590	14,77
5	0,4002	18,8	0,0616	15,38
6	0,4001	19,5	0,0558	13,95

<sup>a</sup> Volumen de NaOH estandarizado empleado en la titulación

Con las mediciones presentadas en la Tabla 4 se determinó el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación, para los cuales se obtuvieron los valores de 14,94%, 0,63 y 4,2% respectivamente. Por otro lado, los resultados del diseño experimental empleado (2<sup>2</sup> sin réplicas) para evaluar la precisión intermedia se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5

*Porcentajes de proteína obtenidos en el diseño experimental 2<sup>2</sup>*

Día	Analista	
	A	B
1	14,48	15,56
2	15,58	16,13

Dado que no fue posible realizar réplicas debido al tiempo que dura cada corrida experimental, el diseño experimental planteado fue evaluado empleando una

gráfica de Pareto (Figura 3) donde se utilizó el método de Lenth para determinar los valores críticos.

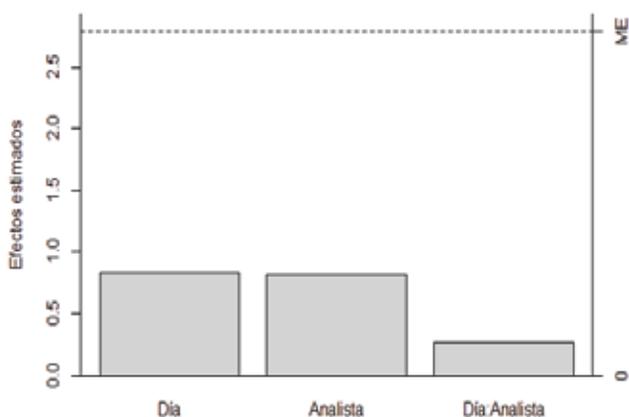


Figura 3. Gráfica de Pareto para los efectos de los factores Día y Analista<sup>a</sup>

<sup>a</sup> ME es el margen de error determinado mediante el método de Lenth empleando el procedimiento por defecto del paquete “unrepX” en RStudio

Los valores obtenidos para el margen de error (ME) y el margen de error simultáneo (SME) fueron 2,87 y 7,19 respectivamente. Como puede apreciarse en la Figura 3, ni el efecto del Día, Analista o la interacción de ambos puede considerarse significativa y el método podría aplicarse independientemente del día en el que este se realice o la persona que lo aplique.

#### 4. Conclusiones

Se ha estandarizado un método micro-Kjeldahl para la determinación de proteína en granos de quinua. El método es relativamente sencillo de aplicar y constituye una alternativa para que estudiantes de grado y tesis que no tienen acceso a normativa oficial puedan determinar proteína en granos de quinua o desarrollar métodos análogos para otros productos alimenticios. El método muestra una relación lineal entre la cantidad de proteína determinada y la masa de quinua procesada ( $R^2=0,9967$ ), presentando un límite de detección y límite de cuantificación de 0,0144 g y 0,0174 g de proteína respectivamente. El método es aplicable para muestras de quinua entre 0,2-0,4 g y tiene una mejor exactitud a medida que la masa de quinua usada en el procedimiento aumenta (107% de recuperación en la parte media y alta de la línea de regresión). La repetibilidad del método se cuantificó como el coeficiente de variación de seis mediciones consecutivas y presenta un valor de 4,2% lo que indica una adecuada precisión del método. La determinación

de proteína mediante el protocolo planteado no depende del día ni del analista que lo aplique.

**Agradecimientos:** Agradecemos a ASDI por el financiamiento recibido para el desarrollo de este trabajo como parte del Programa Doctoral Local en Tecnología en Química y al Centro de Tecnología Agroindustrial de la UMSS.

#### 5. Referencias bibliográficas

- Jacobsen, S.E. (2006). The Worldwide Potential for Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Food Rev Int*, 19 (1&2), 167–177. <https://doi.org/10.1081/FRI-120018883>
- Bazile, D., Jacobsen, S.E, Verniau, A. (2016). The Global Expansion of Quinoa: Trends and Limits. *Front Plant Sci*, 7, 622. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00622>
- Abugoch James, L.E. (2009). Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.): composition, chemistry, nutritional, and functional properties. *Advances in food and nutrition research*, 58, 1–31. [https://doi.org/10.1016/S1043-4526\(09\)58001-1](https://doi.org/10.1016/S1043-4526(09)58001-1)
- Repo-Carrasco, R., Espinoza, C., Jacobsen, S.E. (2003). Nutritional Value and Use of the Andean Crops Quinoa (*Chenopodium quinoa*) and Kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*). *Food Rev Int* 19 (1), 179–189. <https://doi.org/10.1081/FRI-120018884>
- Gordillo-Bastidas, E., Díaz-Rizzolo, D.A., Roura, E., Massanés, T., Gomis, R. (2016). Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.), from nutritional value to potential health benefits: An Integrative Review. *J Nutr Food Sci*, 6 (3), 497.
- Nielsen, S.S., (2010). Protein Nitrogen Determination. In: Nielsen S.S. (eds) *Food Analysis Laboratory Manual* (pp. 39-45). Boston, MA: Springer. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1463-7\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1463-7_5).
- Müller, J., (2017). Dumas or Kjeldahl for reference analysis?. *A White Paper from FOSS*, 1–5.
- Buffler, M., (2017). *Kjeldahl Knowledge Base*. Switzerland: Buchi Labortechnik AG. [https://d3pcsg2wj9izr.cloudfront.net/files/11510/download/800997/11595478\\_Kjeldahl\\_Knowledge\\_Base\\_Guide\\_en.pdf](https://d3pcsg2wj9izr.cloudfront.net/files/11510/download/800997/11595478_Kjeldahl_Knowledge_Base_Guide_en.pdf) (accessed 4 May 2020).
- Chang, S.K.C. (2010). Protein Analysis. In S.S. Nielsen, and Food Science Texts Series, *Food*

- Analysis* (pp. 135-137). West Lafayette: Springer.
- Da Silva, T.E., Detmann, E., de Oliveira Franco, M., Nobre Palma, M.N. and Rocha, G.C. (2016). Evaluation of digestion procedures in Kjeldahl method to quantify total nitrogen in analyses applied to animal nutrition. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 38(1), 45-51.
- Gonzalez, J.A., Konishi, Y., Bruno, M., Valoy, M., Prado, F.E. (2012). Interrelationships among seed yield, total protein and amino acid composition of ten quinoa (*Chenopodium quinoa*) cultivars from two different agroecological regions. *J Sci Food Agric*, 92, 1222–1229.
- Reguera, M., Conesa, C.M., Gil-Gómez, A., et al. (2018). The impact of different agroecological conditions on the nutritional composition of quinoa seeds. *PeerJ*, 6, e4442.
- Elsohaimy, S.A., Refaay, T.M., Zaytoun, M.A.M. (2015). Physicochemical and functional properties of quinoa protein isolate. *Ann Agric Sci*, 60 (2), 297–305.
- ICH Harmonised Tripartite Guideline (2014). Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2(R1). En somatek inc, Retrieved from the International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (pp. 1-13). San Diego-USA: Somatek inc. Recuperado de <https://somatek.com/wp-content/uploads/2014/06/sk140605h.pdf>
- Miller, J.N., Miller, J.C. (2005). *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*. Inglaterra: Pearson Prentice Hall. Recuperado de <https://bisakimia.com/wp-content/uploads/2017/09/21202653-miller-m-james-statistics-and-chemometrics-for-analytical-chemistry-5th-ed.pdf>
- Armbruster, D.A., Pry, T. (2008). Limit of blank, limit of detection and limit of quantification. *Clin Biochem Rev*, 29 (i), S49–S52.
- Bufferck, M., Muhleiss, A. (2018). *Kjeldahl proficiency guide – More about Kjeldahl and related determinations*. Flawil, Switzerland: Büchi.
- PanReac AppliChem. (2018). *Nitrogen Determination by Kjeldahl method*. <https://www.itwreagents.com>. Recuperado de: [https://www.itwreagents.com/uploads/20180114/A173\\_EN.pdf](https://www.itwreagents.com/uploads/20180114/A173_EN.pdf)
- Anglov, T., Petersen, I.M., Kristiansen, J. (2003). Uncertainty of nitrogen determination by the Kjeldahl method. In: De Bièvre P, Günzler H (eds) *Measurement Uncertainty in Chemical Analysis*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 273–279.