

DETERMINACIÓN DE NITRÓGENO AMONIAL EN LA ORINA DE LOS PEQUEÑOS RUMIANTES

S. LÓPEZ, E. LLAMAZARES, J.S. GONZÁLEZ, R. PELÁEZ

Departamento de Producción Animal. Universidad de León. 24071 LEÓN.

Introducción

El amoniaco, procedente del catabolismo de las proteínas tisulares o absorbido en el aparato digestivo, es un compuesto de elevada toxicidad para las células animales. El mecanismo para evitar la intoxicación del animal consiste en su transformación en urea en el hígado, siendo ésta es la principal forma de excreción urinaria de nitrógeno en los animales mamíferos. No obstante, siempre se eliminan por la orina pequeñas cantidades de nitrógeno en forma de amoniaco. A pesar de que la fracción de nitrógeno urinario que aparece en forma de amoniaco es muy pequeña, en algunos estudios puede ser interesante su cuantificación. Este es el caso de trabajos en los que se determinan los perfiles de excreción urinaria de compuestos nitrogenados o en estudios sobre el recambio de las proteínas en los tejidos. Los métodos más comúnmente utilizados para la determinación de N-amoniaco (N-NH_3) son la colorimetría y la destilación directa del amoniaco. Ambos métodos han sido utilizados para determinar el contenido en N amoniaco en muestras de suelos, ensilados, líquido ruminal y orina. La técnica colorimétrica se basa en la reacción del amoniaco con fenol y con hipoclorito sódico en medio alcalino, formando un compuesto coloreado en azul con máxima absorbancia de luz entre 625 y 650 nm (Fawcett y Scott, 1960; Weatherburn, 1967). En la destilación directa, el amoniaco se destila, se recoge sobre un ácido y finalmente se valora la cantidad de ácido unido al amoniaco (método Kjeldahl sin ataque previo). En nuestro laboratorio hemos observado que con ambos métodos se obtienen valores similares de concentración de N-NH_3 en muestras de líquido ruminal. Sin embargo, también hemos observado una discrepancia importante entre ambos métodos cuando se utilizan para determinar la concentración de N-NH_3 en muestras de orina de pequeños rumiantes. El objetivo de este trabajo ha sido analizar las posibles causas de esta diferencia, para establecer cual de las dos técnicas puede ser más apropiada para el análisis de muestras de orina.

Material y métodos

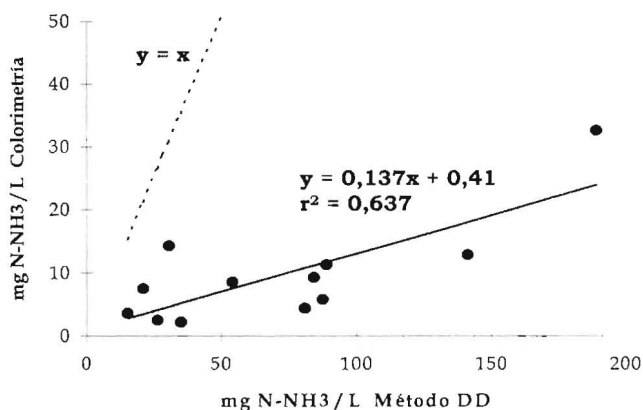
Se recogieron 12 muestras de orina (seis de oveja y seis de cabra). Los animales estaban alojados en jaulas individuales, y cada muestra se correspondió con la cantidad total de orina excretada en una micción. Las muestras se recogieron en recipientes de plástico y fueron inmediatamente congeladas a -20°C . En el laboratorio las muestras de orina fueron descongeladas e inmediatamente acidificadas mediante su dilución al 50% (v/v) en una disolución de HCl 0,2 N.

El contenido en N-NH_3 en las orinas acidificadas fue determinado utilizando ambas técnicas analíticas: colorimetría y destilación directa (DD). Para la determinación del contenido en N-NH_3 mediante colorimetría se emplearon las técnicas descritas por Fawcett y Scott (1960) (técnica que ha sido automatizada por UNICAM) y por Weatherburn (1967). Para el método DD, se tomaron 10 ml de cada muestra, se añadieron 35 ml de tetraborato sódico (para disociar el NH_4^+ del ácido) y se realizó la destilación y valoración posterior en un KJELTEC AUTO 1030 Analyzer.

Resultados y discusión

No se observaron diferencias entre los valores medios de concentración N-NH_3 obtenidos por la técnica de Weatherburn (1967) y los obtenidos con la técnica de Fawcett y Scott (1960), lo cual era previsible si tenemos en cuenta que ambas se basan en la misma reacción química. Los valores de absorbancia fueron sensiblemente mayores con la técnica de Weatherburn, indicando que puede ser algo más sensible y detectar variaciones más pequeñas en la concentración N-NH_3 . Al mismo tiempo, el rango de medida puede ser también más estrecho, detectándose con la técnica Weatherburn una relación lineal entre densidad óptica y contenido en N-NH_3 para un rango comprendido entre 0 y 7 mg N-NH_3 / L.

Las concentraciones de N-NH_3 en orina obtenidas por la técnica DD fueron siempre más altas que las obtenidas por colorimetría, tal y como se observa en la Figura, en la que cada punto se corresponde con los valores de concentración N-NH_3 observados para cada muestra de orina. Los valores obtenidos por el método DD fueron entre 2 y 18 veces mayores que los observados por colorimetría, con un coeficiente de correlación lineal entre ambos valores de 0,789 ($P < 0,01$). El coeficiente de correlación de Spearman entre ambas técnicas tuvo un valor de 0,6014 ($P < 0,05$), indicando que la clasificación de las muestras de orina de acuerdo con sus concentraciones en N-NH_3 fue distinta dependiendo de la técnica utilizada para determinar dichas concentraciones.



Con el objeto de analizar las causas de esta discrepancia, se prepararon disoluciones de sulfato amónico que contenían concentraciones variables de N-NH_3

(entre 0 y 45 mg/L), en agua destilada o en una disolución de urea. Estas disoluciones de concentración conocida de N-NH_3 fueron analizadas mediante ambos métodos. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente Tabla.

Conc. real de N-NH_3	Sin UREA		Con UREA (32 g / L)	
	Colorimetría	Método DD	Colorimetría	Método DD
45,7	48,7	51,0	47,2	95,8
22,9	25,0	27,3	22,3	74,2
11,4	11,1	11,6	11,2	61,8
4,3	4,6	5,0	4,9	50,6
0,0	0,1	0,8	0,1	50,6

Cuando las disoluciones se prepararon en agua destilada (sin UREA), los valores de concentración de N-NH_3 obtenidos mediante ambas técnicas fueron similares y muy próximos a las concentraciones reales de N-NH_3 . En todas las disoluciones, los valores de concentración de N-NH_3 observados por colorimetría fueron similares a las concentraciones reales, con diferencias que nunca fueron superiores a un 12%. Sin embargo, cuando las determinaciones se realizaron mediante el método DD, se observaron valores aproximados a las concentraciones reales únicamente en las disoluciones que no contenían urea, mientras que cuando se añadía urea a las disoluciones de N-NH_3 , los valores medidos se desviaban en mayor medida de las concentraciones reales.

Es lógico pensar que durante la destilación, el cambio a un pH alcalino y las altas temperaturas provocan una hidrólisis de la urea de forma que los grupos amino se rompen y se forma amoníaco. Parte del N ureico es medido como N-NH_3 , lo que da lugar a una sobre-estimación de esta última fracción, mayor cuanto mayor es el contenido en N-ureico de la muestra. Dado el alto contenido en urea de la orina de animales mamíferos, hay que concluir que el método por destilación directa es inapropiado para determinar el contenido en N-NH_3 en orina, siendo más precisa su determinación mediante la técnica colorimétrica. Como las concentraciones N-NH_3 en orina suelen ser muy bajas (una proporción muy pequeña del N urinario total) también puede optarse por determinar el contenido en N ureico y amoniacal, mediante una hidrólisis enzimática previa (empleo de una ureasa) seguida de una destilación directa de amoníaco, tal y como recomienda la A.O.A.C. (1995) para muestras de alimentos o aguas residuales.

Referencias bibliográficas

- AOAC (1995). *Official Methods of Analysis of AOAC International* (16th edition). AOAC International; USA.
- Fawcett, J.K. y Scott, J.E. (1960). Rapid and precise method for the determination of urea. *J. clin. Path.* **13**: 156-159.
- Weatherburn, M.W. (1967). Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Anal. Chem.* **39**: 971-974.