

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA**

**FACULTAD DE INGENIERÍA**

**ESCUELA ACADÉMICA PROFESIONAL DE INGENIERÍA  
AGROINDUSTRIAL**



**“OPTIMIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE ANÁLISIS DEL MÉTODO  
DUMAS PARA DETERMINACIÓN DE NITRÓGENO EN HARINA DE  
PESCADO”**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO  
AGROINDUSTRIAL**

**AUTORES**

**BACH. LÓPEZ MARTÍNEZ JOSÉ MANUEL**

**BACH. VEGA FLORES CELY ANALY**

**ASESOR:**

**Dr. GILBERT NILO RODRÍGUEZ PAUCAR**

**NUEVO CHIMBOTE – PERU**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA**  
**FACULTAD DE INGENIERÍA**  
**ESCUELA ACADÉMICA PROFESIONAL DE INGENIERÍA**  
**AGROINDUSTRIAL**



**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO**  
**AGROINDUSTRIAL**

**“OPTIMIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE ANÁLISIS DEL MÉTODO DUMAS**  
**PARA DETERMINACIÓN DE NITRÓGENO EN HARINA DE PESCADO”**

**TESISTAS**

**LÓPEZ MARTINEZ JOSÉ MANUEL**

**VEGA FLORES CELY ANALY**

Revisado y aprobado el 01 de Febrero del 2017 por el siguiente Jurado Evaluador,  
designado mediante resolución Decanatural N° 303-2016-UNS-CFI

---

**Dra. Elza Aguirre Vargas**

**Presidente**

---

**Dr. Gilbert Rodríguez Paucar**

**Secretario**

---

**Mg. Jorge Domínguez Castañeda**

**Integrante**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA**  
**FACULTAD DE INGENIERÍA**  
**ESCUELA ACADÉMICA PROFESIONAL DE INGENIERÍA**  
**AGROINDUSTRIAL**

**HOJA DE CONFORMIDAD DE ASESOR**

El presente trabajo de tesis titulado; **“OPTIMIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE ANÁLISIS DEL MÉTODO DUMAS PARA DETERMINACIÓN DE NITRÓGENO EN HARINA DE PESCADO”**. Ha contado con el asesoramiento de quien deja constancia de su aprobación. Por la motivo, firmo el presente trabajo en calidad de Asesor. Designado por **RESOLUCIÓN DECANATURAL N° 964 - 2015 - UNS-FI**.

---

**Dr. Gilbert Rodríguez Paucar**

**ASESOR**

## **DEDICATORIA**

*A mis padres, Orlando y Olinda,  
por su cariño confianza y apoyo  
incondicional en todas las  
decisiones que tomé en mi  
formación profesional.*

*A mis Hermanos Keny, Koky, Win,  
Yanella y Fredy que me enseñaron  
la importancia de estudiar y  
trazarme metas sin rendirse.*

*A mi abuelita María, que me enseñó  
a no rendirme ante cualquier  
dificultad y que la familia es el  
motor para seguir adelante.*

**C. V. F.**

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por seguir guiando mi vida por el sendero de la verdad.

Este proyecto es el resultado del esfuerzo conjunto de todos los que formamos el grupo de trabajo. Por esto agradezco a nuestro asesor Dr Gilbert Rodríguez Paucar, a mi compañero de tesis José López Martínez, quienes a lo largo de este tiempo han puesto a prueba sus capacidades y conocimientos en el desarrollo de este proyecto de investigación el cual ha finalizado llenando todas nuestras expectativas. A mis padres quienes a lo largo de toda mi vida han apoyado y motivado mi formación académica, creyeron en mí en todo momento y no dudaron de mis habilidades. A mis profesores de la Facultad de Ingeniería Agroindustrial, quienes les debo gran parte de mis conocimientos, gracias a su paciencia y enseñanza y finalmente un eterno agradecimiento a la prestigiosa UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA la cual abrió y abre sus puertas a jóvenes como nosotros, preparándonos para un futuro competitivo y formándonos como personas de bien.

*C. V. F.*

## **DEDICATORIA**

*A mi madre Epifania por su apoyo incondicional en todo el trayecto de mi vida, por ser mi sustento en el transcurso de mi vida universitaria.*

*A mi padre y mis sobrinas Yhamila y Gabriela por depositar confianza en mí y mostrarme el sentido la vida.*

*A mi tía Yola y mi primo Luis Carlos, quienes me apoyaron en todo momento y fueron mi motivación para seguir adelante.*

**J. L. M.**

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar a Dios ya que sin su guía no hubiese podido continuar con mis metas, es él quien me da fuerzas en situaciones adversas.

A mi asesor el Dr. Gilbert Rodríguez Paucar, por su apoyo y amistad brindada, por su disposición de tiempo, por su profesionalismo y compromiso para la culminación de este proyecto de tesis.

A docentes que tiene la facultad de ingeniería agroindustrial, por sus enseñanzas brindadas durante mi formación académica.

A mis grandes amigos por su apoyo incondicional, la confianza brindada y los consejos para lograr mis objetivos trazados, por todo ellos muchas gracias.

***J. L. M.***

# INDICE GENERAL

<b>I. INTRODUCCION.....</b>	<b>1</b>
<b>II. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA .....</b>	<b>2</b>
2.1. HARINA DE PESCADO .....	2
2.1.1. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA HARINA DE PESCADO.....	3
2.1.2. PRINCIPALES EMPRESAS PRODUCTORAS.....	4
2.1.3. CLASIFICACIÓN DE HARINA DE PESCADO .....	6
2.1.4. PROCESOS INDUSTRIALES PARA HARINA DE PESCADO .....	8
2.1.5. USOS DE LA HARINA DE PESCADO .....	12
2.2. PROTEINAS .....	16
2.2.1. CLASIFICACIÓN SEGÚN SU FUNCIÓN BIOLÓGICA.....	17
2.2.2. CLASIFICACIÓN SEGÚN LOS PRODUCTOS DE HIDRÓLISIS.....	18
2.2.3. COMPOSICIÓN ELEMENTAL DE LAS PROTEÍNAS.....	18
2.2.4. CALIDAD NUTRICIONAL DE LAS PROTEÍNAS.....	19
2.2.5. DETERMINACIÓN ANALÍTICA DE PROTEÍNA. ....	20
2.2.6. BALANCE DE NITRÓGENO. ....	20
2.3. MÉTODOS ANALÍTICOS CONVECCIONBALES PARA LA DETERMINACIÓN DE NITROGENO/PROTEINA.....	21
2.3.1. MÉTODO KJELDAHL.....	21
2.3.2. MÉTODO BIURET.....	22
2.3.3. MÉTODO DE LOWRY .....	23
2.3.4. MÉTODO DE BRADFORD .....	24
2.4. MÉTODO DE COMBUSTIÓN DUMAS.....	25
2.4.1. EQUIPO DUMAS CHNS 628 (LECO).....	27
2.4.2. CELDA DE CONDUCTIVIDAD TÉRMICA.....	30
2.4.3. LA RADIACIÓN INFRARROJA DE LA CELDA .....	31
2.4.4. SISTEMA DE COMBUSTIÓN DE OXÍGENO PURO .....	32
2.4.5. PREPARACIÓN DE MUESTRA CHNS628 DUMAS.....	33
2.4.6. CICLO DE ANÁLISIS.....	33
2.5. COMPARACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINACIÓN DE NITRÓGENO/PROTEÍNA.....	35
<b>III. MATERIALES Y METODO .....</b>	<b>37</b>
3.1. LUGAR DE INVESTIGACIÓN.....	37
3.2. MATERIA PRIMA .....	37
3.3. REACTIVOS .....	37
3.4. OTROS MATERIALES .....	38
3.5. EQUIPOS.....	38
3.6. METODOLOGÍA DE ANÁLISIS.....	42
3.6.1. DETERMINACIÓN DE NITRÓGENO POR DUMAS .....	42
3.6.2. DETERMINACIÓN DE NITRÓGENO POR KJELDAHL .....	42



3.6.3.	<i>DETERMINACIÓN DE HUMEDAD</i> .....	42
3.6.4.	<i>DETERMINACIÓN DE CENIZA</i> .....	43
3.6.5.	<i>DETERMINACIÓN DE GRASA</i> .....	43
3.6.6.	<i>DETERMINACIÓN DE FIBRA</i> .....	43
3.7.	METODOLOGÍA EXPERIMENTAL .....	43
3.8.	DISEÑO ESTADÍSTICO .....	45
3.8.1.	<i>MODELO ESTADÍSTICO</i> .....	47
3.9.	DESARROLLO DE LA INVESTIGACIÓN .....	48
3.9.1.	<i>PROCESO DE ANÁLISIS EN EL QUIPO DUMAS CHNS628</i> .....	49
3.9.2.	<i>PREPARACIÓN DEL ESTÁNDAR</i> .....	50
3.9.3.	<i>PREPARACIÓN DE LA MUESTRA</i> .....	53
<b>IV.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>57</b>
4.1.	COMPOSICIÓN FÍSICOQUÍMICA DE HARINA DE PESCADO .....	57
4.2.	CREACIÓN DEL MÉTODO DE ANÁLISIS .....	58
4.3.	CURVA DE CALIBRAD1O .....	61
4.4.	DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS PARA DETECTAR LA MÁXIMA CANTIDAD DE NITRÓGENO .....	62
4.4.1.	<i>ANÁLISIS DE VARIANZA</i> .....	65
4.4.2.	<i>ANÁLISIS DE EFECTOS DE LAS VARIABLES SOBRE LA RESPUESTA</i> 66	
4.4.3.	<i>ANÁLISIS DE SUPERFICIE RESPUESTA</i> .....	72
4.4.4.	<i>AJUSTE DE LA VARIABLE RESPUESTA AL MODELO MATEMÁTICO EXPERIMENTAL DE SEGUNDO ORDEN</i> .....	79
4.4.5.	<i>CONDICIONES ÓPTIMAS PARA DETERMINAR LA MAYOR CONCENTRACIÓN DE NITRÓGENO</i> .....	80
4.4.6.	<i>REPETIBILIDAD DE MUESTRAS DE HARINA DE PESCADO</i> .....	81
4.4.7.	<i>ANÁLISIS DE TUKEY PARA LOS TRATAMIENTOS</i> .....	84
4.5.	ANÁLISIS CONFIRMATIVO SEGÚN LOS NIVELES ÓPTIMOS.....	85
4.5.1.	<i>CORRELACIÓN ENTRE EL MÉTODO KJELDAHL Y DUMAS PARA UNA MUESTRA DE HARINA DE PESCADO</i> .....	87
<b>V.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>90</b>
<b>VI.</b>	<b>RECOMENDACIONES</b> .....	<b>91</b>
<b>VII.</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b> .....	<b>92</b>
<b>VIII.</b>	<b>ANEXOS</b> .....	<b>97</b>

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Análisis proximal (%) en 100 g de harina de pescado .....	4
Tabla 2. Principales plantas harineras peruanas .....	5
Tabla 3. Clasificación de las proteínas según sus productos de hidrólisis. ....	18
Tabla 4. Composición elemental de las Proteínas .....	19
Tabla 5. Conductividad térmica de los gases .....	31
Tabla 6. Planeamiento experimental Box - Behnken. ....	46
Tabla 7 Análisis proximal de la harina de pescado en 100g de muestra .....	57
Tabla 8. Cuadro resumen de la programación de los métodos .....	60
Tabla 9. Factores y niveles definidos para diseño Box – Behnken .....	62
Tabla 10. Resultados del diseño experimental .....	63
Tabla 11. Promedios de los tratamientos del diseño experimental .....	64
Tabla 12. Análisis de varianza (ANOVA) .....	65
Tabla 13. Efectos estimados para Nitrógeno (%) .....	66
Tabla 14. Coeficiente de regresión para Nitrógeno .....	79
Tabla 15. Valores óptimos el diseño Box – Behnken.....	80
Tabla 16. Análisis Tukey para medias iguales estadísticamente.....	84
Tabla 17. Comparación entre tratamientos.....	85
Tabla 18. Correlación de métodos a igual concentración.....	87

## INDICE DE DIAGRAMAS

Diagrama 1. Proceso industrial para obtención de harina de pescado. Recuperado <a href="http://www.haarslev.com/media/FishBrochure_ES.pdf">http://www.haarslev.com/ media/FishBrochure_ES.pdf</a> .....	8
Diagrama 2. Flujograma para la Optimización de los Parámetros de Análisis del Método Dumas.....	44
Diagrama 3. Flujograma del proceso de la optimización de parámetros de análisis para determinación de Nitrógeno. ....	48

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Complejo de Cobre obtenido en la reacción de Biuret. Obtenido de <a href="http://biocoments.blogspot.pe/2016/04/prueba-de-biuret-proteinas.html">http://biocoments.blogspot.pe/2016/04/prueba-de-biuret-proteinas.html</a> .....	23
Figura 2. Reacción de Proteína y los reactivos. Recuperado de <a href="http://devbio.wustl.edu/InfoSource/ISPDFs/Lowrybio.pdf">http://devbio.wustl.edu/InfoSource/ISPDFs/Lowrybio.pdf</a> .....	24
Figura 3. Esquemática de reacción para Coomassie Plus – Del ensayo Better Bradford, Recuperado de <a href="http://www.qcbio.com/pierce/23236.htm">http://www.qcbio.com/pierce/23236.htm</a> .....	25
Figura 4. Analizador Dumas CHNS 628. Recuperado de Leco Corporation.....	28
Figura 5. Diagrama de Flujo de CHNS 628. Recuperado de LECO Corporation.....	29
Figura 6. Pesado de la muestra en una lámina de estaño, LECO Corporation.....	33
Figura 7. Analizador Dumas CHNS628 .....	38
Figura 8. Equipo Kjeldahl .....	39
Figura 9. Equipo Soxhlet.....	39
Figura 10. Analizador de fibra dietaría.....	40
Figura 11. Estufa de Secado .....	40
Figura 12. Mufla Thermolyne .....	41
Figura 13. Balanza Analítica .....	41
Figura 14. Molino de Impacto. ....	42
Figura 15. Representación del diseño de Box-Behnken para tres factores. ....	45
Figura 16. Estándar EDTA. ....	50
Figura 17. Soporte y lámina de estaño. ....	51
Figura 18. Pesado de muestra.....	51
Figura 19. Sellado de muestra con lámina de estaño.....	52
Figura 20. Cabezal de Analizador DUMAS CHNS 628 .....	52
Figura 21. Muestra de Harina de Pescado .....	53
Figura 22. Llenado de muestra en molino .....	53
Figura 23. Homogenizado de muestra.....	54
Figura 24. Pesado de harina de pescado .....	54
Figura 25. 0.2 gr. de harina de pescado .....	55
Figura 26. Sellado de muestra de harina de pescado.....	55
Figura 27. Carga de muestra en el cabezal del Analizador CHNS628.....	56

Figura 28. Creación de método en el software de Leco, con una temperatura de combustión en el horno primario de 900 °C. ....	58
Figura 29. Creación de método en el software de Leco, con Tiempo de Integración de 45 segundos. ....	59
Figura 29. Temperatura de combustión a 900°C y Tiempo de Integración de 40 segundos. ....	102
Figura 30. Temperatura de combustión a 900°C y Tiempo de Integración de 50 segundos. ....	104
Figura 31. Temperatura de combustión a 950°C y Tiempo de Integración de 45 segundos. ....	105
Figura 32. Temperatura de combustión a 950°C y Tiempo de Integración de 40 segundos. ....	106
Figura 33. Temperatura de combustión a 950°C y Tiempo de Integración de 50 segundos. ....	107
Figura 34. Temperatura de combustión a 1000°C y Tiempo de Integración de 45 segundos. ....	108
Figura 35. Temperatura de combustión a 1000°C y Tiempo de Integración de 40 segundos. ....	109
Figura 36. Temperatura de combustión a 1000°C y Tiempo de Integración de 50 segundos. ....	110

## INDICE DE GRÁFICAS

Gráfico 1. Curva de calibración para la determinación de nitrógeno en harina de pescado .....	61
Gráfico 2. Diagrama de Pareto de los efectos estandarizados .....	67
Gráfico 3. Grafica de efectos principales para nitrógeno .....	68
Gráfico 4. Grafica de interacción para nitrógeno .....	69
Gráfico 5. Gráfico de probabilidad normal nitrógeno .....	70
Gráfico 6. Gráfica de residuos para el contenido de nitrógeno .....	71
Gráfico 7. Superficie respuesta para el contenido de nitrógeno % en función a temperatura de combustión y tamaño de muestra .....	73
Gráfico 8. Contorno de la superficie para el contenido de nitrógeno % en función a temperatura de combustión y tamaño de muestra .....	74
Gráfico 9. Superficie respuesta para el contenido de nitrógeno (%) en función a temperatura de combustión y tiempo de integración .....	75
Gráfico 10. Contorno de la superficie para el contenido de nitrógeno (%) en función a temperatura de combustión y tiempo de integración.....	76
Gráfico 11. Superficie respuesta para el contenido de nitrógeno (%) en función al tamaño de muestra y tiempo de integración.....	77
Gráfico 12. Contorno de la superficie para el contenido de nitrógeno (%) en función al tamaño de muestra y tiempo de integración .....	78
Gráfico 13. Repetibilidad de la muestra de harina de pescado por cada método .....	82
Gráfico 14. Repetibilidad de los tratamientos que detectan mayor cantidad de nitrógeno	86
Gráfico 15. Repetibilidad del tratamiento con menor coeficiente de variación .....	86
Gráfico 16. Correlación entre el método Kjeldahl y método Dumas de una misma muestra .....	88
Gráfico 17. Diferencia entre el método de Kjeldahl y el método Dumas .....	89

## INDICE DE ANÉXOS

Anexo 1. Determinación De Humedad.....	97
Anexo 2. Determinación De Ceniza.....	98
Anexo 3. Determinación De Grasa.....	99
Anexo 4. Determinación De Fibra.....	100
Anexo 5. Determinación de Nitrógeno por el Metodo Kjeldahl .....	101

## RESUMEN

La presente investigación tiene como objetivo Optimizar los parámetros de análisis del método dumas mediante la variación de temperatura de combustión, tiempo de análisis y tamaño de muestra, la metodología consiste en cuatro etapas; la primera etapa que es preparar al equipo CHNS 628 para el análisis, crear el método, el cual se introducen los parámetros (tiempo de integración: 40s, 45s, 50s; temperatura de combustión: 900°C, 950°C, 1000°C), la segunda parte consiste en la elaboración de la curva de calibrado, donde se utiliza el estándar EDTA con 9.56% de Nitrógeno el cual se tomó 5 puntos de tamaño de muestra (0,05gr; 0,10gr; 0,15gr; 0,20gr; 0.25gr) los cuales son ingresados al equipo Dumas CHNS 628 para crear un método y tener una curva de calibrado, la tercera parte consiste preparar la muestra de harina de pescado, el cual es homogenizado en un molino, posteriormente ser pesado sobre una lámina de estaño (0.1g, 0.2g, 0.3g) y ser envuelta en forma de una pera, la cuarta parte consiste en combustionar las muestras en el equipo y la obtención de los resultados, los resultados obtenidos por el equipo Dumas CHNS 628 se expresa en % nitrógeno, el cual posteriormente serán analizados por un diseño de superficie respuesta Box-Behnhen en un software estadístico (Statgraphics centurión XVII).



## I. INTRODUCCION

Existen varios métodos para la determinación cuantitativa del Nitrógeno orgánico, pero el método Kjeldahl sigue siendo el método de referencia ya que este es preciso y exacto, sin embargo este método es muy contaminante para el medio ambiente ya que en su proceso de digestión libera gases ( $\text{NH}_4$ ) contaminantes, para su desarrollo es necesario de adquirir reactivos controlados que son muy costosos en el mercado como el HCl, ácido sulfúrico QP, además el tiempo de análisis es de al menos 6 horas por muestra, que es una desventaja para aplicaciones industriales donde se requieren los datos para regular un proceso de fabricación.

Esta es la razón por el cual se buscó el método más rápido para la determinación de Nitrógeno orgánico, Dumas, basado en la conversión de los gases de combustión, la compañía LECO tiene en el mercado el analizador de Nitrógeno/Proteína CHNS628 que cuantifica el Nitrógeno de forma sistemática y automatizada basándose en el método de combustión Dumas, AOAC 990.03.

Debido a la necesidad de incrementar la velocidad de análisis que se llevan a cabo en los alimentos y reducir agentes contaminantes para el medio ambiente, se ha optado por introducir el uso de este equipo en los análisis rutinarios del instituto de investigación tecnológica agroindustrial (IITA) en la universidad Nacional del Santa de Nuevo Chimbote Ancash.

Está totalmente automatizado, y se puede medir el contenido de nitrógeno de una muestra muy rápidamente: en menos de 5 min. Se analizaron muestras de Harina de pescado en primer lugar mediante el análisis por defecto las condiciones recomendadas por el fabricante. Lo mismo muestra de harina de pescado se analizó sucesivamente muchas veces. El objeto de estudio de este proyecto es optimizar los parámetros de análisis del método Dumas mediante la variación de temperatura de combustión tiempo de análisis y tamaño de muestra.

## II. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

### 2.1. HARINA DE PESCADO

La pesquería industrial pelágica es la más desarrollada y la de mayor crecimiento desde los inicios de la actividad pesquera en la década de los 1950s, en la década de los 1960s la extracción basada en ese momento sólo en anchoveta se cuadruplicó pasando de 3,5 millones a 12 millones de toneladas; sin embargo, a principios de la década de los 1970s, el exceso de las capturas debido a la sobredimensionada capacidad de flota y de fábricas empleadas en la producción de harina de pescado (FAO, 2010).

Durante la década de los años cincuenta del siglo pasado, comenzó casi simultáneamente la industrialización de harina de pescado en el sur del Perú, sta se obtenía, y se continúa obteniendo, a partir de peces pelágicos (de superficie), anchoa y sardina en Perú y el norte de Chile, y posteriormente a partir del jurel en el sur de Chile; de esta forma la actividad dio origen al establecimiento de importantes consorcios pesqueros en ambos países. El producto de interés comercial fue siempre la harina de pescado por su alto contenido de proteína de buena calidad (Valenzuela Et al., 2012).

La harina de pescado es un producto industrial que se obtiene mediante la reducción de humedad y grasa del pescado entero, sin agregar sustancias extrañas salvo aquellas que tiendan a mantener la calidad original del producto (Medina 1993).

La utilización de harina de pescado aún se destina mayoritariamente dietas de ganado y pollos, que aun cuando su participación en ella ha disminuido producto de la investigación en nutrición animal, se ha producido un redestino de su uso hacia peces en cultivo, que la utilizan con una mayor eficiencia de conversión; así, este cambio de uso de la harina de pescado hacia la acuicultura representa claramente una utilización más amigable de este recurso desde un punto de vista ambiental (Figueroa, 2005).

La proteína en la harina de pescado tiene una alta proporción de aminoácidos esenciales en una forma altamente digerible, particularmente metionina, cisteína, lisina, treonina y triptófano; presentes en la forma natural de péptidos, éstos pueden ser usados con alta eficiencia para mejorar

el equilibrio en conjunto de los aminoácidos esenciales dietéticos, ésta ofrece muchos beneficios en la nutrición animal ya que aporta muchas proteínas y nutrientes; como ingrediente de alimentos para aves, aves ponedoras, cerdos, rumiantes, vacas lecheras, ganado vacuno, ovino, y animales acuáticos (camarón, pescado y otros), disminuyendo notablemente los costos de producción industrial de estos animales por su rápido crecimiento, su mejor nutrición, la mejora de la fertilidad y la notoria disminución de posibilidades de enfermedades (*Mariño Et al, 2012*).

### **2.1.1. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA HARINA DE PESCADO**

Al tener en su composición las harinas de pescado un 10% aproximado de materia grasa, ésta le da claramente una ventaja sobre todos los demás productos de origen vegetal y animal, ya que esta materia grasa contiene en su formulación ácidos grasos de cadena larga con elevada insaturación (5 a 6 insaturaciones) y de conformación Omega3; los principales ácidos grasos de este tipo son el EPA y el DHA, ácidos grasos que no se encuentran presentes ni en los alimentos proteicos vegetales ni animales (*Zaldívar, 2002*). Es una fuente de proteínas principalmente indispensable en la formulación de alimentos balanceados para acuicultura por su valor nutricional; su disponibilidad y su calidad son factores importantes para la obtención de alimentos balanceados de buena calidad, en México, los factores no son controlados, y la variabilidad en la calidad y disponibilidad de harina de pescado se ha detectado como un problema grave en la industria de alimentos balanceados (*Cruz - Suarez, 1988*).

En todo el mundo la elaboración de harina de pescado se lleva a cabo a partir de muy diferentes tipos de materias primas, lo que influye sobre la composición del producto final; algunas harinas de pescado están basadas en subproductos y vísceras procedentes de la industria de consumo humano (harinas de pescado blanco) y presentan típicamente un bajo contenido en proteína y grasa y un alto contenido

en cenizas, tras están basadas en subproductos de otras industrias de pescado y en consecuencia son muy variables en su composición (Sandbol, 1993).

**Tabla 1.** Análisis proximal (%) en 100 g de harina de pescado

<b>Harina de pescado</b>	<b>Cantidad</b>
Proteína cruda	72%
Aceite	10%
Humedad	8%
Sal (NaCl)	2.5%
Ammonia (NH <sub>3</sub> -N)	Max. 0.18%
TVN	50 mgN 100g <sup>-1</sup>

*Ruiter (1995).*

### **2.1.2. PRINCIPALES EMPRESAS PRODUCTORAS**

El proceso de elaboración de harina y aceite de pescado es intenso con el uso de maquinaria; por ello, los principales costos del sector, además de la materia prima, lo constituyen la energía utilizada en el proceso productivo, así como el mantenimiento e inversión de maquinaria. De hecho, según la Sociedad Nacional de Minería, Petróleo y Energía, la industria harinera es una de las más perjudicadas por el incremento del precio del petróleo; sin embargo, el aumento de los costos no ha sido perjudicial gracias a la mayor cotización internacional de la harina de pescado (Kleeberg y Rojas, 2012).

**Tabla 2.** Principales plantas harineras peruanas

	<b>TASA</b>	<b>Hayduk</b>	<b>Copeinca</b>	<b>Austral</b>	<b>Diamante</b>	<b>Exalmar</b>	<b>CFG</b>
	<b>Capacidad (Tn)</b>						
Paita	100	100		84			
Malabrigo	214	180				60	80
Chimbote	226		207	80		60	19
Samanco	60				75		
Supe	80	60			80		
Végueta	140	90					
Callao	251				144		
Pisco	239	40		120	174		
Matarani	140						
Mollendo	45				80		
Ilo	113	78	90	100	166		
Sechura		58					
Coishco		100					
Tambo Mora		80				80	40
Bayóvar			170				
Chicama			259				
Huarmey			142	133			79
Chancay			80	100	88		80
Huacho						84	
Ocoña							154

*Ramírez, 2014*

### **2.1.3. CLASIFICACIÓN DE HARINA DE PESCADO**

#### **2.1.3.1. *Harina F.A.Q. (fair average quality o harina de pescado de calidad promedio)***

Se obtiene principalmente de la anchoveta *Engraulisringens J.*, la cual es sometida a procesos industriales con todos sus órganos, incluyendo sus vísceras y, contenido intestinal, las calidades que se producen dependen básicamente del tipo de materia prima, la frescura de ésta y la calidad del proceso; la harina FAQ para alimentación avícola y ganadera, pescado es reconocida por los nutricionistas como el ingrediente predilecto de la más alta calidad y de digestibilidad que se incorpora en la dieta de la mayoría de los animales de granja; posee grandes cantidades de energía por unidad de peso y es una excelente fuente de energía, proteínas, lípidos, minerales y vitaminas; posee pequeñas cantidades de carbohidratos (Talledo, 2010).

#### **2.1.3.2. *Harina de pescado especial o tipo “prime”***

No existiendo aún una definición común para las harinas especiales, se puede afirmar que son aquellas elaboradas a partir de una materia prima muy fresca y procesada en plantas a bajas temperaturas (menores de 90 °C en todas las etapas), con corto tiempo de permanencia en cada operación unitaria, control de la producción por un sistema de calidad superior y permanente hasta su despacho al consumidor. Tampoco se puede hablar de una sola harina especial, hay varias harinas especiales cuyas características dependen del acuerdo entre el productor y el consumidor; por ello se encuentran nombres como harinas “prime”, “super prime”, super especiales, “especiales”, “aqua prime”, LT - 94 (Low Temperature y 94 % de Digestibilidad), (Pastor, 1995).

Una harina de pescado especial es aquella que se produce de una forma especial para una especie particular de animal,

para la cual tendrá beneficios especiales. El primer requisito, y quizás el más importante de una harina de pescado especial, es la uniformidad física y nutritiva. El tamaño de las partículas y la fluidez deberán ser constantes de una partida a otra, como también, el contenido de nutrientes deberá ser uniforme (*Pike, 1990*).

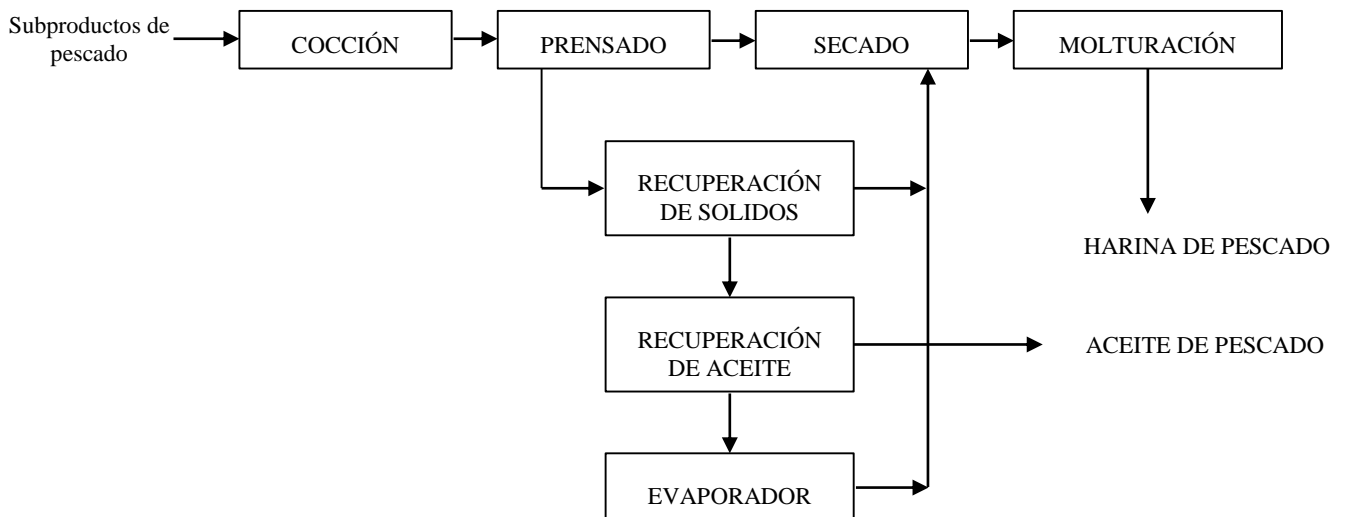
En nuestro país la producción de harina de pescado tipo “Prime” se intensifica hacia el año 1988 por la exigencia en el mercado mundial de harinas de pescado de mayor calidad, comenzando así la implementación de plantas con tecnología moderna de elaboración de harina, principalmente con el uso de secadores indirectos y plantas concentradoras de agua de cola de película descendente, así como de materia prima de óptimo grado de frescura. Actualmente, en nuestro país se encuentran operando 6 plantas modernas para la elaboración de harina de pescado tipo “Prime” (*Rojas, 1995*).

#### **2.1.3.3. Harina de pescado para consumo humano**

Las proteínas del músculo de pescado son equivalentes a un valor nutricional a las del músculo de otros animales y de la leche, por esta razón se ha tratado de utilizar la harina de pescado como suplemento dietético humano. Se establecen las siguientes especificaciones para el producto terminado: proteínas mínimo 75%, humedad máxima 10%, y grasa máxima 0.5% solventes residuales máximo, isopropanol máximo 250 ppm y dicloroetano máximo 5ppm debe estar libre de *Escherichia Coli* y organismos patógenos del género o tipo salmonella (*Martin, 2000*).

#### 2.1.4. PROCESOS INDUSTRIALES PARA HARINA DE PESCADO

El producto es obtenido por molturación y desecación de pescados enteros, de partes de éstos o de residuos de la industria conservera, a los que se puede haber extraído parte del aceite, el proceso normal de fabricación se inicia con el picado o molido del pescado, seguido de su cocción a 100°C, durante unos 20 minutos. Posteriormente, el producto se prensa y se centrifuga para extraer parte del aceite. En el proceso se obtiene una fracción soluble que puede comercializarse independientemente (solubles de pescado o agua de cola) o reincorporarse a la harina. El último paso es la desecación de la harina hasta un máximo de 10% de humedad. En las primeras etapas del proceso se añade un antioxidante para evitar el enranciamiento de la grasa y la posible combustión de la harina. Recientemente se han desarrollado nuevos procedimientos, como harinas especiales, harinas LT, los cuales se basan en la utilización de pescado entero fresco bien conservado y desecado a baja temperatura menor a 70°C (Graü, 2007).



**Diagrama 1.** Proceso industrial para obtención de harina de pescado.

Recuperado [http:// www.haarslev.com/ media/FishBrochure\\_ES.pdf](http://www.haarslev.com/media/FishBrochure_ES.pdf).



#### **2.1.4.1. Pozos de recepción y almacenamiento**

El proceso productivo se inicia una vez que la planta ha recibido la Materia Prima, en la Planta, el laboratorio de control de calidad se encarga de analizarlo para medir su grado de frescura, a través de la determinación del TVN (Nitrógeno Total Volátil) un primer análisis a la materia prima, éste índice cuantifica las bases nitrogenadas producidas durante el proceso de deterioro del pescado, y por consiguiente discrimina calidades de producto final, también se realizan otros análisis como el contenido de histamina, índice de peróxidos entre otros, con el fin garantizar que se recepciona un producto fresco, estos parámetros obtenidos en la recepción de materia tienen que estar dentro de los parámetros previamente normados, posteriormente la pesca es distribuida en el pozo o pileta de almacenamiento para ser procesada prioritariamente de acuerdo a su calidad.

#### **2.1.4.2. Cocinado**

Luego de la cocción del pescado, las proteínas se coagulan, gran parte del agua y el aceite se va, o se puede eliminar mediante prensado, mientras que el pescado crudo pierde muy poco de líquido, incluso a muy alta presión mecánica, una cocina industrial consiste esencialmente en un cilindro con chaqueta de vapor a través del cual los peces son movidos por un transportador de tornillo, algunas cocinas también tienen la facilidad para la inyección de vapor en el material de cocción; la operación de cocción es crítica; si los peces no están completamente cocidos, el líquido no hace presión de manera satisfactoria, y si el material cocido se vuelve demasiado blando para el prensado; la cocción tiene una importante acción desinfectante y ayuda a la hora de garantizar inocuidad.

#### **2.1.4.3. Prensado**

Esta etapa del proceso se elimina aceite y agua, y comienza cuando los peces se transportan a través de un tubo perforado, mientras que es sometida a una presión creciente, normalmente por medio de un eje cónico en el transportador de tornillo; una mezcla de agua y aceite se exprime a través de las perforaciones y el sólido, conocido como torta de prensa, emerge desde el extremo de la prensa, durante el proceso de prensado el contenido de agua puede reducirse de aproximadamente 70 % y el contenido de aceite reduce a aproximadamente a 4%.

#### **2.1.4.4. Proceso del líquido de prensa**

Después de tamizar para eliminar trozos gruesos de material sólido, el líquido de las prensas se centrifuga continuamente para eliminar el aceite; el aceite se refina aún más veces en una centrífuga final, un proceso conocido como pulido, antes de ser bombeado a tanques de almacenamiento; el aceite refinado es valioso y se utiliza en la fabricación de aceites y grasas comestibles, por ejemplo margarina; la porción de agua del líquido, conocida como agua de cola, contiene material disuelto y sólidos finos en suspensión que puede ascender a cerca de 9% en peso, los sólidos son en su mayoría proteínas y agua de cola puede contener tanto como 20% de los sólidos totales, de manera que es normalmente bien vale la recuperación; el material se recupera por evaporación del agua de cola a un jarabe espeso que contiene 30% a 50% de sólidos, y a veces comercializa por separado y conocido como solubles de pescado condensados; más generalmente sin embargo, el producto concentrado se añade de nuevo a la torta de prensa y se seca junto con él para hacer lo que se conoce como comida completa.

#### **2.1.4.5. Secado**

Aunque básicamente una operación simple, se requiere una habilidad considerable para conseguir las condiciones de secado justo, si el alimento no se seca totalmente, mohos y bacterias pueden ser capaces de proliferar; si es sobresecado, se puede reducir el valor nutricional de la alimento; hay dos tipos principales de secadora, directos e indirectos, en el secador de aire directo es muy caliente y la temperatura alcanza hasta 500°C, se hace pasar sobre el material a medida que se voltea rápidamente en un tambor cilíndrico; este es el método más rápido, pero el daño por calor es mucho más probable si el proceso no se controla cuidadosamente; la harina de pescado no llega a la temperatura del aire caliente, debido a la rápida evaporación del agua de la superficie de cada partícula; normalmente la temperatura del producto se mantiene a aproximadamente 100°C; el tipo más habitual del secado indirecta consiste de un cilindro con camisa de vapor o un cilindro que contiene los discos con calefacción de vapor que también hacen girar la comida; gran parte del olor desagradable a partir de plantas de harina de pescado se origina de la secadora; secadores indirectos, que normalmente se utilizan en el Reino Unido, causan menos molestias, ya que utilizan menos aire.

#### **2.1.4.6. Enfriamiento**

Después del secado la harina sale con la humedad deseada, pero a una temperatura no conveniente para ser envasada inmediatamente; por ello se le disminuye la temperatura antes de ser embolsada, por lo general, la harina de pescado sufre la oxidación de sus grasas, por ser un producto higroscópico (absorción de humedad) y absorbe oxígeno, para evitarlo, el producto es envasado frío y se estabiliza con antioxidantes.

#### **2.1.4.7. Molienda**

Las operaciones finales están moliendo para romper los grumos y partículas de hueso, y el embalaje de la comida en bolsas o almacenamiento en silos para la entrega a granel.

#### **2.1.4.8. Envasado**

Una vez agregado el antioxidante, la harina pasa a la etapa de envasado, en ésta se introduce el producto en sacos según la necesidad de cada cliente (*FAO, 2010*).

### **2.1.5. USOS DE LA HARINA DE PESCADO**

Hasta hace muy poco tiempo el uso principal de la harina de pescado era en la producción de alimentos para animales. Sin embargo, en los últimos años se ha dado importancia a su empleo en la alimentación humana.

#### **2.1.5.1. Uso en la Alimentación Animal**

Desde hace más de 50 años la harina de pescado se emplea como alimento proteínico para la alimentación de cerdos, aves de corral y ganado vacuno; igualmente, la harina de pescado tipo “prime” se está empleando en la acuicultura en general, así como en harina para salmones, truchas, langostinos, camarones, anguilas y otro tipo de peces. También, se usa en la alimentación de cerditos precozmente destetados y marranas en gestación, así como para animales de peletería (*Rojas, 1995*).

Es importante mencionar, los estudios realizados por la Universidad Nacional Agraria La Molina; la cual ha promovido ampliamente la investigación sobre análisis de la calidad biológica de la harina de pescado en diversas especies animales como aves de corral, cerdos y vacas. Durante estas pruebas de alimentación se evalúa principalmente a la harina en función a su digestibilidad, el

crecimiento del animal y la eficacia del pienso (*Pesca, 1962*).

En estos estudios se evaluaron niveles elevados de enriquecimiento, los cuales llegaron a 10% en dietas de acabado de pollos de carne y gallinas en producción. Asimismo, en vacunos de carne, dietas con niveles de 23% de harina de anchoveta fueron suministradas hasta el beneficio sin afectar el sabor de la carne. Estos resultados mostraron la factibilidad de sustituir parcial o totalmente, en las raciones para pollos de carne, la harina de soya por este insumo nacional (*Rojas, 1995*).

#### **2.1.5.2. Uso en Alimentación Humana**

Los organismos internacionales como FAO, OMS y UNICEF han reconocido la importancia del desarrollo de una harina de pescado de buena calidad que permita su uso como un complemento proteínico (*FAO, 1961*).

La harina de pescado para consumo humano es de buena calidad organoléptica y alimenticia y de precio moderado. La utilidad de este producto aumenta por el hecho de que nutre adecuadamente en combinación con los cereales - maíz, trigo, arroz, etc.- en proporciones hasta del 5% (*Del Valle, 2008*).

A nivel mundial, los primeros reportes sobre el uso de harina de pescado en la alimentación humana datan del año 1937 en África del Sur, en donde se inició una campaña masiva para complementar la dieta de los habitantes de esa región con harina de pescado, en Alemania, casi simultáneamente, se produjo la llamada “Proteína Viking” en base a la harina de pescado; esta podía utilizarse en pasteles, tortas, dulces, etc. Poco después se vendió en forma de tabletas, durante la Segunda Guerra Mundial, se enriqueció el pan con harina de pescado, en el Lejano Oriente, desde tiempos remotos, se muele el pescado seco, se macera y se obtienen condimentos que, según los

pescadores de esa región, son muy nutritivos y no perjudican la salud, en Noruega, se elabora una harina de arenque de óptima calidad con la ventaja de que el sabor es neutro, en los Estados Unidos de Norteamérica las empresas VioBin y Smith han logrado producir harinas de pescado inodoras, insaboras y con un contenido proteico de 80%; en Chile, en la planta experimental de Quintero, la harina de pescado ha sido empleada con éxito en la elaboración de pan y otros alimentos compuestos, asimismo, en Chile se alcanzaron niveles del 10% de harina de pescado en panes destinados a la alimentación escolar (*Van Veen y Van Veen, 1973*).

A principios de 1960, en el Perú se realizó una importante investigación en la alimentación de niños desnutridos menores de dos años de edad con concentrados de proteína de pescado con favorables logros; éstos estudios fueron realizados por un convenio entre el CINI (Centro de Investigación de Nutrición Infantil), la clínica Anglo-Americana y la Universidad Nacional Agraria La Molina, Se estudió cuatro comunidades rurales, las cuales recibieron fideos enriquecidos con un 10% de harina Vio Bin ( Harina de anchoveta con vísceras y cabeza, desodorizada y desgrasada con etanol como solvente); asimismo, se realizaron estudios con niños malnutridos del CINI a los que se les dió papillas enriquecidas con harina Vio Bin, en el primer estudio, aparte de mejorar el desarrollo físico, se observó una disminución de la mortalidad en el grupo preescolar. En el segundo, el enriquecimiento con harina de pescado fue satisfactorio en la mayoría de los casos de marasmo, no así en el marasmo- kwashiorkor (*Ramírez, 1974*).

Tal como se menciona, en el Nestlé Research News, 1979 y además en ese mismo año por la Torry Research Station, la introducción de un nuevo alimento proteico no puede descuidar aspectos imprescindibles como el ambiente social, los hábitos alimentarios y los patrones culturales de la población para quienes los productos son desarrollados. Actualmente, el uso de harina de pescado en la alimentación humana tiende a incrementarse en el mundo, principalmente en países Asiáticos y europeos (FAO. 1990, 1991, 1992, 1993, 1994, 1995, 1996).

El Perú tuvo en 1994, una producción de 370 mil toneladas de harina de pescado especial “prime”. Este tipo de harina especial corresponde al concentrado de pescado tipo “B” que se elaboró en Noruega en la década de los 70 con pescado de óptima calidad, procesado entero por el método convencional pero a bajas temperaturas, dicho concentrado fue donado a países con problemas de hambruna por intermedio del Programa Mundial de Alimentos; por lo tanto, la harina de pescado especial es un insumo adecuado para fortificar los alimentos de consumo masivo tales como los elaborados con harina de trigo. Esta fortificación no sólo provee proteína adicional, sino también un mejor balance de aminoácidos, elevando la disponibilidad de la proteína presente en el alimento fortificado, lo mismo que la tasa de eficiencia proteica (P.E.R.), a niveles comparables a los encontrados en la leche, la harina de pescado especial en alimentos como enriquecidos lácteos, papillas instantáneas, puede reemplazar a la leche en polvo en forma económica (El costo de una tonelada de proteína de leche sobrepasa los us\$ 11,500, mientras que una tonelada de proteína de harina de pescado especial no llega a US\$ 1,000), la Universidad Nacional Agraria La Molina e Instituciones afines, tienen la capacidad instalada y además los expertos profesionales para seleccionar la harina de pescado especial de la más alta

calidad, diseñar y desarrollar los alimentos enriquecidos, los que luego de reproducirlos industrialmente, podrían harían llegar a la mesa del pobre para enriquecerlo física y mentalmente. Algunos de los alimentos fortificados con la proteína de mar pueden ser: Pan de trigo, camote pa, papapan, fideos y pastas en general, galletas dulces y galletas saladas, enriquecidos lácteos, papillas instantáneas, harinas compuestas para sopas, etcétera (*Rojas, 1995*).

## **2.2. PROTEINAS**

Las proteínas son biomoléculas de elevado peso molecular (macromoléculas) y presentan una estructura química compleja, tienen un papel fundamental en la estructura y función de las células vivas, el término proteína fue utilizado por primera vez por el químico alemán Gerardus Johannes Mulder, en 1838, para nombrar a un grupo específico de sustancias muy abundantes en todas las plantas y animales, Mulder pronosticó correctamente la importancia de las proteínas; tomó este nombre del vocablo griego proteicos que significa primordial o de nivel primario (*Boyer, 2000*).

Las proteínas son el principal componente estructural y funcional de las células y tienen numerosas e importantes funciones dentro del organismo que van desde su papel catalítico (enzimas) hasta su función en la motilidad corporal (actina, miosina), pasando por su papel mecánico (elastina, colágeno), de transporte y almacén (hemoglobina, mioglobina, citocromos), protección (anticuerpos), reguladora (hormonas), etcétera, desde el punto de vista nutricional la proteína es un macronutriente presente en los alimentos, la importancia de la proteína presente en la dieta se debe a su capacidad de aportar aminoácidos para atender al mantenimiento de la proteína corporal y al incremento de esta durante el crecimiento, a limitación en el aporte de energía y de proteína conduce a un retraso en el crecimiento (*Martínez, 2006*).



Las proteínas se caracterizan por su función y mecanismo de acción, independientemente de sus propiedades generales, tales como tamaño, forma, comportamiento anfófilo, solubilidad, etc; dichas funciones dependen por completo de la secuencia de los aminoácidos que la componen y es definida para cada proteína; si se cambiase un solo aminoácido de la secuencia, es considerablemente probable que la proteína pierda actividad biológica, dicha secuencia aminoacídica en las proteínas está definida por una secuencia de bases en el ADN que forma los genes (*Bohinski, 1991*).

### **2.2.1. CLASIFICACIÓN SEGÚN SU FUNCIÓN BIOLÓGICA**

Las proteínas se sintetizan en las células a partir del ARN (ácido ribonucleico) mensajero mediante procesos de transcripción, el ARN mensajero y un ARN transferente unido a un aminoácido, forman las cadenas de proteínas constituidas por secuencia de aminoácidos, que determinan la estructura espacial tridimensional y por tanto, la actividad biológica de las proteínas, las proteínas se clasifican en (*Bohinski, 1991*):

#### **2.2.1.1. *Proteínas con actividad enzimática***

Estas proteínas regulan todos los procesos metabólicos actuando como catalizadores de reacción, mediante la presencia de centros activos que permiten regular la mayoría de las reacciones bioquímicas, ello hace que sean esenciales para los procesos de metabolización de hidratos de carbono, ácidos grasos y proteínas (*Morrison y Boyd, 1998*).

#### **2.2.1.2. *Proteínas con actividad estructural***

Este tipo de proteínas determinan la estructura y actividad de músculos, piel, ojos, cornea, etc. Las proteínas que forman parte del cabello (queratina), uñas, estructuras córneas, óseas o piel, determinan la forma física final de cada órgano, siendo el colágeno esencial para la estructura

del manto hidrolipídico y la formación de las estructuras óseas, las proteínas también forman parte de las estructuras de las membranas celulares, las cuales, junto con los lípidos, establecen las condiciones de barrera de permeabilidad selectiva (*Morrison et Boyd, 1998*).

### 2.2.2. CLASIFICACIÓN SEGÚN LOS PRODUCTOS DE HIDRÓLISIS

Según los productos que originan al hidrolizarse, las proteínas se dividen en dos grupos: las simples o naturales que, por hidrólisis, dan  $\alpha$ -aminoácidos o derivados de éstos y los proteicos, que, aparte de formar aminoácidos en la hidrólisis también se desdoblán a grupos no peptídicos llamados grupos prostéticos mostrados en la tabla 3 (Marauilla y Goñi, 2002).

**Tabla 3.** Clasificación de las proteínas según sus productos de hidrólisis.

	<b>Nombre</b>	<b>Grupo protéico</b>
Proteínas simples	Albúminas	
	Globulinas	
	Escleroproteínas	
	Cromoproteídos	Componente de color
	Glucoproteínas	Carbohidrato
Proteídos	Metaloproteínas	Ión metálico
	Hemoproteínas	Grupo Hemo
	Flavoproteínas	Flavina
	Lipoproteínas	Lípido
	Fosfoproteídos	Fosfato
	Nucleoproteídos	Nucleótido

Cheftel et al., 1989.

### 2.2.3. COMPOSICIÓN ELEMENTAL DE LAS PROTEÍNAS

Al igual que los lípidos y carbohidratos, las proteínas contienen en su composición carbono, hidrógeno y oxígeno, además de un porcentaje constante y considerable de nitrógeno en términos

prácticos, la cifra más común usada es 16 %, la mayoría de las proteínas contienen también azufre y algunas tienen fósforo y hierro; son sustancias complejas de naturaleza coloidal y de alto peso molecular.

**Tabla 4.** Composición elemental de las Proteínas

<b>Elemento</b>	<b>%</b>
Carbono	51.0 – 55.0
Hidrógeno	6.5 – 7.3
Nitrógeno	15.5 – 18.0
Oxígeno	21.5 – 23.5
Azufre	0.5 – 2.0
Fósforo	0.0 – 1.5

Cheftel et al., 1989.

#### **2.2.4. CALIDAD NUTRICIONAL DE LAS PROTEÍNAS**

Las proteínas en los alimentos proporcionan los aminoácidos con los que se sintetizan las muestras, bajo la acción de las enzimas hidrolíticas, en el estómago y en el intestino delgado, las proteínas de los alimentos se degradan para liberar sus aminoácidos constitutivos. Absorbidos al torrente circulatorio, pasan a formar parte de una reserva llamada “lábil” de aminoácidos de nuestro organismo (*Madl, 1993*).

La degradación de las proteínas tisulares contribuye de igual manera a ese lábil, el cual es utilizado, no solo para síntesis de proteína, sino también para proporcionar las materias primas precisas para la síntesis de purinas, pirimidinas, porfirinas y otras sustancias: equilibrar la composición de suministro de aminoácidos y las necesidades y las necesidades para la síntesis es una de las funciones más importantes del hígado, en términos ideales, la proteína de la dieta debería proporcionar aminoácidos en las mismas proporciones

relativas en que son necesarios para la síntesis de las proteínas corporales, pero esta situación ideal no se da nunca; la calidad excede de un determinado aminoácido se degrada; los esqueletos carbonados se oxidan para producir energía o para su almacenamiento en forma de grasa. El nitrógeno o se excreta como urea o se utiliza en la síntesis de los aminoácidos no esenciales suministrados en cantidades deficitarias (*Osborne and Voogt, 1978*).

#### **2.2.5. DETERMINACIÓN ANALÍTICA DE PROTEÍNA.**

Las fuentes de nitrógeno no son únicamente las proteínas del sistema biológico, de estas pueden derivarse también péptidos, aminoácidos libres y compuestos nitrogenados de naturaleza no proteica, determinando así nitrógeno total y así calcular el porcentaje de proteína calificándolo como “cruda”. He aquí la importancia de la determinación de nitrógeno en cuantificación de la fracción de proteínas sin interferencias como los lípidos y carbohidratos; en el análisis de alimentos se tiene el supuesto de que la proporción de nitrógeno no proteico en un producto alimenticio es demasiado pequeña para ser significativa, y que una determinación de nitrógeno total refleja con suficiente precisión la riqueza en proteína (*FAO, 2015*).

#### **2.2.6. BALANCE DE NITRÓGENO.**

Sabemos que un aminoácido estaría formado por un grupo amino ( $-NH_2$ ) y un grupo carboxilo ( $-COOH$ ). Los aminoácidos contienen, C, H, O y N, algunos S. El catabolismo de los aminoácidos daría como resultado  $CO_2$ ,  $H_2O$ , productos finales nitrogenados (principalmente urea) y sulfatos, “La primera etapa del catabolismo proteico comprende la extracción del grupo amino (desaminación), que es donde se encontraría el nitrógeno, éste nitrógeno de los aminoácidos tiene fundamentalmente dos destinos en el organismo, puede ser extraída del aminoácido (desaminación), como vimos, y eliminada en el organismo principalmente en forma de urea. Y en otros casos puede ser transferida de un aminoácido a un cetoácido,

formando de este modo un aminoácido diferente (transaminación), llevada a cabo principalmente en el hígado” (*Brobeck, 2003*).

El nitrógeno del alimento representa en gran proporción al nitrógeno proteínico. Por otro lado, la mayor parte del nitrógeno es excretado por la orina como urea, creatinina, amoniaco y ácido úrico. El nitrógeno de la materia fecal representa, en su mayor parte, un producto de descamación intestinal o de la flora bacteriana, de la determinación del nitrógeno dietético, el nitrógeno urinario y fecal se deriva el concepto de balance de nitrógeno. En general, cuando un animal adulto excreta diariamente una cantidad de nitrógeno igual a la ingerida se dice que la digestibilidad es igual a 100 y el balance de nitrógeno está en equilibrio, es decir, no existe diferencia entre lo ingerido y lo excretado (*Suárez et al., 2006*).

## **2.3. MÉTODOS ANALÍTICOS CONVECIONBALES PARA LA DETERMINACIÓN DE NITROGENO/PROTEINA**

### **2.3.1. MÉTODO KJELDAHL**

Johan Kjeldahl introdujo por primera vez su método en 1883, en una reunión de la Sociedad Química de Dinamarca; como presidente del departamento de química de la Carlsberg Laboratorium, cerca de Copenhague, Kjeldahl fue asignado para observar científicamente los procesos que intervienen en la fabricación de cerveza, mientras que él estudió de las proteínas durante la producción de malta, desarrolló un método para determinar el contenido de nitrógeno que era más rápido y más preciso que cualquier método disponible en el momento; su método utiliza un equipo sencillo y puede ser realizado por un técnico sin experiencia (*Labconco, 1998*).

El método Kjeldahl, fué el principal método utilizado por los centros de investigación para generar los estándares nutricionales de nitrógeno que actualmente usamos en el agro y que nos permiten verificar si nuestras plantas se encuentran con sus niveles nutricionales adecuados y con ello, programar la fertilización del

cultivo o huerto, el método Kjeldahl corresponde a una digestión ácida donde el nitrógeno (N) total es convertido a  $\text{NH}_4$  y luego se analiza el  $\text{NH}_4$  mediante colorimetría; el método, efectivamente subestima los contenidos de nitrógeno que puedan existir en forma inorgánica o en forma de nucleótidos, sin embargo, estos niveles son bastante bajos (*Simonne Et Al 1997*).

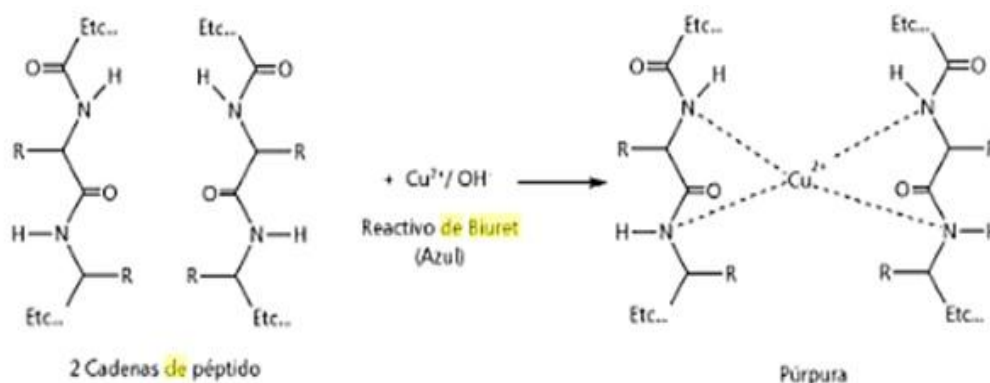
En este método se dirige a la materia orgánica con ácido sulfúrico concentrada caliente, para elevar su punto de ebullición del ácido se le añade una mezcla catalizadora, que normalmente contiene un verdadero agente catalítico (mercurio, cobre o selenio) junto con sulfato de potasio, todo el nitrógeno orgánico se convierte en amoníaco, que se suele medir mediante titulación o, en ocasiones raras mediante colorimetría, en el método original se utilizaba una porción analítica relativamente grande (1g a 2g), pero esto exige grandes cantidades de ácido; es mucho más habitual el uso de microkjeldahl, puesto que producen una cantidad reducida de humos ácidos y también necesitan menos ácidos y mezcla catalizadora (*Greenfield and Southgate, 2006*).

### **2.3.2. MÉTODO BIURET**

Métodos de cuantificación de proteínas espectrofotométrica son métodos que usan UV y espectroscopía visible para determinar rápidamente la concentración de proteína, con relación a un estándar o usando un coeficiente de extinción asignado, el método Biuret se basa en la reacción de  $\text{Cu}^{2+}$  con grupos funcionales en enlaces peptídicos de la proteína, la formación de un complejo de proteínas  $\text{Cu}^{2+}$  requiere dos enlaces peptídicos y produce un producto de quelato de color violeta (*Vrsanska, 2015*).

El método Biuret se basa en la formación de complejos de  $\text{Cu}^{2+}$  a grupos funcionales en enlaces peptídicos de la proteína, la formación de un complejo de  $\text{Cu}^{2+}$  proteína requiere dos enlaces peptídicos y produce un producto quelato de color violeta que se mide por

espectroscopía de absorción a 540nm, en el rango de la concentración dada, la absorción medida a 540 nm es lineal con respecto a la concentración de proteína total, esta relación permite una curva estándar que se cree que se utiliza para calcular la concentración de una muestra desconocida (Kruezigler, 2009).

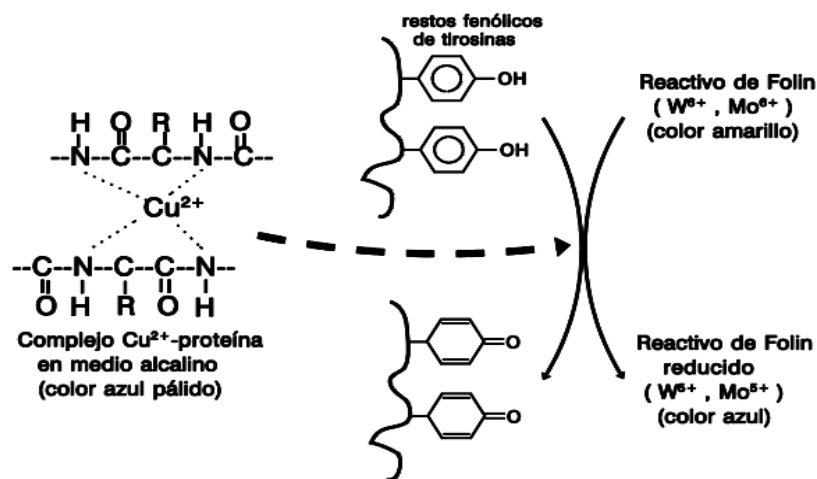


**Figura 1.** Complejo de Cobre obtenido en la reacción de Biuret. Obtenido de <http://biocoments.blogspot.pe/2016/04/prueba-de-biuret-proteinas.html>

### 2.3.3. MÉTODO DE LOWRY

El método de Lowry (1951) utiliza tres sistemas para producir coloración por la presencia de proteínas, en primer lugar, el  $\text{Cu}^+$ , forma complejos de coordinación dos enlaces peptídicos consecutivos de las proteínas, dando lugar a un compuesto coloreado azul, similar al método Biuret; en segundo lugar este compuesto es capaz de reducir al reactivo de Folin-Ciocalteu (ácido fosfotúngstico y fosfomolibdico), dando un color más azulado; por último el reactivo de Folin-Ciocalteu también reacciona con los restos de tirosinil (residuos de tirosina) de la cadena polipeptídica, produciendo asimismo un color azul por la reducción de fosfomolibdato en medio básico; el espectro de absorción no corresponde a la única sustancia, por lo que puede emplearse un amplio margen de longitudes de onda, entre 500 y 700nm, para la

lectura de la absorbancia ; éste método es unas 100 veces más sensibles que el de biuret, la sensibilidad es una ventaja cuando se miden concentraciones muy bajas de proteína, éste método es muy utilizado en investigación , sobre todo para determinación cuantitativa de proteínas tisulares y enzimas en preparaciones purificadas (Roca Et al., 2003).



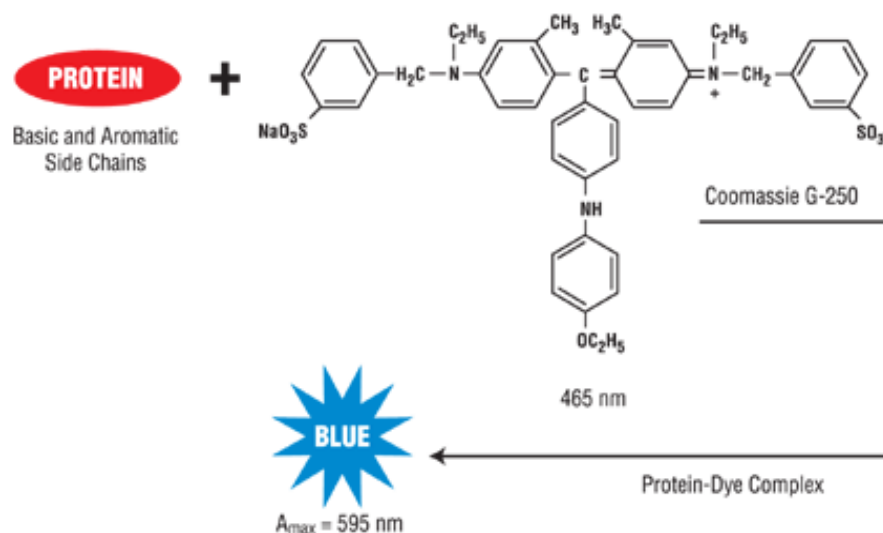
**Figura 2.** Reacción de Proteína y los reactivos. Recuperado de <http://devbio.wustl.edu/InfoSource/ISPDFs/Lowrybio.pdf>

#### 2.3.4. MÉTODO DE BRADFORD

El método Bradford se basa en la unión del colorante azul de Coomassie G 250 a la proteína; estudios detallados indican que el colorante libre puede existir en cuatro formas iónicas diferentes para las que los valores de pKa son 1,15, 1,82 y 12,4, de las tres formas cargadas de colorante que predominan en la solución de reactivo de ensayo de ácido, las formas rojas y verdes más catiónicas tienen máximos de absorbancia a 470 nm y 650 nm, respectivamente; en contraste, la forma azul más tensioactivos aniónicos del tinte, que se une a la proteína, tiene un máximo de absorbancia a 590 nm. Por lo tanto, la cantidad de proteína se puede estimar mediante la determinación de la cantidad de colorante en la forma iónica azul. Esto generalmente se logra mediante la medición de la absorbancia



de la solución a 595 nm; el colorante parece unirse más fácilmente a arginilo y lisilo residuos de proteínas, esta especificidad puede conducir a la variación en la respuesta del ensayo a diferentes proteínas (Walker, 2009).



**Figura 3.** Esquemática de reacción para Coomassie Plus – Del ensayo Better Bradford, Recuperado de <http://www.qcbio.com/pierce/23236.htm>

## 2.4. MÉTODO DE COMBUSTIÓN DUMAS

Gay-Lussac y Thénard en 1810, fueron los primeros en determinar nitrógeno en sustancias orgánicas, su método consistía en quemar la sustancia en presencia de clorato de potasio y analizar los gases desprendidos posteriormente Gay Lussac en 1815 y Johann Wolfgang Döbereiner en 1816 introdujeron el uso del óxido de cobre en lugar del clorato de potasio como oxidante de la materia orgánica y este método, perfeccionado por Justus von Liebig, se transformó, en sus aspectos esenciales, en el que se usó durante más de un siglo para el análisis elemental de compuestos orgánicos; el método de combustión para determinar nitrógeno en compuestos orgánicos fue creado por Dumas en el año 1830 (Fisher, 2012).

La principal contribución de Liebig fue el diseño en 1831, de un aparato para llevar a cabo la combustión de las muestras que mejoraba el sistema de

calentamiento de Berzelius, asimismo introdujo la determinación del dióxido de carbono mediante pesada, previa retención del gas en hidróxido potásico, en sustitución de la medida del volumen de gas como hasta entonces se había hecho; la determinación del contenido de nitrógeno en sustancias orgánicas no se consiguió con resultados satisfactorios hasta que Dumas mejoró, en 1831, un complicado y tedioso método que había propuesto Liebig (*Lopez, 2005*).

En 1831 Dumas ideó un método por el cual los gases se recogieron en un tubo de eudiómetro lleno de hidróxido alcalino, eliminando así la necesidad de la absorción de dióxido de carbono separado; la otra innovación importante en este procedimiento fue el uso de dióxido de carbono, generado por calentamiento de carbonato de plomo, para eliminar los productos de combustión, Dumas utiliza cobre para la reducción de óxidos de nitrógeno después de activar primero el cobre por calentamiento en una corriente de hidrógeno, éste método para la determinación de nitrógeno está todavía en uso (*Szabadváry, 2016*).

El método de combustión (CM) es otro método de un siglo de antigüedad para la determinación de elementos tal como carbono, hidrógeno, nitrógeno y de azufre en una gran variedad de materiales, el proceso de combustión se lleva a cabo con una dosis de oxígeno de alta pureza y la resultante los gases se recogen en un tanque hasta que la presión alcanza un valor predeterminado; el enfoque aplicado en el presente estudio se basa en un flash la combustión de la muestra en un flujo continuo de helio como gas portador, en el que una pequeña dosis del oxígeno se suministra (*Marcó, 2002*).

El método Dumas consiste en la combustión de una muestra de masa conocida a alta temperatura en presencia de oxígeno; los gases producidos son entonces reducidos por el cobre y se seca mientras que el CO<sub>2</sub> queda atrapado, finalmente, nitrógeno se cuantifica usando un detector universal (*Serrano Et Al., 2013*).

El método de combustión Dumas es un método absoluto para la determinación del contenido de nitrógeno total en una matriz orgánica general, la muestra se quema a alta temperatura en una atmósfera de oxígeno; a través de tubos de oxidación y posterior reducción, nitrógeno se

convierte cuantitativamente a  $N_2$ ; otros productos de la combustión son volátiles ya sea atrapado o separados. Un detector de conductividad térmica mide gas nitrógeno, los resultados se dan como % o mg de nitrógeno, que puede ser convertido en proteína mediante el uso de factores de conversión (*Müller, 2014*).

Una muestra 1g aproximadamente se pesa con precisión y colocado en un crisol de cerámica, este crisol se coloca entonces en un horno de alta temperatura (1050 °C) en una atmósfera de oxígeno, la muestra es quemada y los elementos orgánicos son oxidados, los gases de combustión ( $O_2$ ,  $CO_2$ ,  $H_2O$ ,  $N_2$  y óxidos de nitrógeno  $NO_x$ ); la mezcla se lleva entonces a una celda de conductividad térmica que emite una señal eléctrica al nitrógeno contenido y esta señal se integra más de 40s el final resultado se calcula a partir de una curva calibración previamente establecida (*Thierry, 2004*).

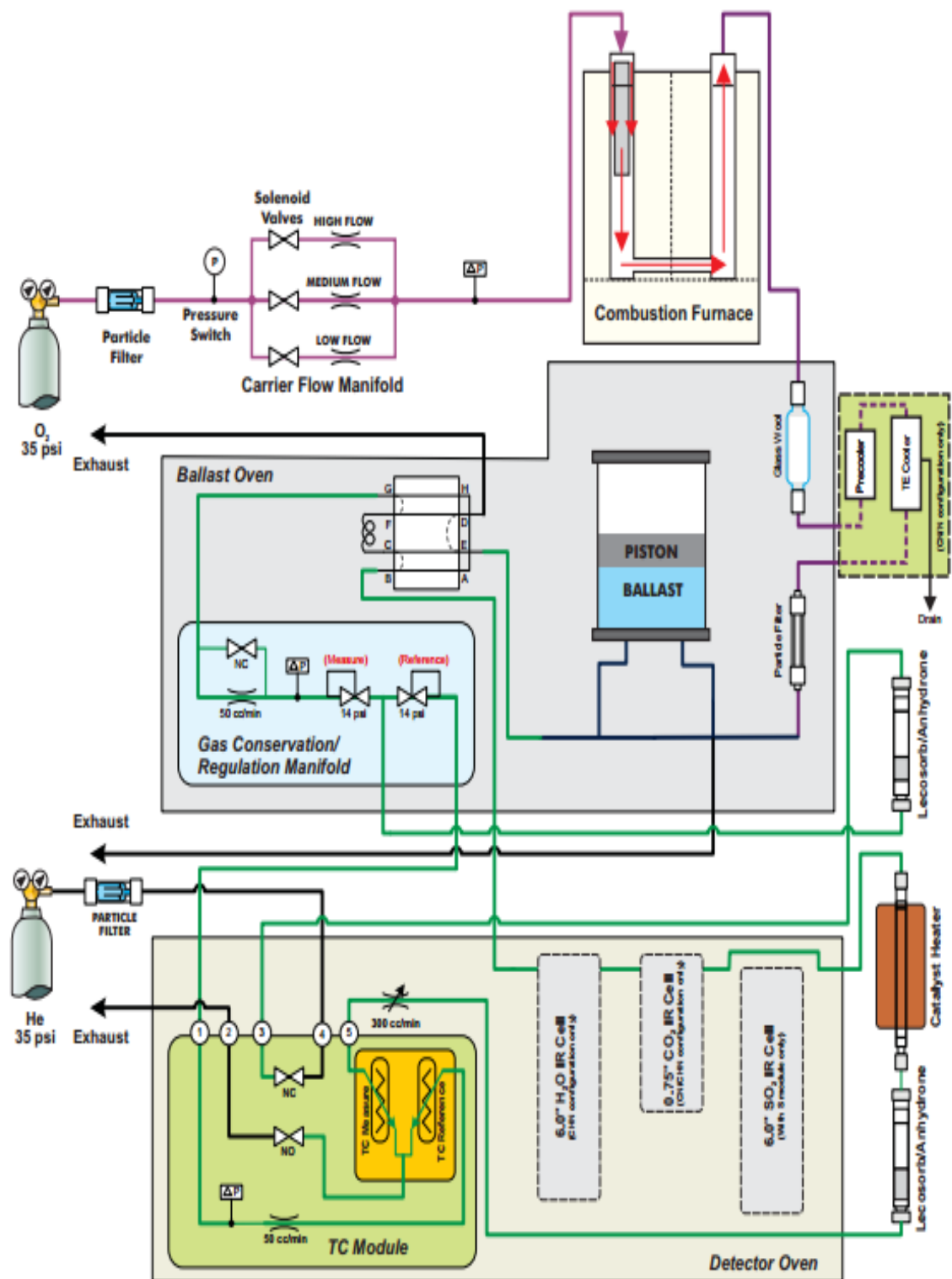
#### **2.4.1. EQUIPO DUMAS CHNS 628 (LECO)**

El CHN628 Serie Elemental se utiliza para determinar nitrógeno, carbono /nitrógeno, y de carbono / hidrógeno / nitrógeno en matrices orgánicas el instrumento utiliza una técnica de combustión y proporciona un resultado el plazo de 4,5 minutos para todos los elementos que se están por determinar el instrumento dispone de un software personalizado basado en Windows ® operado a través de un PC externo para controlar la gestión de la operación y los datos del sistema; una muestra pesada previamente y encapsulado se coloca en el cargador del instrumento, donde la muestra se transfiere a la cámara de purga del instrumento directamente encima del horno, la eliminación de los gases atmosféricos del proceso de transferencia; La muestra se introduce a continuación en el horno primario que contiene solamente oxígeno puro, resultando en una rápida y completa de combustión (oxidación) de la muestra, Carbono, Hidrógeno y nitrógeno presente en la muestra se oxidan con el carbono dióxido ( $CO$ ), agua ( $H_2O$ ), y  $NO_x$ , respectivamente, y son arrastrados por el portador de oxígeno a través de un horno de secundaria para continuar con la oxidación y eliminación de

partículas; en los modelos de PF y CN628, los gases de combustión pasan a través de un pre-enfriador y refrigerador termoeléctrico para eliminar el vapor de agua, los gases de combinación se recogen entonces en un recipiente conocido como balastro para el equilibrado, los gases homogeneizados del balastro se barren a través de un bucle de alícuota de 10 cc y luego pasan a un gas portador de helio; las celdas no dispersivas de infrarrojo optimizado (NDIR) se utilizan para la detección de H<sub>2</sub>O y CO<sub>2</sub> aseguran el rápido tiempo de análisis del sistema, los gases NO<sub>x</sub> se pasan a través de un tubo lleno de reducción de cobre de para reducir los gases a N<sub>2</sub> y eliminar cualquier exceso de oxígeno presente en el proceso de combustión; el gas alícuota después pasa a través de Lecosorb y anhídrona para eliminar el CO<sub>2</sub> y el agua generada durante el proceso de captura de CO<sub>2</sub> en una celda de conductividad térmica (TC) utilizado para detectar el N<sub>2</sub>, los resultados finales típicamente muestran en porcentaje en peso o partes por millón, pero se pueden visualizar en otras unidades o personalizados las conversiones, como porcentaje de proteína total de humedad corregido, y otros (Leco Corporation).



**Figura 4.** Analizador Dumas CHNS 628. Recuperado de Leco Corporation



**Figura 5.** Diagrama de Flujo de CHNS 628. Recuperado de LECO Corporation.

#### **2.4.2. CELDA DE CONDUCTIVIDAD TÉRMICA**

La celda de conductividad térmica (TC) tiene la capacidad de detectar diferencias en la conductividad térmica de gases, ésta celda TC es operado en un modo optimizado de nitrógeno, la celda consiste en dos pares de filamentos pareados utilizados en cuatro puntos de un puente de Wheatstone, los filamentos de "referencia" se mantienen en un ambiente de flujo de gas y de gas constante, mientras que los filamentos de "medida" se mantienen en un ambiente de flujo de gas constante, pero se permite variar la composición del gas, todos los filamentos están montados en un bloque aislado del metal, un factor de corriente de filamento se calcula por el software para compensar los cambios en la corriente de filamento, debido a los cambios de temperatura de celda TC; el puente de Wheatstone es equilibrada con una corriente de puente especificado, mientras que los dos filamentos son esencialmente idénticas en entornos, la corriente de puente hace que la auto-calentamiento de los filamentos, la temperatura del filamento es siempre mucho más alta que la temperatura del horno en el que se encuentra la celda; mientras que ambos filamentos permanecen en el mismo entorno en el que se equilibró el puente, el puente de salida se mantendrá en aproximadamente 0,3 voltios, cualquier perturbación de este ambiente resultará en un cambio en la salida del puente, la salida del puente es de AC acoplado a los amplificadores con una salida compensada; una vez que el puente está equilibrado y estabilizado en condiciones adecuadas, las únicas variaciones en la salida del puente se deben a variaciones en el tipo y la cantidad de gas presente en los filamentos de "medida", el puente está equilibrado con helio (He) o argón (Ar) que fluye en la cámara de la cámara de medida y de referencia, la introducción de nitrógeno provoca un cambio en la respuesta de celdas conductividad térmica, debido al hecho de que el nitrógeno tiene una conductividad térmica diferente que el gas portador, en este caso, el puente se desequilibra y una salida vuelve a estar disponible para el preamplificador,

resultando en una lectura positiva; la cantidad de nitrógeno determina la magnitud de las lecturas. La sensibilidad del sistema se rige por el puente de corriente y la diferencia en la conductividad térmica entre el análisis de gas, el nitrógeno y el gas portador: helio o argón (LECO Corporation).

**Tabla 5.** Conductividad térmica de los gases

Gas	Symbol	Molecular Weight	Thermal Conductivity
Hydrogen	H <sub>2</sub>	2	39
Helium	He	4	33
Neon	Ne	20	10.4
Oxygen	O <sub>2</sub>	32	5.7
Nitrogen	N <sub>2</sub>	28	5.6
Air (dry)	Air	29	5.4
Carbon Monoxide	CO	28	5.4
Water Vapor	H <sub>2</sub> O	18	4.0
Argon	Ar	40	3.8
Carbon Dioxide	CO <sub>2</sub>	44	3.3
Sulfur Dioxide	SO <sub>2</sub>	64	1.6

Fuente: LECO Corporation.

### 2.4.3. LA RADIACIÓN INFRARROJA DE LA CELDA

Las descripciones que siguen se refieren a detector optimizado de CO<sub>2</sub>, el análisis de hidrógeno es idéntico, con sólo el cambio necesario para dar cabida a un gas diferente (H<sub>2</sub>O), la fuente de infrarrojos (IR) se compone de alambre de nicromo, que es la resistencia calentada a 850 °C, la fuente IR irradia energía visible, así como todas las longitudes de onda en el espectro infrarrojo; el dióxido de carbono absorbe la energía de IR a una longitud de onda precisa dentro del espectro IR, la energía de la fuente de IR es absorbida como el gas pasa a través de la celda, evitando que alcance el detector de IR, toda la demás energía IR es evitada llegar del detector IR por un filtro de paso de banda estrecha; debido al filtro de longitud de onda, la absorción de energía IR se puede atribuir solamente a dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), la concentración de CO<sub>2</sub> es

detectado como un nivel de energía en el detector; una celda de IR se utiliza como una referencia y para la medición, el total de carbono, como dióxido de carbono, se detecta de forma continua y simultánea, la celda consta de una fuente de IR, un filtro de paso de banda estrecha, un cono de condensación, un detector de energía de infrarrojos, y el cuerpo de la celda, la energía radiada entra en el cuerpo de la celda a través de una ventana, viaja a través del cuerpo de la celda, a continuación, sale a través de una segunda ventana y un filtro de longitud de onda precisa, el filtro selectivo pasa solamente la longitud de onda de absorción de CO<sub>2</sub> en un cono de condensación que se concentra la energía en el detector, el detector de estado sólido se AC acoplado a un preamplificador; A medida que aumenta la concentración de gas, el voltaje al preamplificador disminuye. El nivel de referencia de partida, o "línea de base" para el detector se establece mediante la ejecución de oxígeno al 100% a través de la celda, el entorno de oxígeno puro permite la máxima cantidad de energía para alcanzar el detector, éste nivel de energía máxima AC acoplado al preamplificador donde es amplificada, rectificadora, y se filtró, Se envía entonces a un convertidor de analógico a digital (A/D) donde se convierte a una señal digital; cuando comienza el análisis, la salida de la celda disminuye con la cantidad de carbono (en forma de CO<sub>2</sub>) presente en la celda, el ordenador lee la salida de la celda y produce puntos de datos que se almacenan en la memoria, entonces, el ordenador procesa la curva, o gráfico, formado por estos puntos de datos de calibración y después de formas una curva lineal, la curva de calibración se utiliza entonces por el ordenador para calcular con precisión el resultado de la muestra (LECO Corporation).

#### **2.4.4. SISTEMA DE COMBUSTIÓN DE OXÍGENO PURO**

Sistema de horno de doble etapa opera a temperaturas hasta 1050 °C utilizando sólo oxígeno puro para garantizar la combustión completa de todas las muestras orgánicas, sin necesidad de reactivos oxidantes de metal adicionales u otros gases portadores; Quartz lance dirige el



flujo de oxígeno directamente en la muestra, acelerando el proceso de combustión. Large, crisol poroso ayuda al proceso de combustión y se extiende los intervalos de mantenimiento (LECO Corporation).

#### 2.4.5. PREPARACIÓN DE MUESTRA CHNS628 DUMAS

El uso de una menor cantidad de muestra resulta en ahorro de costos por análisis pues la salida básica de consumibles se reduce a través de la combustión estequiométrica; la muestra homogeneizada se debe pesar en una lámina de estaño, cerrar para evitar la entrada de aire y luego insertar en un espacio vacío del automuestreador; Es posible establecer comunicación entre la balanza y la PC a través de una interface de datos; de esta manera se facilita la alimentación de datos de la muestra (LECO Corporation).



**Figura 6.** Pesado de la muestra en una lámina de estaño, LECO Corporation.

#### 2.4.6. CICLO DE ANÁLISIS

##### 2.4.6.1. Purga

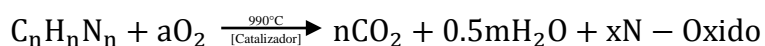
La muestra pesada y envuelta en papel de estaño (Tin Foil) es colocada en el cabezal de carga y purgada de cualquier gas atmosférico que hubiera ingresado en el proceso de preparación de la misma, paralelamente el recipiente que colecta los gases de la combustión el balastro (sistema

patentado por LECO), también es purgado (LECO Corporation).

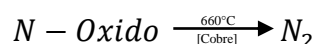
#### 2.4.6.2. *Combustión*

Ante la presencia de un catalizador y a altas temperaturas, una muestra (sólida o líquida) se combustiona para formar óxidos. Los óxidos de nitrógeno (NO<sub>x</sub>) resultantes se reducen a nitrógeno elemental con la ayuda de cobre, mientras que los subproductos (agua y CO<sub>2</sub>) se separan completamente. El nitrógeno restante se analiza con un detector de conductividad térmica (LECO Corporation).

##### **Combustión:**



##### **Reducción**



#### 2.4.6.3. *Análisis*

Todos los parámetros del análisis se definen y controlan desde la PC. El software calcula los parámetros de análisis que son necesarios para distintos tipos de muestra, p.e. la dosificación del gas, los tiempos de combustión, etc. Estos parámetros luego se almacenan en los programas de análisis. Si el usuario alimenta el factor de oxígeno puede controlar la cantidad de gas necesaria para la combustión; esto significa que solo se añadirá la cantidad precisa de oxígeno que se necesita para el análisis. Estas categorías de combustión vienen pre-instaladas para los tipos de muestra más comunes (LECO Corporation).

## 2.5. COMPARACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINACIÓN DE NITRÓGENO/PROTEÍNA

Después de numerosos estudios científicos realizados en diferentes tipos de muestras, se demostró que ambos métodos (kjeldahl y Dumas) entregan resultados de N total comparables y presentan una diferencia insignificante, especialmente para tejidos vegetales y frutos, por lo que no se justifica, a nivel de productor, una preferencia entre uno u otro método de análisis; probablemente a nivel de laboratorio, se justifica la elección de uno u otro método, debido a que Dumas tiene menos riesgo de error y su automatización implica mayor rapidez y menor costo del análisis estudios indican que efectivamente a pesar de las mínimas diferencias, las mayores diferencias que se han encontrado entre estos análisis indican que el valor de Dumas supera en no más de 1,4%, el valor obtenido por Kjeldahl, en muestras de fecas con alto contenido de materia orgánica (*Sallato, 2015*).

Se comprobó exactitud y precisión en los métodos Kjeldahl y Dumas para análisis de proteína empleando una muestra de referencia AAFCO la cual se analizó en 2 laboratorios acreditados, se aplicó una prueba F y t de comparación de varianzas y medias respectivamente, lo que permitió determinar que los métodos comparados presentan precisión y exactitud (*Mera, 2015*).

El método Kjeldahl, por ser un método más lento, complejo y que tiene mayor riesgo de pérdidas, ha venido siendo reemplazado por el método Dumas, que utiliza equipos automatizados de combustión seca. El método Dumas consiste en la transformación de todas las formas de nitrógeno en N gaseoso por calcinación y su determinación es por conductividad térmica (*Sweeney and Rexroad, 1987*).

Los métodos para la determinación de la concentración de proteínas se basan en la cantidad y naturaleza de la proteína a ser analizados, la presencia de sustancias de interferencia y los requisitos de sensibilidad, el método de Biuret indica el menor contenido de proteínas en la albúmina en la yema de huevo, que fue probablemente debido a la baja sensibilidad de este método de Biuret; éste no es muy bueno para las concentraciones de proteína por debajo de 5 mg / ml, al utilizar el reactivo de Folin-Ciocalteu para detectar

cobre reducido hace que el ensayo de Lowry sea casi 100 veces más sensible que la reacción de Biuret solo; el ensayo de Bradford muestra los valores más altos de proteínas , pero este ensayo no es sin errores, es sensible a la interferencia por muchos otros compuestos (condiciones básicas y detergentes-SDS); sin embargo, hay reactivos Bradford compatible con detergentes, éste depende de la secuencia de la proteína; sí la proteína no contiene un buen número de arginina y / o residuos aromáticos, a continuación, el tinte no se unirá a la proteína de la manera más eficiente, lo que resulta en una subestimación de la concentración de proteína (*Vrsanska, 2015*).

### **III. MATERIALES Y METODO**

#### **3.1. LUGAR DE INVESTIGACIÓN**

Esta investigación fue desarrollada en el laboratorio de control de calidad Instituto de Investigación Tecnológica Agroindustrial de la escuela de Ingeniería Agroindustrial y el laboratorio de composición y análisis de productos agroindustriales de la escuela académica profesional de ingeniería agroindustrial en la Universidad Nacional del Santa, ubicada en el Departamento de Ancash, Provincia del Santa, Distrito de Nuevo Chimbote.

#### **3.2. MATERIA PRIMA**

Para el desarrollo de esta investigación se trabajó con harina de pescado proporcionado por la empresa copeinca S.A.C.

#### **3.3. REACTIVOS**

- EDTA (estándar), procedencia americana, marca LECO, 9.56% de Nitrógeno.
- Perclorato de Magnesio Anhidro, procedencia americana, marca LECO.
- Virutas de cobre, procedencia americana, marca LECO.
- Oxígeno UHP, marca messer 4.3, 99.9993% de pureza.
- Helio UHP, marca messer 4.3, 99.9993% de pureza.
- Hidróxido de sodio en base de tierras, marca LECO.
- Ácido sulfúrico, Reactivo Baker ACS, Lote T18C00.
- Ácido clorhídrico P.A-Q.P, 37,5%  $\pm$ 0.5%, Lote A-201.
- Hidróxido de sodio.

### 3.4. OTROS MATERIALES

- Espátula
- Láminas de estaño
- Soporte para pesar muestra.
- Crisol Poroso
- Crisol de porcelana
- Pinza
- Placa Petri.

### 3.5. EQUIPOS

- **Analizador Dumas**

El Analizador Dumas, marca LECO, modelo CHNS628 de procedencia Americana es un instrumento que determina el contenido carbón, hidrógeno y nitrógeno en una variedad de materiales, incluyendo los alimentos, fertilizantes, carnes y suelos. El rango de peso de la muestra es de 50 miligramos hasta 1.5 gramos. El instrumento está conectado con una PC externa, y usa un software basado en Windows® para controlar el sistema de operación y el manejo de datos.



**Figura 7.** Analizador Dumas CHNS628

- **Kjeldahl:** Marca Foss, de procedencia Americana, modelo Kjeltec 8100.



**Figura 8.** Equipo Kjeldahl

- **Soxhlet;** Marca Foss de desendencia americana, Modelo Soxtec TM 2024.



**Figura 9.** Equipo Soxhlet

- **Analizador de Fibra:** Marca Foss, procedencia americana, modelo Fibertec TM E.



**Figura 10.** Analizador de fibra dietaría

- **Estufa:** Marca POL-EKO APARATURE, Modelo: SW 17TC, Serie SW-199, Procedencia Americana.



**Figura 11.** Estufa de Secado

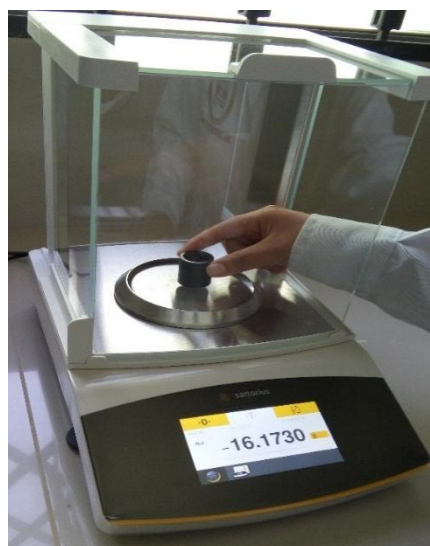


- **Mufla:** Marca THERMOLYNE, Serie 347034984, Procedencia Americana.



**Figura 12.** Mufla Thermolyne

- **Balanza Analítica:** De procedencia Americana, marca sartorius, modelo Secura, serie 224-1S, rango de pesado máximo 220 gr, rango de pesado mínimo 0.0001gr



**Figura 13.** Balanza Analítica

- **Molino de Impacto:** Marca KIKA-WERKE, Modelo M20. Molino de carga para moler sustancias duras o quebradizas en seco y con pocas perdidas.



**Figura 14.** Molino de Impacto.

### **3.6. METODOLOGÍA DE ANÁLISIS.**

#### **3.6.1. DETERMINACIÓN DE NITRÓGENO POR DUMAS**

Para la determinación de nitrógeno se utilizó método oficial de la AOAC 990.03.

#### **3.6.2. DETERMINACIÓN DE NITRÓGENO POR KJELDAHL**

Para la determinación de nitrógeno se utilizó el método oficial de la AOAC 2036.

#### **3.6.3. DETERMINACIÓN DE HUMEDAD**

Para la determinación de Humedad se utilizó el método oficial de la AOCA 990.

#### **3.6.4. DETERMINACIÓN DE CENIZA**

Para la determinación de ceniza se utilizó el método oficial de la AOCA 923.03

#### **3.6.5. DETERMINACIÓN DE GRASA**

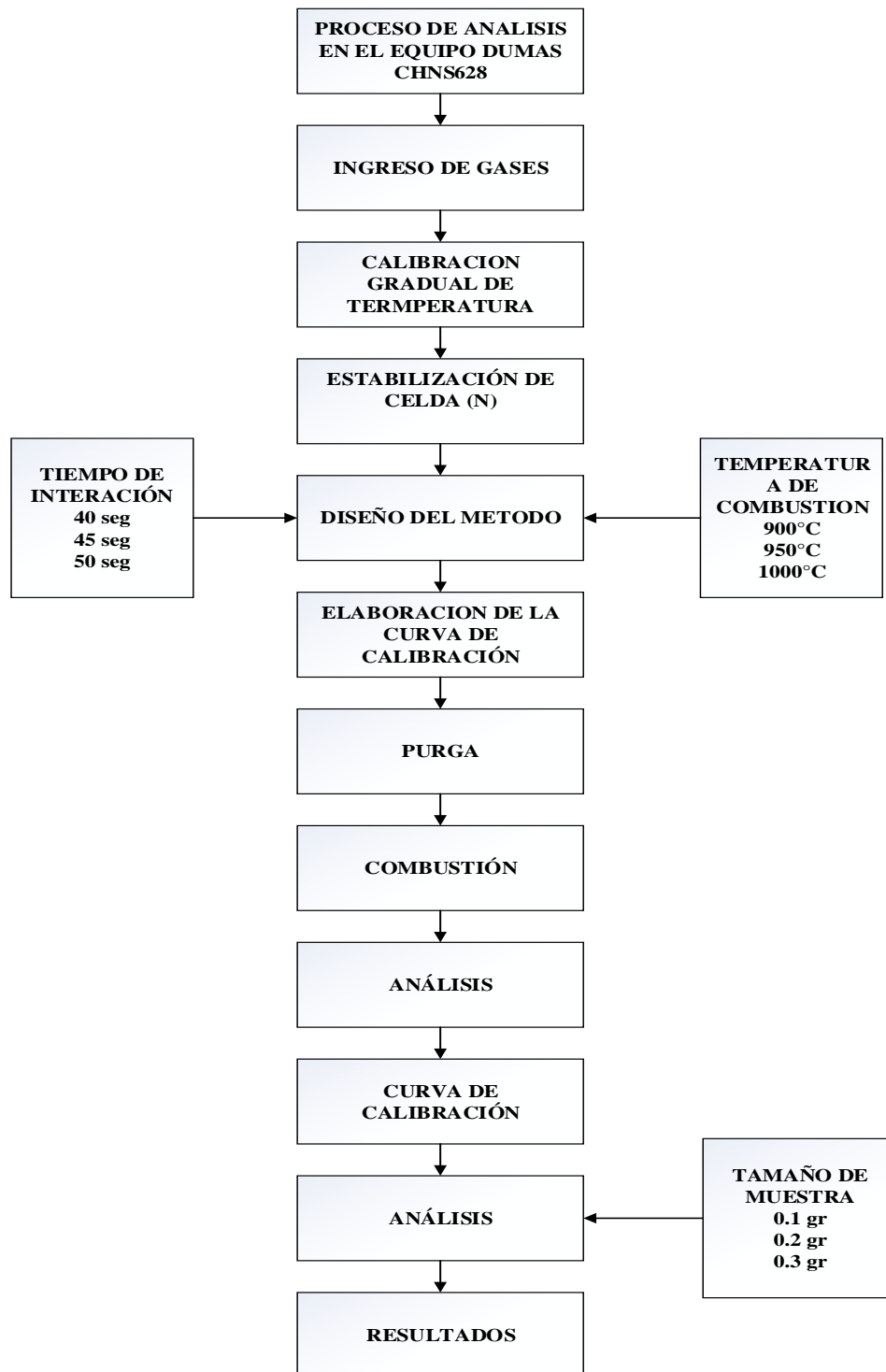
Para la determinación de grasase utilizó el método oficial de la AOAC 994.02

#### **3.6.6. DETERMINACIÓN DE FIBRA**

Para la determinación de fibra se utilizó el método oficial de la AOAC 997.08

### **3.7. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL**

Diseño experimental de la determinación de Nitrógeno por el método Dumas

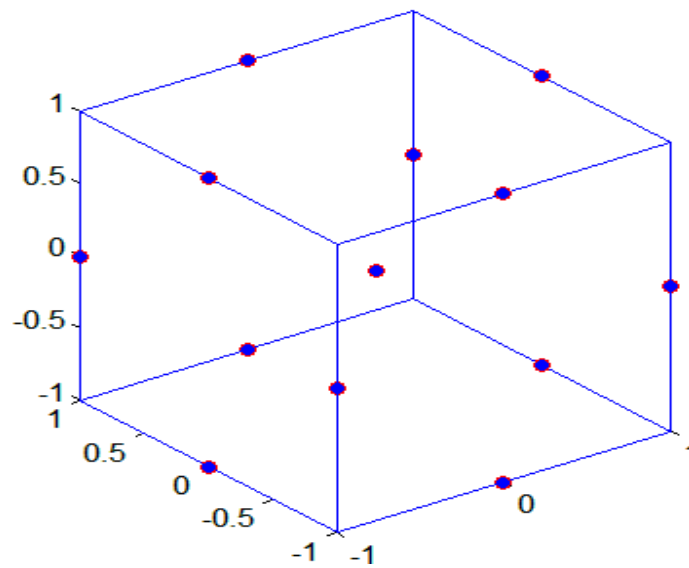


**Diagrama 2.** Flujograma para la Optimización de los Parámetros de Análisis del Método Dumas.

### 3.8. DISEÑO ESTADÍSTICO

Los resultados que fueron obtenidos de la harina de pescado, el cual se sometió a un análisis por Dumas, cuyos resultados fueron analizados por un diseño Box Behnken y poder generar una superficie de respuesta con 3 factores el cual será analizado con el programa estadístico Stargraphics centurión XVI.

En la figura 15, se muestran los puntos tomados por el diseño así como sus límites según las ordenadas.



**Figura 15.** Representación del diseño de Box-Behnken para tres factores.

**Tabla 6.** Planeamiento experimental Box - Behnken.

Numero de experimentos	Valor de las Variables		
	X1	X2	X3
1	-1	-1	0
1	+1	-1	0
1	-1	+1	0
1	+1	+1	0
1	-1	0	-1
1	+1	0	-1
1	-1	0	+1
1	+1	0	+1
1	0	-1	-1
1	0	+1	-1
1	0	-1	+1
1	0	+1	+1
3	0	0	0
TOTAL		15	

**Statgraphics centurión XVII**

En la tabla 1 podemos ver el planeamiento experimental Box-Behnken para  $K=3$  el cual muestra un total de 15 tratamientos experimentales con sus respectivas variaciones factoriales.

### 3.8.1. MODELO ESTADÍSTICO

$$Y_{ijk} = U + V_i + M_k + (V * I)_{ij} + (V * M)_{ik} + (I * M)_{jk} + (V * I * M)_{ijk} + E_{ijk}$$

Dónde:

$Y_{ijk}$ : Observación individual.

$U$ : Media general.

$V_I$ : Temperatura de combustión.

(3 niveles  $i = 1,2,3$ )

$$V_1 = 900^\circ\text{C}$$

$$V_2 = 950^\circ\text{C}$$

$$V_3 = 1000^\circ\text{C}$$

$I_f$ : Tiempo de integración.

(3 niveles  $j = 1,2,3$ )

$$I_1 = 40 \text{ s}$$

$$I_2 = 45 \text{ s}$$

$$I_3 = 50 \text{ s}$$

$M_k$ : Tamaño de muestra.

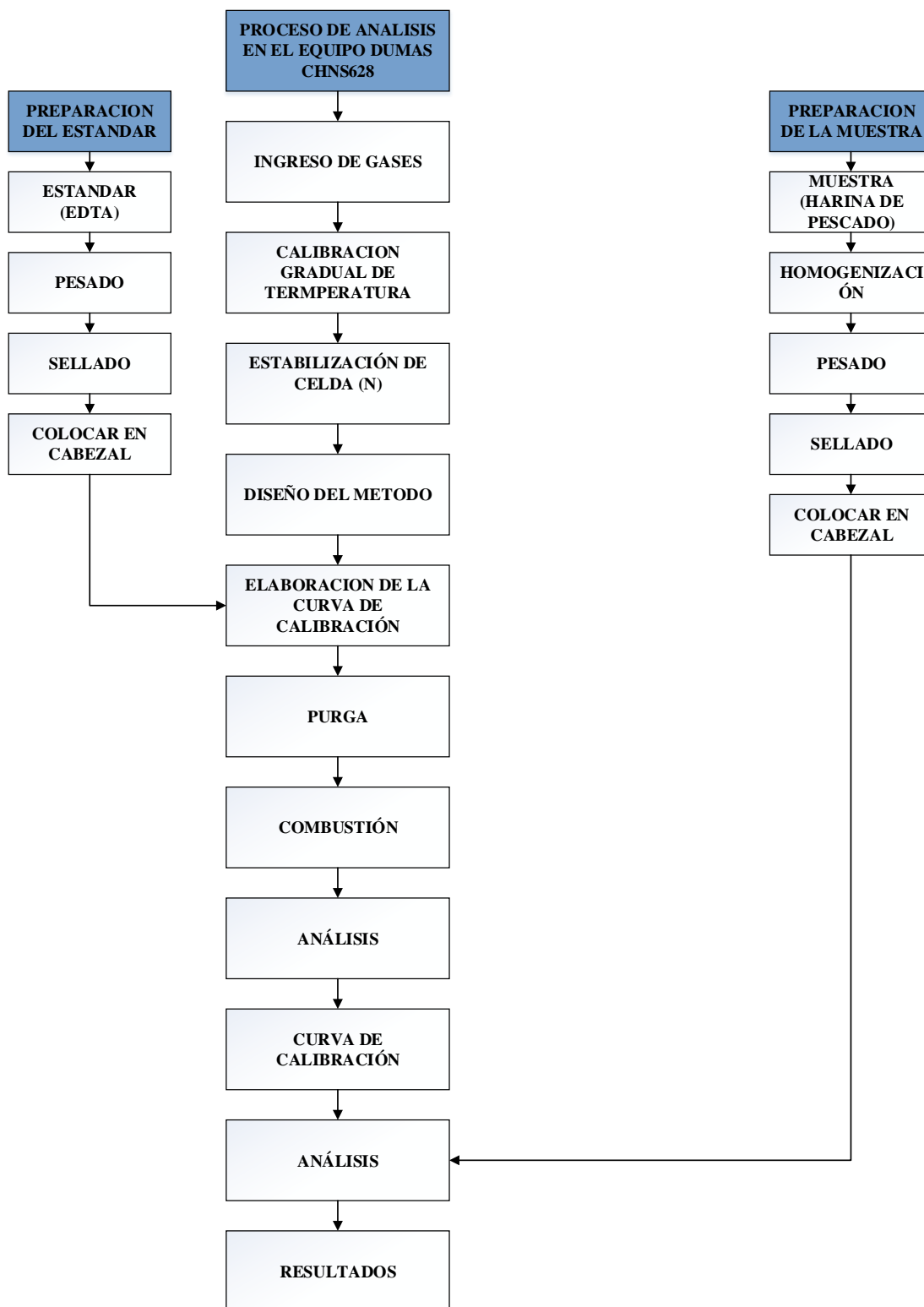
(3 niveles  $k = 1,2,3$ )

$$M_1 = 0.1 \text{ gr}$$

$$M_2 = 0.2 \text{ gr}$$

$$M_3 = 0.3 \text{ gr}$$

### 3.9. DESARROLLO DE LA INVESTIGACIÓN



**Diagrama 3.** Flujograma del proceso de la optimización de parámetros de análisis para determinación de Nitrógeno.



### **3.9.1. PROCESO DE ANÁLISIS EN EL QUIPO DUMAS CHNS628**

#### **3.9.1.1. Ingreso de gases**

Se abrió las llaves de los gases de helio y oxígeno, estos ingresan al quipo.

#### **3.9.1.2. Calibración gradual de temperaturas**

Se procedió graduando la temperatura del horno de combustión, hasta la temperatura a la cual se quiere trabajar (900°C, 950°C o 1000°C).

#### **3.9.1.3. Estabilización de celda (N)**

Después de la calibración de temperatura se procedió a la estabilización de la celda del nitrógeno por un periodo de 6 horas.

#### **3.9.1.4. Diseño del método**

Ya estabilizado las celdas proseguimos con el diseño del método. En el cual se colocó las variables (tiempo de interacción y temperatura de combustión).

#### **3.9.1.5. Elaboración de la curva de calibrado**

Para la curva de calibrado se usó el estándar EDTA (*ácido etilendiaminotetraacético*) tomando 5 puntos para dicha curva.

#### **3.9.1.6. Purga**

La muestra del estándar se colocó al cabezal y después ingresada a una cámara en el cual se sacó todo el aire que pudo ser capotado al momento de ingresar.

#### **3.9.1.7. Combustión**

Después que el estándar es purgado se procedió a la combustión, esto se realizó en el horno de combustión, el cual queda en la parte inferior de la cámara de purga.

### 3.9.1.8. *Análisis*

Después de la combustión, los gases obtenidos de este fenómeno son pasador por una seria de filtros, para que después se lleve a la celda detectora de Nitrógeno.

### 3.9.1.9. *Curva de Calibración*

De esta forma se obtuvo la curva de calibrado de los 5 puntos (0.05g, 0.1g, 0.15g, 0.20g, 0.25g) con 3 repeticiones.

### 3.9.1.10. *Resultados*

Los resultados obtenidos esta representadas en % de Nitrógeno, para lo cual las muestras fueron ingresadas al cabezal y tuvieron el mismo procedimiento de combustión que el estándar (purgado, combustionado y detectado pro la celda de Nitrógeno).

## 3.9.2. PREPARACIÓN DEL ESTÁNDAR

### 3.9.2.1. *Estándar*

El estándar usado para este proyecto fue el EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), el cual contienen un 9.56% de Nitrógeno.



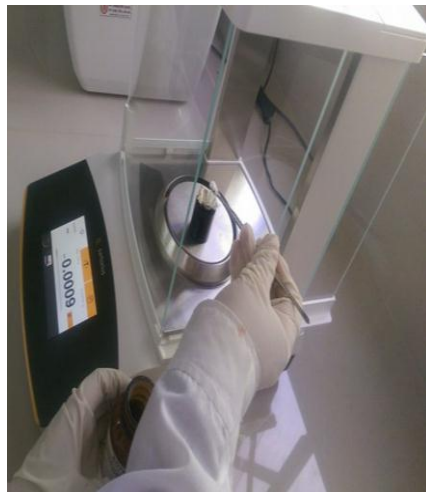
**Figura 16.** Estándar EDTA.

### 3.9.2.2. *Pesado*

Se pesó (0.05g, 0.1g, 0.15g, 0.20g, 0.25g), de EDTA con tres repeticiones para cada punto.



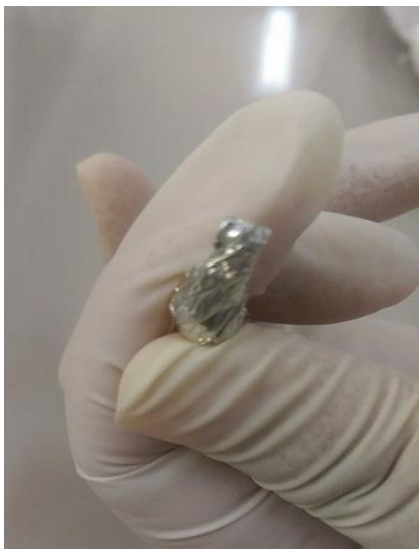
**Figura 17.** Soporte y lámina de estaño.



**Figura 18.** Pesado de muestra

### 3.9.2.3. *Sellado*

Cada peso fue sellado con láminas de estaño con ayuda de las manos.



**Figura 19.** Sellado de muestra con lámina de estaño.

### 3.9.2.4. *Colocar en cabezal*

Todos los pesos fueron colocados al cabezal en el quipo Dumas CHNS628.



**Figura 20.** Cabezal de Analizador DUMAS CHNS 628

### 3.9.3. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

#### 3.9.3.1. *Muestra*

La muestra fue obtenida de la empresa Copeinca S.A.C.



**Figura 21.** Muestra de Harina de Pescado

#### 3.9.3.2. *Homogenización*

La muestra se ingresó a un molino para que homogenizar la muestra.



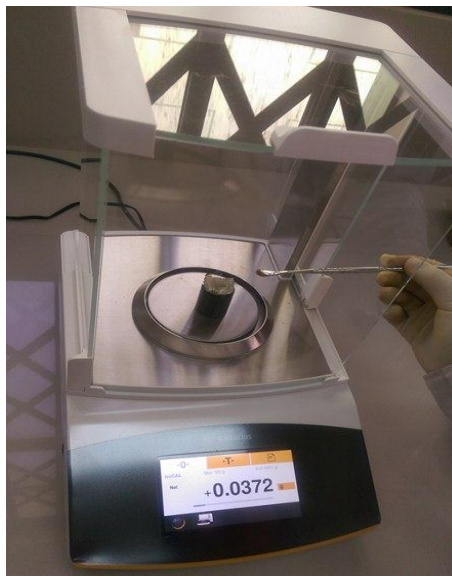
**Figura 22.** Llenado de muestra en molino



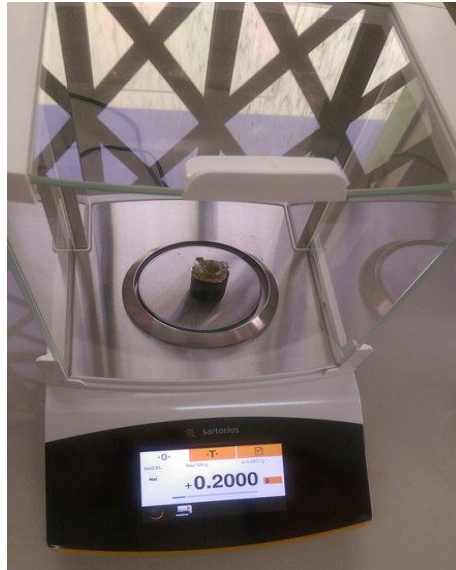
**Figura 23.** Homogenizado de muestra

#### **3.9.3.3. Pesado**

Se gramos de la muestra homogenizada el cual fue analizada posteriormente.



**Figura 24.** Pesado de harina de pescado



**Figura 25.** 0.2 gr. de harina de pescado

#### **3.9.3.4. Sellado**

Cada peso de la muestra fue sellada con láminas de estaño.



**Figura 26.** Sellado de muestra de harina de pescado

### 3.9.3.5. Colocar en cabezal

Todas las muestras pesadas fueron ingresadas al cabezal para después ser analizadas en el equipo Dumas CHNS628.



**Figura 27.** Carga de muestra en el cabezal del Analizador CHNS628.



## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. COMPOSICIÓN FÍSICOQUÍMICA DE HARINA DE PESCADO

Se determinó la composición nutricional de la harina de pescado con 3 repeticiones por cada análisis, el cual se muestra en la Tabla 7, para la determinación de proteínas se realizó en el método Dumas utilizando los siguientes parámetros; temperatura de combustión 900 °C y tiempo de integración de 50 s, los resultados en la investigación son similares con los reportados por Kop (2010); quien reportó 65.5 % de proteína y 0.3 % de fibra, también Al Mahmud (2012); reportó 11.45 % de humedad, 12.5 % de aceite y 15.16 % de ceniza.

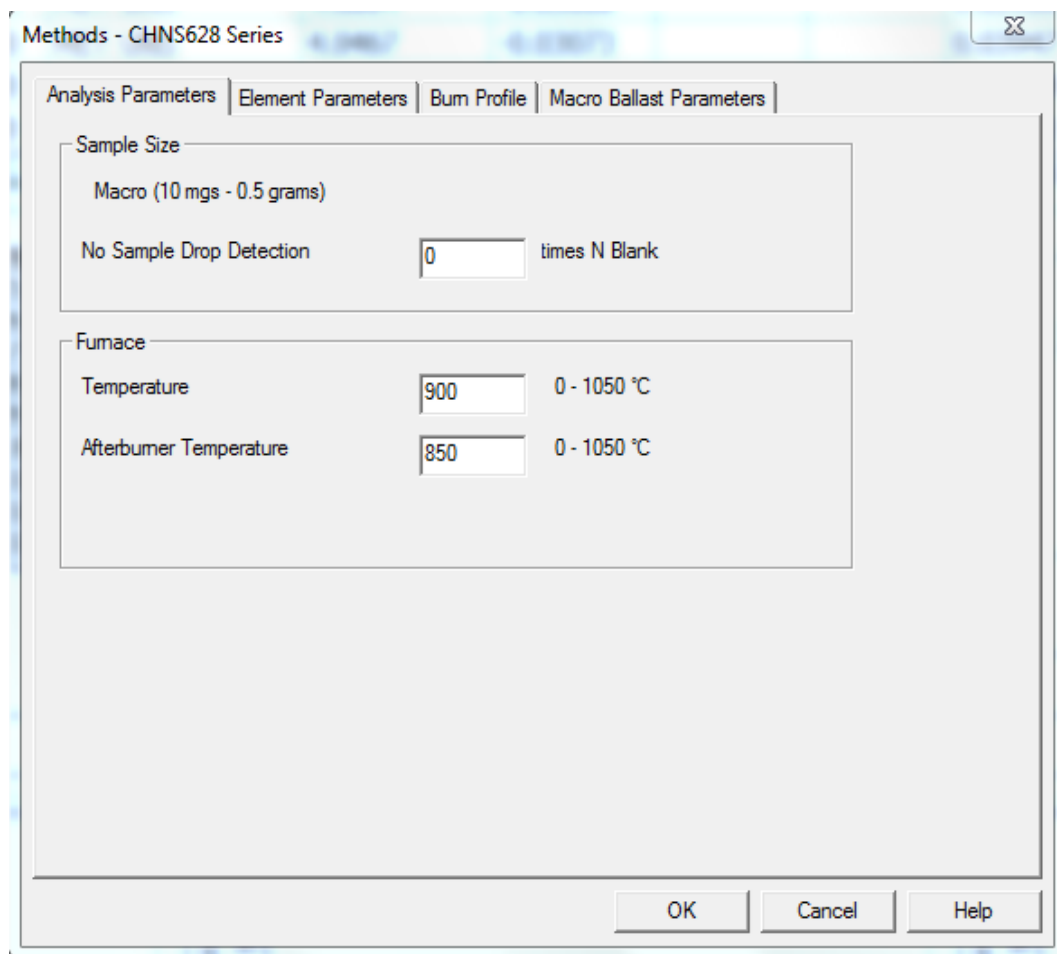
**Tabla 7** Análisis proximal de la harina de pescado en 100g de muestra

<b>Componente</b>	
Proteína	65.37 ± 0.0603 <sup>a</sup>
Humedad	12.06 ± 0.1552 <sup>a</sup>
Aceite	9.47 ± 0.0034 <sup>a</sup>
Ceniza	12.73 ± 0.1452 <sup>a</sup>
Fibra	0.37 ± 0.0280 <sup>a</sup>

a: Desviación estándar.

## 4.2. CREACIÓN DEL MÉTODO DE ANÁLISIS

Según el diseño experimental Box – Behnken, se ha programado 15 métodos en el software de Leco Corporation, la cual se resume en el siguiente figuras 28 y 29, y tabla 8 se presenta un cuadro resumen de éstos métodos.



**Figura 28.** Creación de método en el software de Leco, con una temperatura de combustión en el horno primario de 900 °C.

Methods - CHNS628 Series

Analysis Parameters | Element Parameters | Burn Profile | Macro Ballast Parameters

	Nitrogen	Carbon	Hydrogen	Range
Analyze*	Yes	Yes	Yes	
Baseline Delay	10	0	0	0 - 60 seconds
Minimum Analy	45	45	45	0 - 400 seconds
Comparator Lev	100.00	100.00	100.00	0 - 100%
Endline Time	2	1	1	0 - 5 seconds
Conversion Fact	1.00	1.00	1.00	0.01 - 99.9
Significant Digi	5	5	5	1 - 5

IR Baseline Time  1 - 30 seconds

TC Baseline Time  1 - 10 seconds

OK Cancel Help

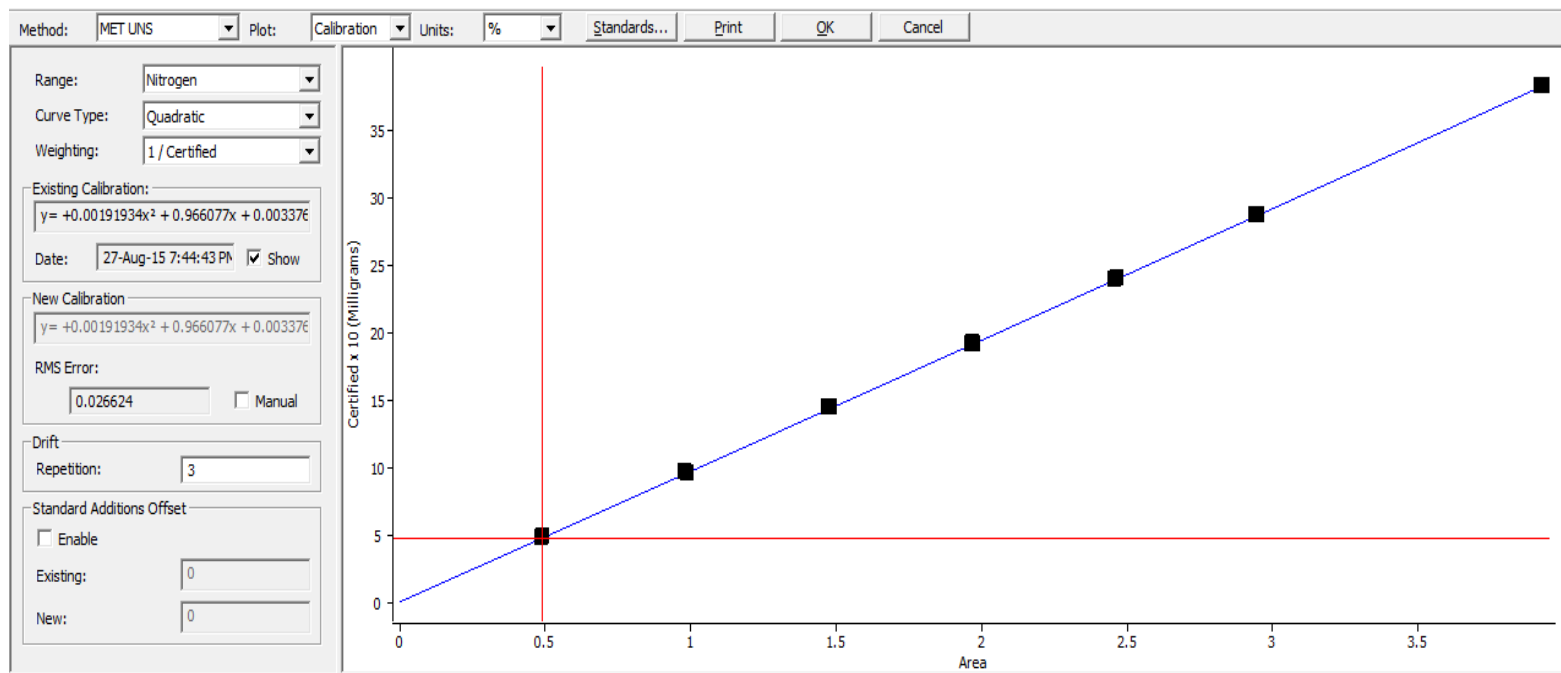
**Figura 29.** Creación de método en el software de Leco, con Tiempo de Integración de 45 segundos.

**Tabla 8.** Cuadro resumen de la programación de los métodos

<b>Métodos</b>	<b>Temperatura de combustión de Horno (°C)</b>	<b>Tiempo de integración (s)</b>	<b>Tamaño de muestra (g)</b>
1	900	40	0.2
2	900	45	0.1
3	900	50	0.2
4	900	45	0.3
5	950	45	0.2
6	950	40	0.3
7	950	40	0.1
8	950	45	0.2
9	950	50	0.3
10	950	50	0.1
11	950	45	0.2
12	1000	45	0.3
13	1000	40	0.2
14	1000	50	0.2
15	1000	45	0.1

### 4.3. CURVA DE CALIBRADO

En Gráfico 1, presenta la curva de calibrado para el tratamiento que tiene como parámetros los puntos centrales, temperatura de combustión del horno a 950 °C y tiempo de integración de 45 s, del diseño Box-Behnken, se evidencia que la curva presenta una tendencia lineal con un  $R^2$  de 0.998, esto nos indica la linealidad de la curva de calibración y demuestra la alta sensibilidad del equipo.



**Gráfico 1.** Curva de calibración para la determinación de nitrógeno en harina de pescado

#### 4.4. DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS PARA DETECTAR LA MÁXIMA CANTIDAD DE NITRÓGENO

En la tabla 9, se presenta los niveles y factores del diseño Box – Behnken. En la Tabla 10, se muestra los resultados obtenidos del diseño experimental, éstos resultados muestran el contenido de nitrógeno de los 15 tratamientos según el diseño Box Behnken, la menor concentración de nitrógeno en la harina de pescado fue de 10.255 y la mayor concentración de nitrógeno en la harina de pescado fue de 10.894, los resultados nos indican que los porcentajes de nitrógeno se ven afectados por los tratamientos sometidos. Miller (2007) afirma que el contenido de nitrógeno en la harina de pescado esta intrínsecamente relacionada con su calidad en la recepción de materia prima, además el método dumas presenta repetibilidad y reproducibilidad, las muestras analizadas en dos diferentes laboratorios no debe diferir en más de 5.77 % .

**Tabla 9.** Factores y niveles definidos para diseño Box – Behnken

<b>Factor</b>	<b>Bajo (-1)</b>	<b>Central (0)</b>	<b>Alto (+1)</b>
Temperatura de Combustión °C	900	950	100
Tiempo de Integración s	40	45	50
Peso de la Muestra g	0.1	0.2	0.3

**Tabla 10.** Resultados del diseño experimental

<b>TRATAMIENTOS</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>15</b>
Temperatura horno (°C)	0	+1	0	0	0	-1	-1	0	+1	0	-1	-1	0	+1	+1
Tiempo Integración (s)	0	0	-1	-1	0	-1	0	+1	-1	+1	+1	0	0	+1	0
Peso de muestra (g)	0	+1	+1	-1	0	0	-1	+1	0	-1	0	+1	0	0	-1
<b>1</b>	10.826	10.563	10.349	10.389	10.817	10.477	10.337	10.539	10.649	10.585	10.615	10.469	10.865	10.759	10.615
<b>2</b>	10.848	10.494	10.294	10.315	10.826	10.596	10.423	10.585	10.638	10.634	10.635	10.358	10.848	10.550	10.534
<b>3</b>	10.813	10.353	10.358	10.359	10.860	10.573	10.354	10.541	10.566	10.514	10.545	10.455	10.845	10.784	10.475
<b>4</b>	10.877	10.386	10.362	10.446	10.845	10.566	10.519	10.576	10.476	10.554	10.543	10.365	10.892	10.681	10.336
<b>5</b>	10.814	10.439	10.369	10.348	10.839	10.580	10.385	10.668	10.655	10.653	10.594	10.377	10.851	10.643	10.555
<b>6</b>	10.823	10.518	10.345	10.357	10.883	10.425	10.343	10.645	10.685	10.684	10.598	10.474	10.849	10.755	10.545
<b>7</b>	10.884	10.548	10.349	10.328	10.883	10.588	10.370	10.437	10.694	10.514	10.640	10.574	10.841	10.716	10.455
<b>8</b>	10.885	10.527	10.447	10.336	10.742	10.464	10.484	10.574	10.585	10.759	10.588	10.759	10.859	10.582	10.396
<b>9</b>	10.885	10.435	10.355	10.356	10.893	10.334	10.385	10.729	10.675	10.549	10.594	10.440	10.749	10.614	10.414
<b>10</b>	10.875	10.676	10.255	10.354	10.804	10.514	10.559	10.653	10.545	10.485	10.587	10.425	10.885	10.653	10.475
<b>11</b>	10.848	10.365	10.386	10.284	10.847	10.424	10.658	10.553	10.624	10.583	10.574	10.368	10.893	10.733	10.394
<b>12</b>	10.735	10.544	10.398	10.255	10.793	10.565	10.554	10.504	10.654	10.474	10.565	10.464	10.782	10.855	10.444
<b>13</b>	10.873	10.666	10.385	10.350	10.884	10.583	10.370	10.549	10.567	10.564	10.595	10.355	10.783	10.648	10.486
<b>14</b>	10.894	10.392	10.346	10.413	10.855	10.475	10.349	10.695	10.545	10.483	10.584	10.474	10.883	10.734	10.565
<b>15</b>	10.879	10.378	10.315	10.495	10.885	10.574	10.666	10.529	10.685	10.685	10.547	10.385	10.839	10.542	10.425
<b>16</b>	10.866	10.430	10.347	10.335	10.854	10.695	10.584	10.516	10.778	10.554	10.647	10.681	10.844	10.776	10.445

De acuerdo con la tabla 11, se muestran los valores promedios para los 15 tratamientos, éstos tienen como límite de control su coeficiente de variación, se observa que los tratamientos que detectan mayor contenido de % nitrógeno en harina de pescado, son producto de la combinación de los parámetros de Temperatura de combustión 950 °C, Tiempo de integración de 45 s y tamaño de muestra de 0.2 g, que en la tabla 11, se representa con el tratamiento 1, 5 y 13. También se observa que el tratamiento que presenta menor coeficiente de variación es el tratamiento 11, tiene como parámetros una Temperatura de combustión 900 °C, Tiempo de integración de 50 s y tamaño de muestra de 0.2.

**Tabla 11.** Promedios de los tratamientos del diseño experimental

<b>TRATAMIENTOS</b>	<b>PROMEDIO</b>
<b>1</b>	10.85 ± 0.382 <sup>a</sup>
<b>2</b>	10.48 ± 0.969 <sup>a</sup>
<b>3</b>	10.35 ± 0.418 <sup>a</sup>
<b>4</b>	10.36 ± 0.562 <sup>a</sup>
<b>5</b>	10.85 ± 0.375 <sup>a</sup>
<b>6</b>	10.53 ± 0.841 <sup>a</sup>
<b>7</b>	10.46 ± 1.106 <sup>a</sup>
<b>8</b>	10.58 ± 0.734 <sup>a</sup>
<b>9</b>	10.63 ± 0.704 <sup>a</sup>
<b>10</b>	10.58 ± 0.783 <sup>a</sup>
<b>11</b>	10.59 ± 0.304 <sup>a</sup>
<b>12</b>	10.46 ± 1.115 <sup>a</sup>
<b>13</b>	10.84 ± 0.379 <sup>a</sup>
<b>14</b>	10.69 ± 0.841 <sup>a</sup>
<b>15</b>	10.47 ± 0.711 <sup>a</sup>

a: Coeficiente de variación



#### 4.4.1. ANÁLISIS DE VARIANZA

En la Tabla 12, se presenta el ANOVA, en el cual muestra que existen variables altamente significativas, esto quiere decir que influyen directamente en los resultados, estas son; la temperatura del horno, el tiempo de integración, interacción entre la temperatura y temperatura, interacción entre el tiempo y tiempo y la interacción entre el tamaño de muestra y tamaño de muestra, a un nivel de significancia de 5 %, ya que los valores – P, resultaron ser menores a 0.05 ( $P < 0.05$ ), el coeficiente de variación hallado fue de 0.781%, éste valor nos indica que no existe mucha variabilidad entre los tratamientos presentados.

**Tabla 12.** Análisis de varianza (ANOVA)

Fuente	Suma de Cuadrados	G.L.	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Temperatura del horno	0.105341	1	0.105341	14.77	<i>0.0002</i>
B:Tiempo de integración	0.662544	1	0.662544	92.91	<i>0.0000</i>
C:Tamaño de muestra	0.000303195	1	0.000303195	0.04	0.8368
AA	0.83085	1	0.83085	116.51	<i>0.0000</i>
AB	0.0000030625	1	0.0000030625	0.00	0.9835
AC	0.000081	1	0.000081	0.01	0.9152
BB	0.850449	1	0.850449	119.25	<i>0.0000</i>
BC	0.0000975156	1	0.0000975156	0.01	0.9070
CC	3.96143	1	3.96143	555.49	<i>0.0000</i>
bloques	0.0616073	15	0.00410715	0.58	0.8915
Error total	1.53325	215	0.00713139		
Total (corr.)	7.42005	239			

Los P-valores significativos se muestran en la tabla en *cursiva*.

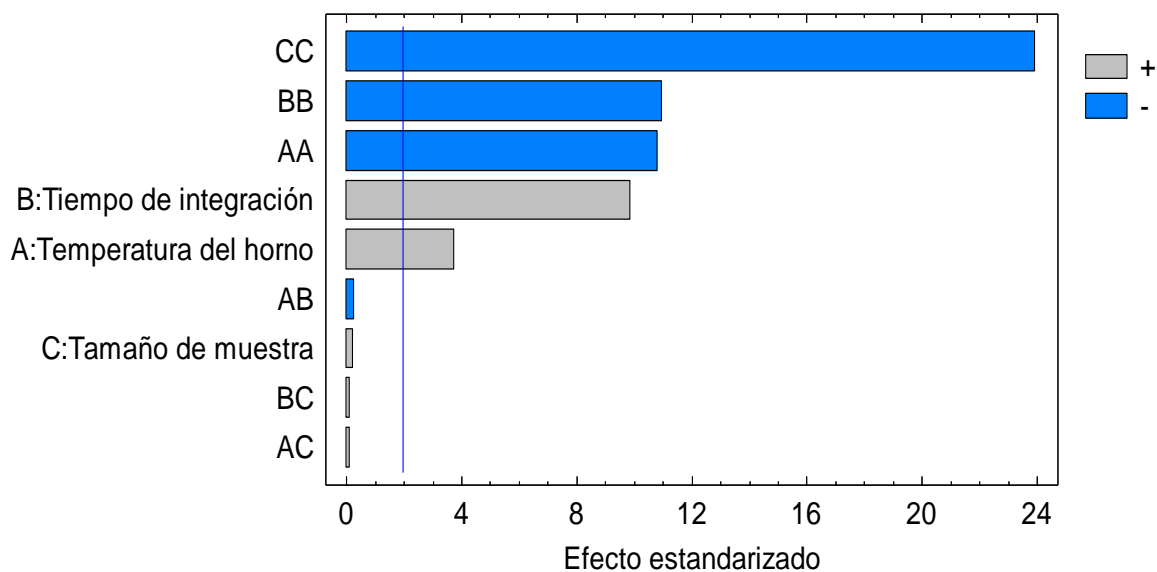
Marcó (2002) estudió optimizar los parámetros del equipo Leco FP-228, por el método de combustión Dumas, el cual utilizó como parámetros de temperatura del horno de 850-900-950 °C; el tiempo de suministro de oxígeno 10-25-40 s y cantidad de muestra de 20-35-50 mg, el cual concluyó mediante el análisis de varianza que la temperatura de combustión y el tiempo de suministro de oxígeno influyen significativamente a un nivel de significancia de 5 % ( $P < 0.05$ ).

#### 4.4.2. ANÁLISIS DE EFECTOS DE LAS VARIABLES SOBRE LA RESPUESTA

En la Tabla 13, se muestra las estimaciones para cada uno de los efectos estimados y las interacciones, también se observa que los efectos negativos vienen a estar dado por la interacción de: temperatura de combustión - temperatura de combustión, temperatura de combustión - tiempo de integración, tiempo de integración - tiempo de integración, tamaño de muestra – tamaño de muestra y 8 bloques.

**Tabla 13.** Efectos estimados para Nitrógeno (%)

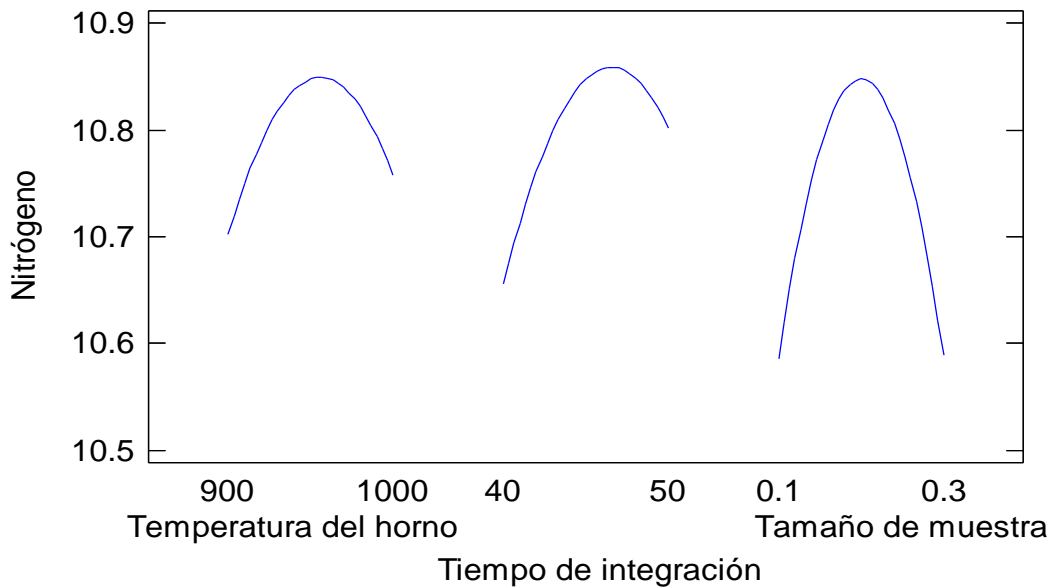
<b>Efecto</b>	<b>Estimado</b>	<b>Error Estd.</b>
promedio	10.8469	0.012189
A:Temperatura del horno	0.057375	0.0149284
B:Tiempo de integración	0.143891	0.0149284
C:Tamaño de muestra	0.00307812	0.0149284
AA	-0.237182	0.0219739
AB	-0.0004375	0.0211119
AC	0.00225	0.0211119
BB	-0.239964	0.0219739
BC	0.00246875	0.0211119
CC	-0.517901	0.0219739
bloque	-0.0192833	0.0422238
bloque	-0.0436833	0.0422238
bloque	-0.0398167	0.0422238
bloque	0.00631667	0.0422238
bloque	0.0275167	0.0422238
bloque	0.0131167	0.0422238
bloque	0.03525	0.0422238
bloque	-0.0420833	0.0422238
bloque	0.00298333	0.0422238
bloque	-0.02435	0.0422238
bloque	-0.0182167	0.0422238
bloque	-0.00861667	0.0422238
bloque	-0.00475	0.0422238
bloque	0.0141833	0.0422238
bloque	0.0839167	0.0422238



**Gráfico 2.** Diagrama de Pareto de los efectos estandarizados

En la gráfico 2, se presenta el diagrama de Pareto, en ella se indica los efectos significativos y no significativos, la línea vertical azul se utiliza para juzgar dichos efectos, cualquier barra que se extienda más allá de dicha línea corresponde a efectos que son estadísticamente significativos con un 95.0 % de nivel de confianza, de los cuales se observa gráficamente y son; temperatura del horno, tiempo de integración, temperatura del horno – temperatura del horno, tiempo de integración – tiempo de integración y tamaño de muestra – tamaño de muestra, esto también se puede corroborar con la tabla 12 donde se muestra el ANOVA a un nivel de significancia de 5 % ( $P < 0.05$ ).

Gráfica de Efectos Principales para Nitrógeno



**Gráfico 3.** Grafica de efectos principales para nitrógeno

En la gráfica 3, se muestra los valores estimados para el contenido de nitrógeno en función a cada factor experimental, para la temperatura del horno se observa que existe una diferencia en función a la respuesta en cuanto va del nivel bajo 900 °C al nivel alto 1000 °C, se observa en la respuesta que el contenido de nitrógeno va desde 10.7 a 10.75 aproximadamente, obteniendo su mayor valor cuando se encuentra en el nivel central 950 °C, dando una respuesta del contenido de nitrógeno aproximadamente de 10.84, para tiempo de integración se observa que existe una marcada diferencia en función a la respuesta en cuanto va del nivel bajo 40 s al nivel alto 50 s, se observa que la respuesta que el contenido de nitrógeno va desde 10.5 a 10.78 aproximadamente, obteniendo su mayor valor cuando se encuentra cerca del nivel central 45 s, dando una respuesta del contenido de nitrógeno aproximadamente de 10.84 y para el tamaño de muestra se observa que no influye el nivel, a diferentes concentraciones la respuesta en contenido de nitrógeno será la misma.

Gráfica de Interacción para Nitrógeno

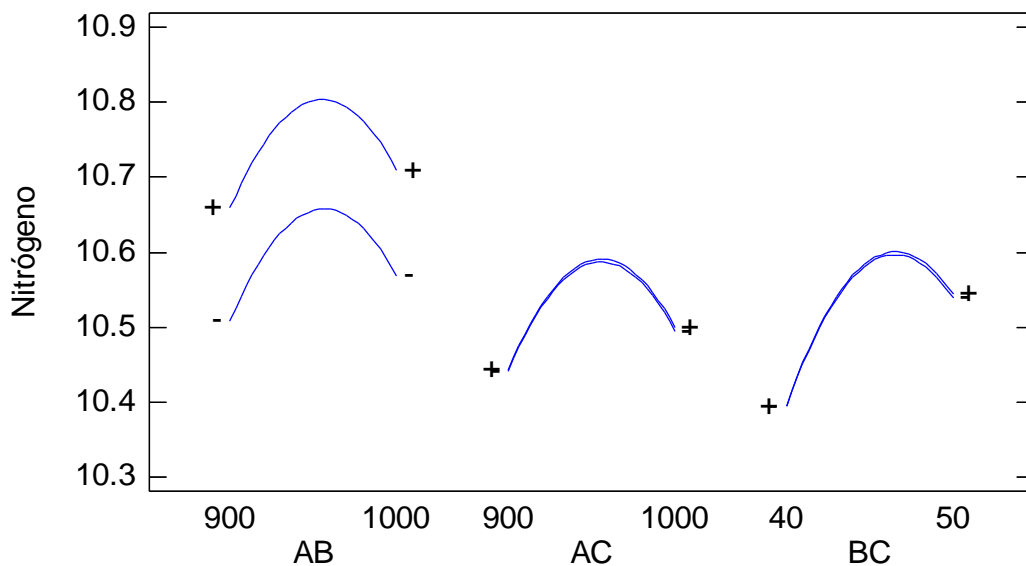
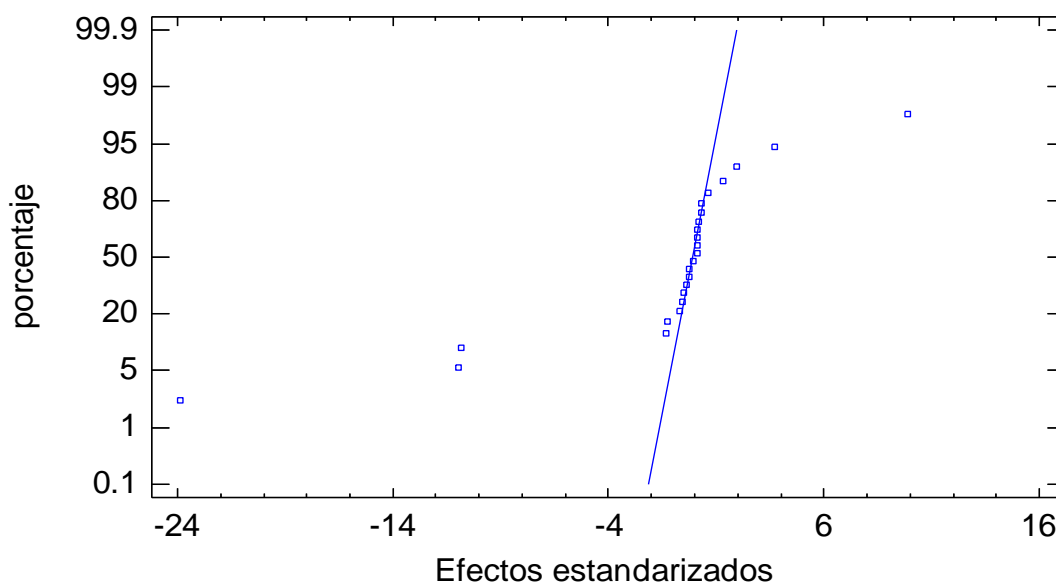


Gráfico 4. Grafica de interacción para nitrógeno

En la Gráfica 5, se muestra los valores estimados para el contenido de Nitrógeno en función a la interacción de sus pares de factores, al igual que en la gráfica 4, cuando se varía los niveles de cada interacción de los factores, se obtiene diferente respuesta en el contenido de nitrógeno.

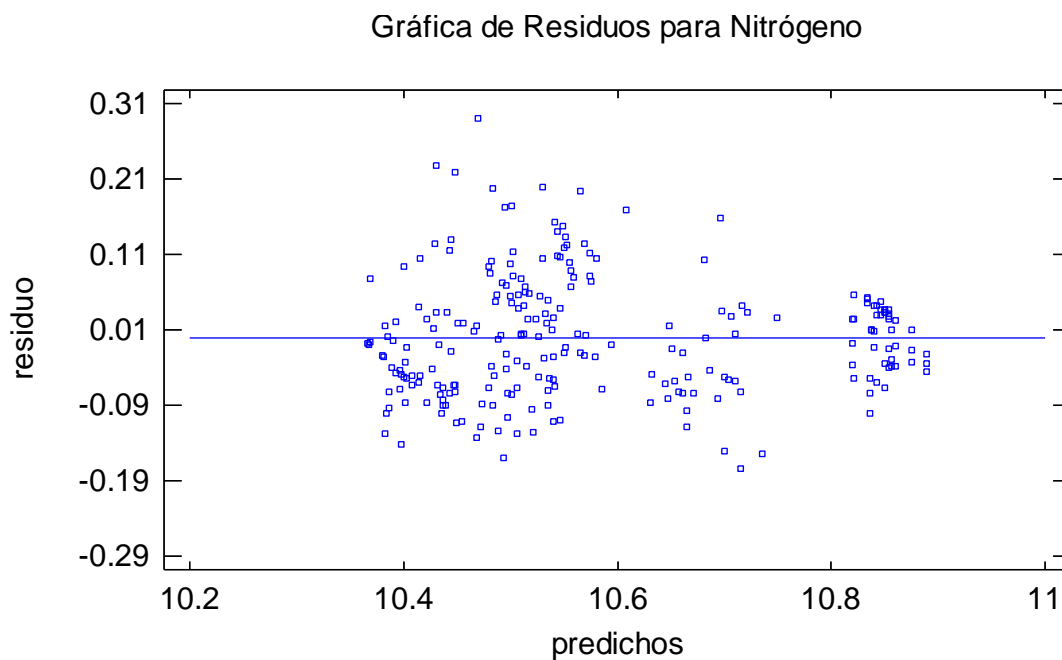
Etheridge (1998) realizó un estudio el quipo LECO CNS 2000 el cual determinó que el mayor contenido de nitrógeno se daba cuando la temperatura del horno de combustion era mayor, en contraste con ésta investigación observando el gráfico 3, se observa que el tiempo de integracion tiene mayor influencia en cuanto a detecion del contenido de nitrógeno.

Gráfico de Probabilidad Normal para Nitrógeno



**Gráfico 5.** Gráfico de probabilidad normal nitrógeno

En la Gráfica 5, se muestra la gráfica de probabilidad normal, puede usarse para ayudar a separar los efectos reales de aquellos que son simplemente ruido, es particularmente útil cuando hay pocos o ningún grados de libertad para estimar el error experimental, hay un punto en la gráfica para cada uno de los efectos en el modelo, la idea básica detrás de la gráfica es que los efectos que no son reales sino simples manifestaciones de ruido se comportarán como si provinieran de una distribución normal centrada en cero, la gráfica se escala de tal modo que los efectos que no son reales quedarán aproximadamente a lo largo de la línea recta, mientras que las señales reales quedarán fuera de la línea, se ha sobrepuesto una línea a la gráfica para sugerir cuales efectos estimados son simplemente ruido, puesto que se tienen suficientes grados de libertad para estimar el error experimental.



**Gráfico 6.** Gráfica de residuos para el contenido de nitrógeno

En la gráfico 6, se presenta los residuos versus los valores predichos de para el contenido de nitrógeno, cualquier patrón no aleatorio podría indicar que el modelo seleccionado no describe adecuadamente los datos observados, esta gráfica es especialmente buena para mostrar heterocedasticidad (cuando la varianza de las perturbaciones no es constante), en la cual la variabilidad de los residuos cambia conforme cambian los valores de la variable dependiente.

#### **4.4.3. ANÁLISIS DE SUPERFICIE RESPUESTA**

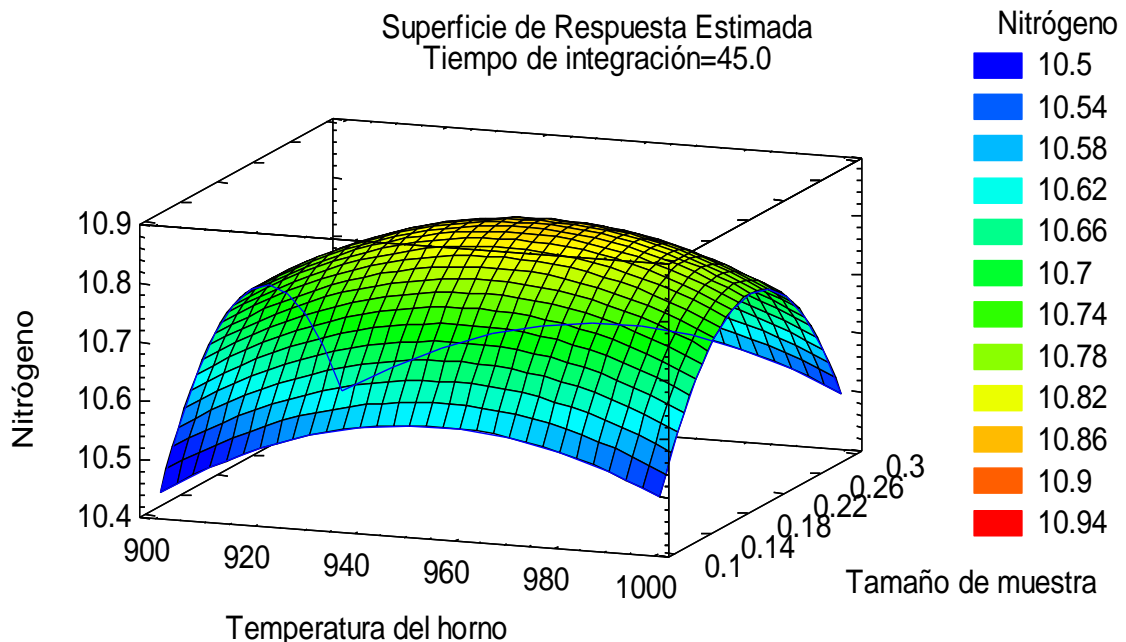
Para una mejor visualización a continuación se presentan las gráficas del comportamiento de la respuesta que está dado por el contenido de % Nitrógeno presente en la harina de pescado, en función a las variables estudiadas que son: temperatura de combustión, tamaño de muestra y tiempo de integración, éstas variables, describen una superficie basado en la ecuación, que se presentara posteriormente, el cual grafica solo dos variables estudiadas, manteniendo constante una de ellas en su nivel central, a continuación se presentan 3 superficies respuestas:

1. Superficie respuesta para las variables de temperatura de combustión y tamaño de muestra.
2. Superficie respuesta para las variables de temperatura de combustión y tiempo de integración.
3. Superficie respuesta para las variables de tamaño de muestra y tiempo de integración.

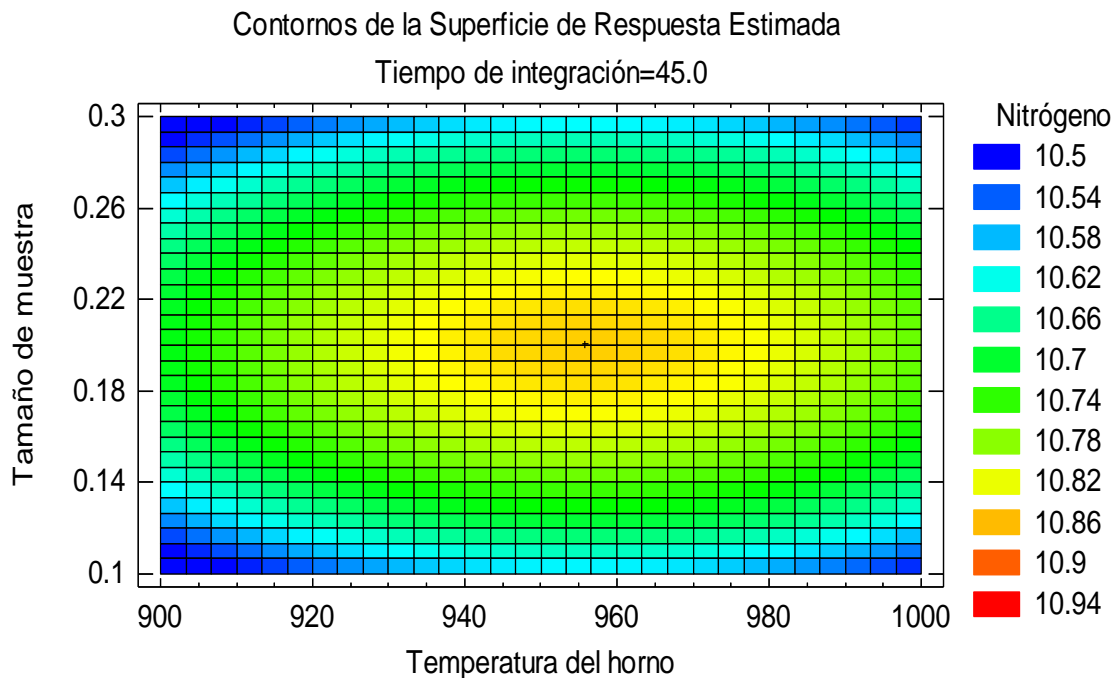


**4.4.3.1. Análisis del comportamiento de contenido de nitrógeno (%) en función a temperatura de combustión y tamaño de muestra**

En la gráfica 7, se muestra la estimación del contenido de nitrógeno en función de temperatura de combustión y tamaño de muestra, en donde se observa que la altura representa el contenido de nitrógeno en la muestra de harina de pescado, gráficamente se puede decir que el tamaño de muestra en 0.2 g y una temperatura de 950 °C aproximadamente, detecta la mayor concentración de nitrógeno dando como resultado un valor aproximado de 10.84, esta área es de color amarillo anaranjado tal como se muestra en la gráfica, para lograr obtener ésta representación tridimensional es necesario mantener el factor de tiempo de integración en su nivel medio de manera constante.



**Gráfico 7.** Superficie respuesta para el contenido de nitrógeno % en función a temperatura de combustión y tamaño de muestra

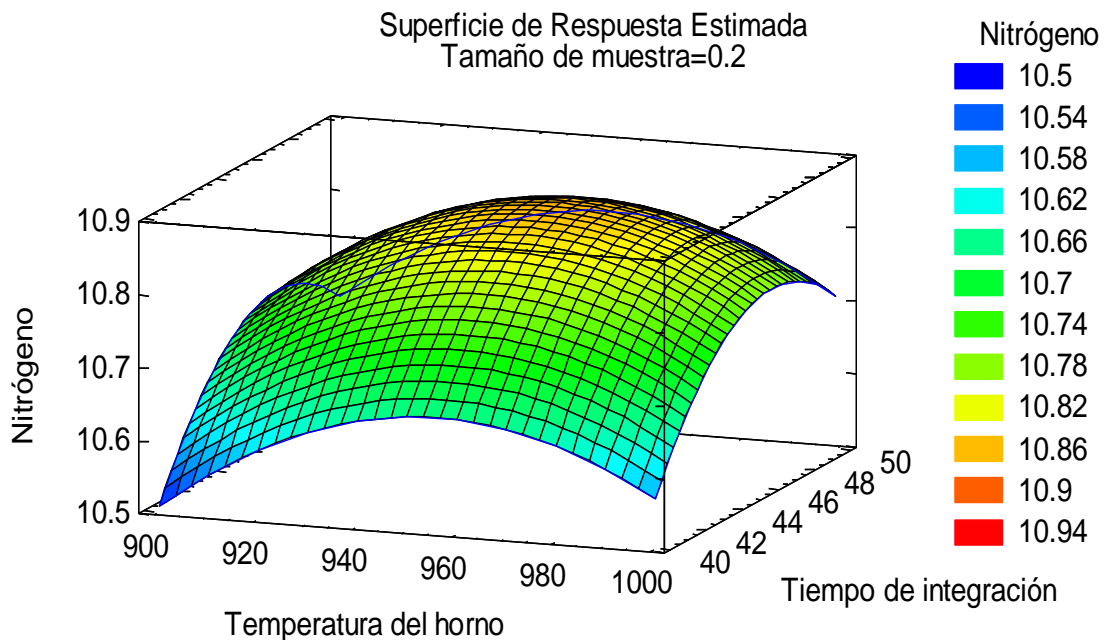


**Gráfico 8.** Contorno de la superficie para el contenido de nitrógeno % en función a temperatura de combustión y tamaño de muestra

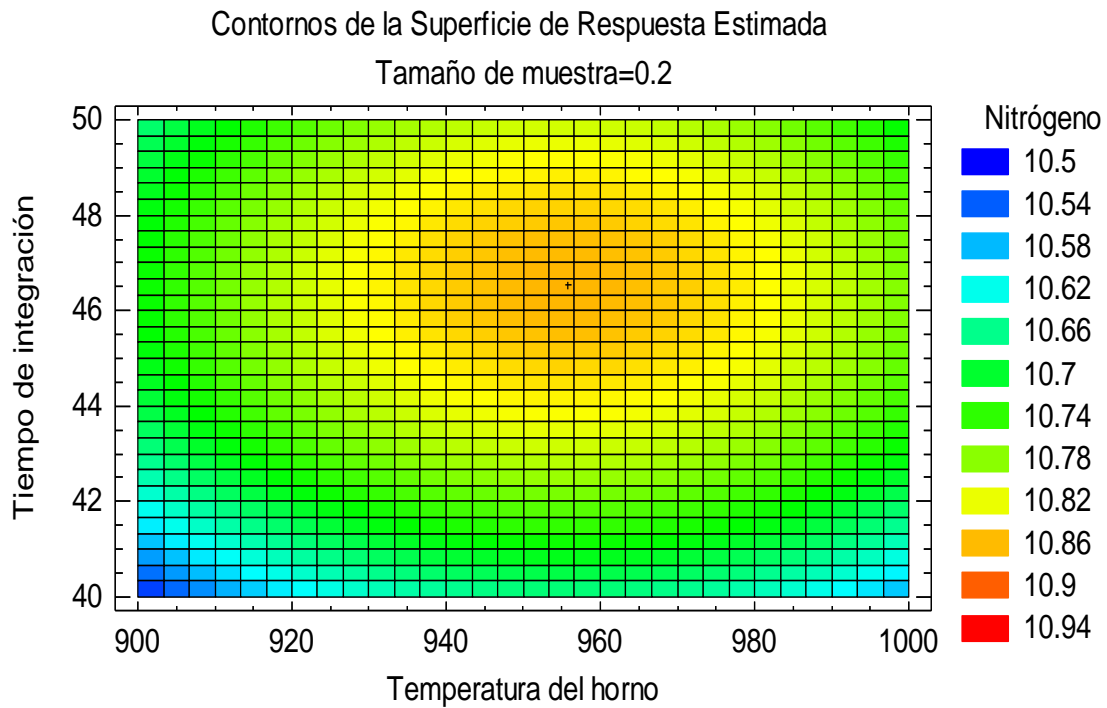
En la gráfica 8, se muestra desde una vista bidimensional la interacción de la temperatura de combustión y el tamaño de muestra, al igual que la gráfica anterior también se observa que a una temperatura de 950 °C y tamaño de muestra de 0.2 aproximadamente, se obtiene el mayor contenido de nitrógeno y este está representado con un color amarillo anaranjado dando un valor aproximado de 10.84 como se muestra en la tabla de colores.

**4.4.3.2. Análisis del comportamiento de contenido de nitrógeno (%) en función a temperatura de combustión y tiempo de integración**

En la gráfica 9, se muestra la estimación del contenido de nitrógeno en función de temperatura de combustión y tiempo de integración, en donde se observa que la altura representa el contenido de nitrógeno en la muestra de harina de pescado, gráficamente se puede decir que el tiempo de integración en 46 s y una temperatura de 950 °C aproximadamente, se detecta la mayor concentración de nitrógeno dando como resultado un valor aproximado de 10.84, esta área es de color amarillo anaranjado tal como se muestra en la gráfica, para lograr obtener ésta representación tridimensional es necesario mantener el de tamaño de muestra en su nivel medio de manera constante.



**Gráfico 9.** Superficie respuesta para el contenido de nitrógeno (%) en función a temperatura de combustión y tiempo de integración

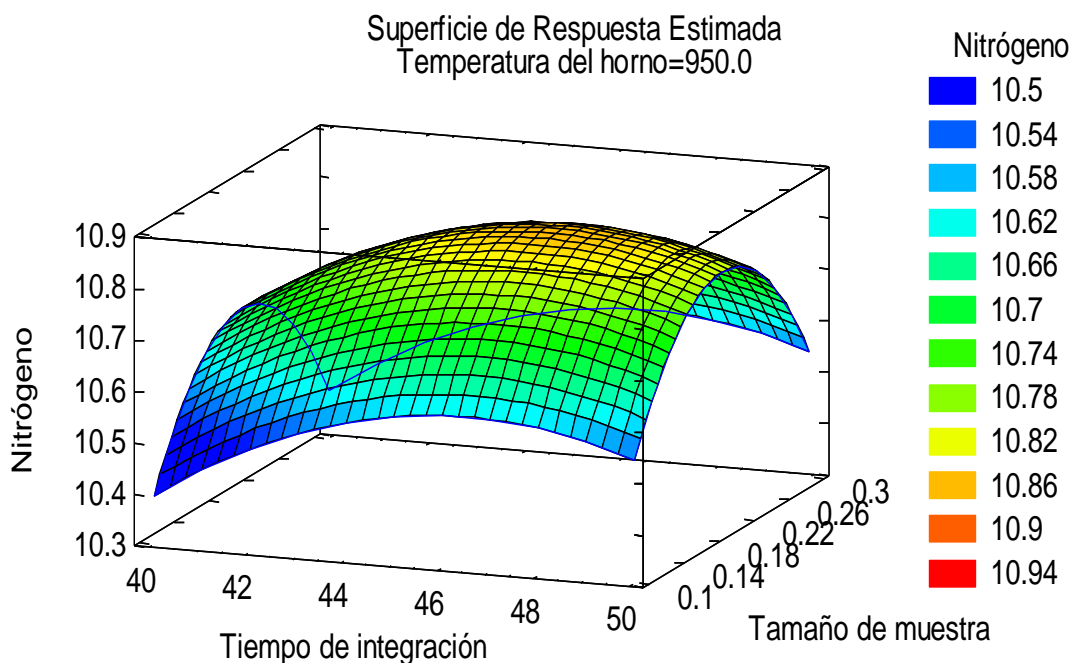


**Gráfico 10.** Contorno de la superficie para el contenido de nitrógeno (%) en función a temperatura de combustión y tiempo de integración

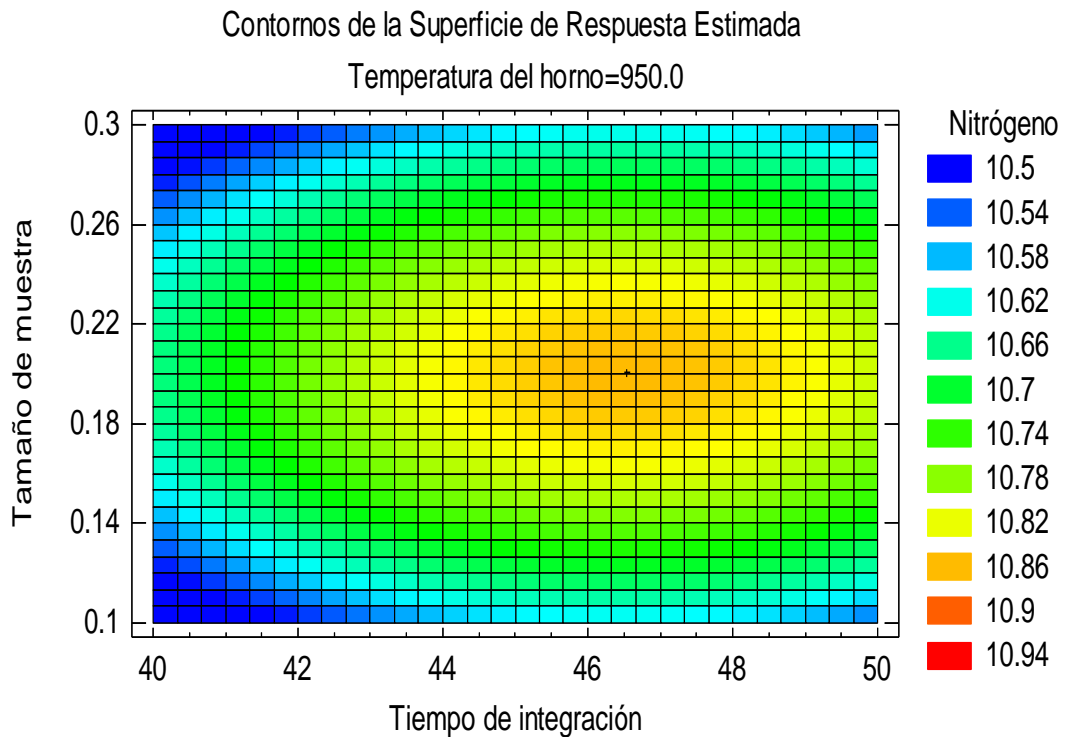
En la gráfica 10, se muestra desde una vista bidimensional la interacción de la temperatura de combustión y el tiempo de integración, al igual que la gráfica anterior también se observa que a una temperatura de 950 °C y un tiempo de 46 s aproximadamente, se obtiene el mayor contenido de nitrógeno y este está representado con un color amarillo anaranjado dando un valor aproximado de 10.84 como se muestra en la tabla de colores.

#### 4.4.3.3. *Análisis del comportamiento de contenido de nitrógeno (%) en función a tamaño de muestra y tiempo de integración*

En la gráfica 11, se muestra la estimación del contenido de nitrógeno en función tamaño de muestra y tiempo de integración, en donde se observa que la altura representa el contenido de nitrógeno en la muestra de harina de pescado, gráficamente se puede decir que el tamaño de muestra de 0.2 y el tiempo de integración en 46 s aproximadamente, se detecta la mayor concentración de nitrógeno dando como resultado un valor aproximado de 10.84, esta área es de color amarillo anaranjado tal como se muestra en la gráfica, para lograr obtener ésta representación tridimensional es necesario mantener temperatura de combustión en su nivel medio de manera constante.



**Gráfico 11.** Superficie respuesta para el contenido de nitrógeno (%) en función al tamaño de muestra y tiempo de integración



**Gráfico 12.** Contorno de la superficie para el contenido de nitrógeno (%) en función al tamaño de muestra y tiempo de integración

En la gráfica 12, se muestra desde una vista bidimensional la interacción de tamaño de muestra y el tiempo de integración, al igual que la gráfica anterior también se observa que a tamaño de muestra de 0.2 y un tiempo de 46 s aproximadamente, se obtiene el mayor contenido de nitrógeno y este está representado con un color amarillo anaranjado dando un valor aproximado de 10.84 como se muestra en la tabla de colores.

#### 4.4.4. AJUSTE DE LA VARIABLE RESPUESTA AL MODELO MATEMÁTICO EXPERIMENTAL DE SEGUNDO ORDEN

En la tabla 14, se presentan los valores de los coeficientes de la ecuación del modelo matemático de segundo orden, estos valores se calcularon mediante con el programa Statgraphics Centurion, el software realiza los ajustes para obtener una ecuación que determine el contenido de nitrógeno en la muestra de harina de pescado.

**Tabla 14.** Coeficiente de regresión para Nitrógeno

COEFICIENTE	ESTIMADO
Constante	-43.887
A:Temperatura del horno	0.0906974
B:Tiempo de integración	0.446661
C:Tamaño de muestra	10.0486
AA	-0.0000474365
AB	-8.75E-7
AC	0.000225
BB	-0.00479927
BC	0.00246875
CC	-25.8951

La ecuación del modelo ajustado viene a ser la siguiente:

$$\text{Nitrógeno} = -43.887 + 0.0906974 * \text{Temperatura del horno} + 0.446661 * \text{Tiempo de integración} + 10.0486 * \text{Tamaño de muestra} - 0.0000474365 * \text{Temperatura del horno}^2 - 8.75E-7 * \text{Temperatura del horno} * \text{Tiempo de integración} + 0.000225 * \text{Temperatura del horno} * \text{Tamaño de muestra} - 0.00479927 * \text{Tiempo de integración}^2 + 0.00246875 * \text{Tiempo de integración} * \text{Tamaño de muestra} - 25.8951 * \text{Tamaño de muestra}^2$$

#### 4.4.5. CONDICIONES ÓPTIMAS PARA DETERMINAR LA MAYOR CONCENTRACIÓN DE NITRÓGENO

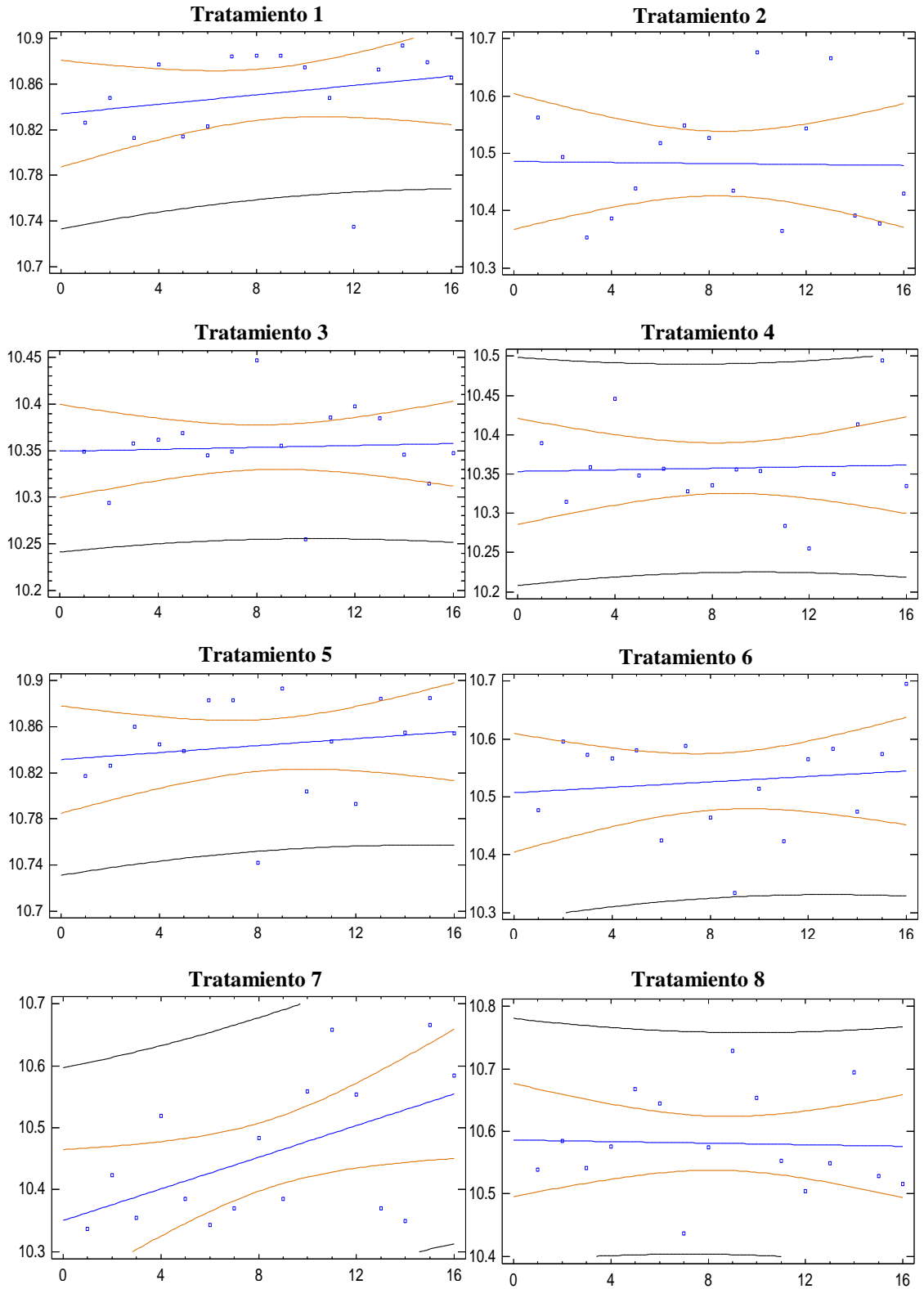
En la tabla 15, se presentan los factores con sus niveles, en dicha tabla también se observa que a través del software de la herramienta estadística statgraphics centurión, presenta un valor óptimo para detectar el mayor concentración de nitrógeno en la muestra de harina de pescado, estos valores óptimos que se presentan son cercanos al al nivel central que son: temperatura de combustión de 950 °C, tiempo de integración 45s y tamaño de muestra de 0.2, el resultado de estos valores óptimos son el producto de las combinaciones de los 13 tratamientos distintos y 16 repeticiones a través del software, estos valores se pueden observar en la tabla 10, para este caso en particular la determinación del mayor contenido de nitrógeno no necesariamente nos quiere decir que sea el mejor tratamiento.

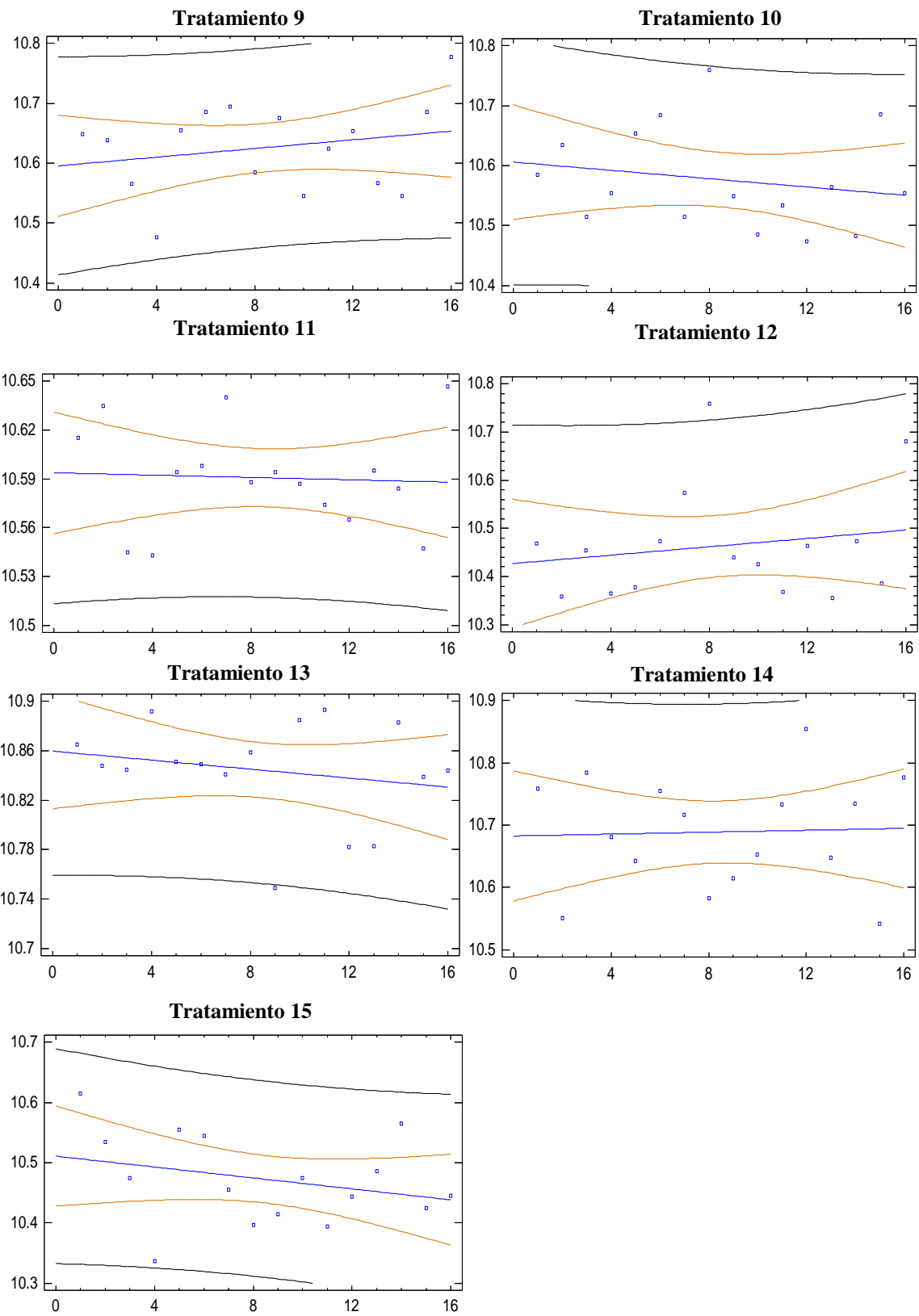
**Tabla 15.** Valores óptimos el diseño Box – Behnken

<b>FACTOR</b>	<b>BAJO</b>	<b>ALTO</b>	<b>ÓPTIMO</b>
Temperatura de Combustión (°C)	900.0	1000.0	956.06
Tiempo de Integración (s)	40	50	46.50
Tamaño de Muestra (g)	0.1	0.3	0.20



#### 4.4.6. REPETIBILIDAD DE MUESTRAS DE HARINA DE PESCADO





**Gráfico 13.** Repetibilidad de la muestra de harina de pescado por cada método

De Gráfico 13, se muestra la repetibilidad de la muestra de harina de pescado de los 15 tratamientos según el diseño Box – Behnken, se observa el comportamiento de los tratamientos a través del tiempo, del gráfico se observa que el tratamiento 1, 5 y 8 que presentan los valores más altos en cuanto a contenido de nitrógeno en la muestra de harina de pescado, las líneas color naranja en cada tratamiento representan los límites de confianza y las líneas de color negro representan los límites de predicción, anteriormente se mencionó que el tratamiento 11 es el que presenta menor coeficiente de variación y en el gráfico también se observa que los valores están dentro de los límites de predicción.

Saint (2004) realizó una investigación para determinar la optimización de los parámetros del equipo LECO FP-2000, éste concluyó que el parámetro de temperatura de combustión, tiene mayor influencia para la determinación del mayor contenido de nitrógeno, a mayores temperaturas obtenía mejores resultados. Actualmente el equipo LECO 628 CHNS tiene mayor sensibilidad, no necesariamente necesita mayor temperatura para obtener mejores resultados sino un conjunto de parámetros, el cual de acuerdo a los resultados también se puede decir que el tiempo de integración juega un rol importante en la determinación del contenido de nitrógeno en la muestra.

#### 4.4.7. ANÁLISIS DE TUKEY PARA LOS TRATAMIENTOS

En la tabla 16, se muestra el análisis Tukey (mediante el software minitab) para los 15 tratamientos, éste análisis básicamente lo que hace es discriminar si existe diferencia significativa o no entre las medias, esto ayuda poder elegir entre un tratamiento u otro que estadísticamente sea significativamente igual, como se observa en la tabla los tratamientos 13, 1 y 5 que presentan mayor detección de nitrógeno en la muestra de harina de pescado, sus medias son estadísticamente iguales, el tratamiento 14, 9 y 11, son estadísticamente iguales, el tratamiento 11 es que presenta un menor coeficiente de variación de los 15 tratamientos, de este tratamiento cual podemos decir que es el más estable a través del tiempo, el cual tiene como parámetros; temperatura de combustión de 900 °C y el tiempo de integración de 50 s. En la tabla se muestra los 15 tratamientos, en ella se observa que los tratamientos que estadísticamente tienen el mismo valor promedio llevan en común la misma letra.

**Tabla 16.** Análisis Tukey para medias iguales estadísticamente

TRATAMIENTOS	MEDIAS				
13	A				
1	A				
5	A				
14		B			
9		B	C		
11		B	C	D	
8			C	D	
10			C	D	
6				D	E
2					E
15					E
12					E
7					E
4					F
3					F

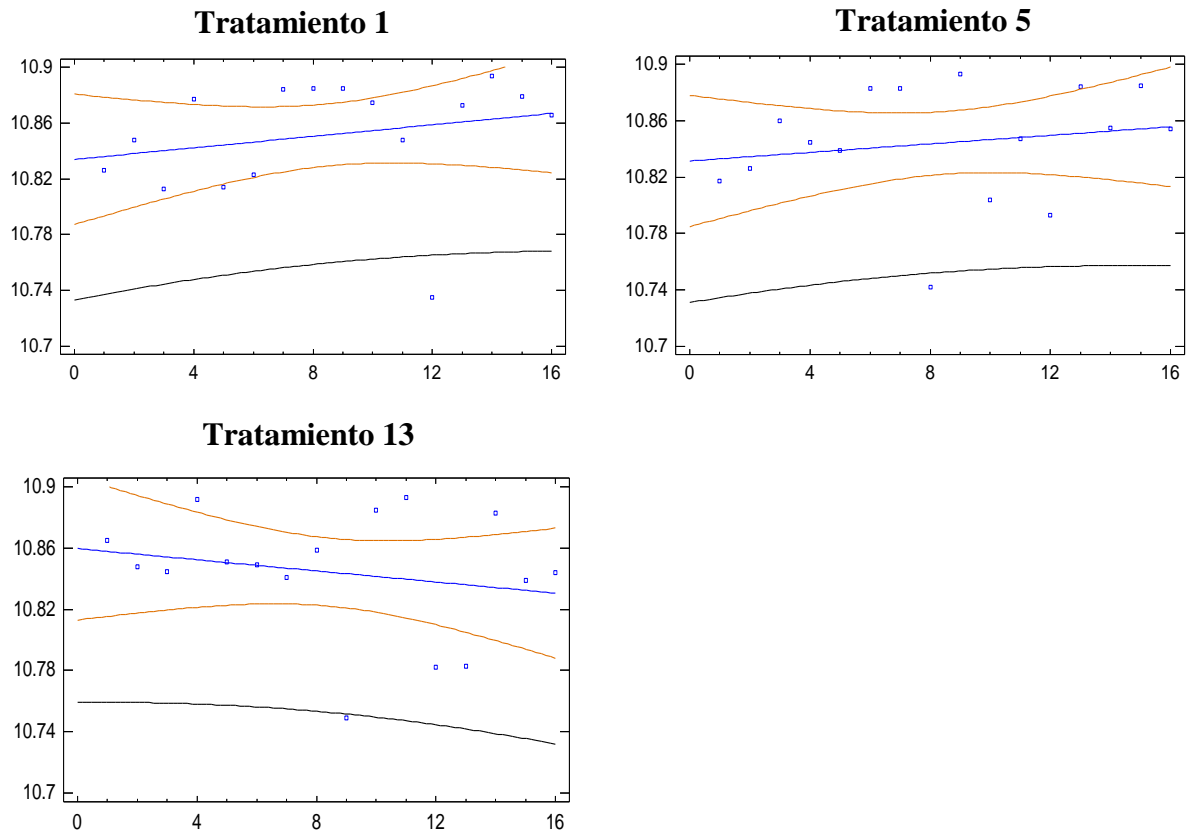
Las medias que no comparten una letra, son significativamente diferentes, *Minitab XVII*.

#### 4.5. ANÁLISIS CONFIRMATIVO SEGÚN LOS NIVELES ÓPTIMOS

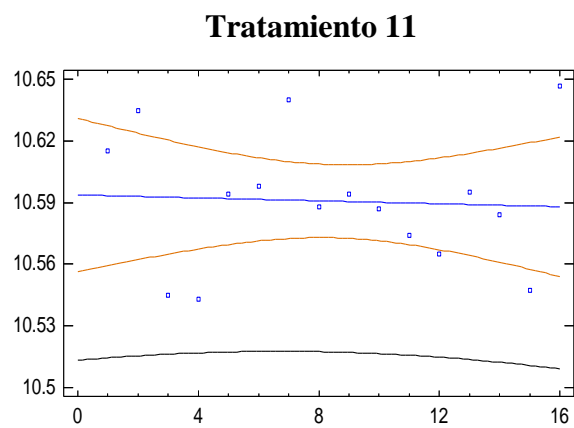
En la tabla 17, se muestra la comparación entre los dos tratamientos, el tratamiento que presenta una mayor detección de nitrógeno frente al tratamiento que presenta menor coeficiente de variación, el tratamiento que tiene como parámetros de temperatura de combustión de 950 °C, tiempo de integración de 45 s y tamaño de muestra de 0.2 g, presenta mayor detección de nitrógeno en la muestra de harina de pescado, mientras que el tratamiento presenta una menor detección de nitrógeno, pero a su vez presenta un menor coeficiente de variación en harina de pescado, tiene como parámetros, temperatura de combustión de 900 °C y tiempo de integración de 50 s, el que un tratamiento presente un menor valor en coeficiente de variación nos quiere decir que el tratamiento presenta una mejor repetibilidad a través del tiempo, éste tratamiento es más estable, a pesar que presenta valores más bajos en cuanto detección de nitrógeno en la harina de pescado con respecto al tratamiento que se contrasta.

**Tabla 17.** Comparación entre tratamientos

<b>Temperatura horno °C</b>	950		900	
<b>Tiempo Integración s</b>	45		50	
<b>Peso de muestra g</b>	0.2		0.2	
	10.826	10.817	10.865	10.615
	10.848	10.826	10.848	10.635
	10.813	10.860	10.845	10.545
	10.877	10.845	10.892	10.543
	10.814	10.839	10.851	10.594
	10.823	10.883	10.849	10.598
	10.884	10.883	10.841	10.640
	10.885	10.742	10.859	10.588
	10.885	10.893	10.749	10.594
	10.875	10.804	10.885	10.587
	10.848	10.847	10.893	10.574
	10.735	10.793	10.782	10.565
	10.873	10.884	10.783	10.595
	10.894	10.855	10.883	10.584
	10.879	10.885	10.839	10.547
	10.866	10.854	10.844	10.647
<b>Promedio</b>			<i>10.847</i>	<i>10.591</i>
<b>Coef. Variación</b>			<i>0.3715</i>	<i>0.3041</i>



**Gráfico 14.** Repetibilidad de los tratamientos que detectan mayor cantidad de nitrógeno



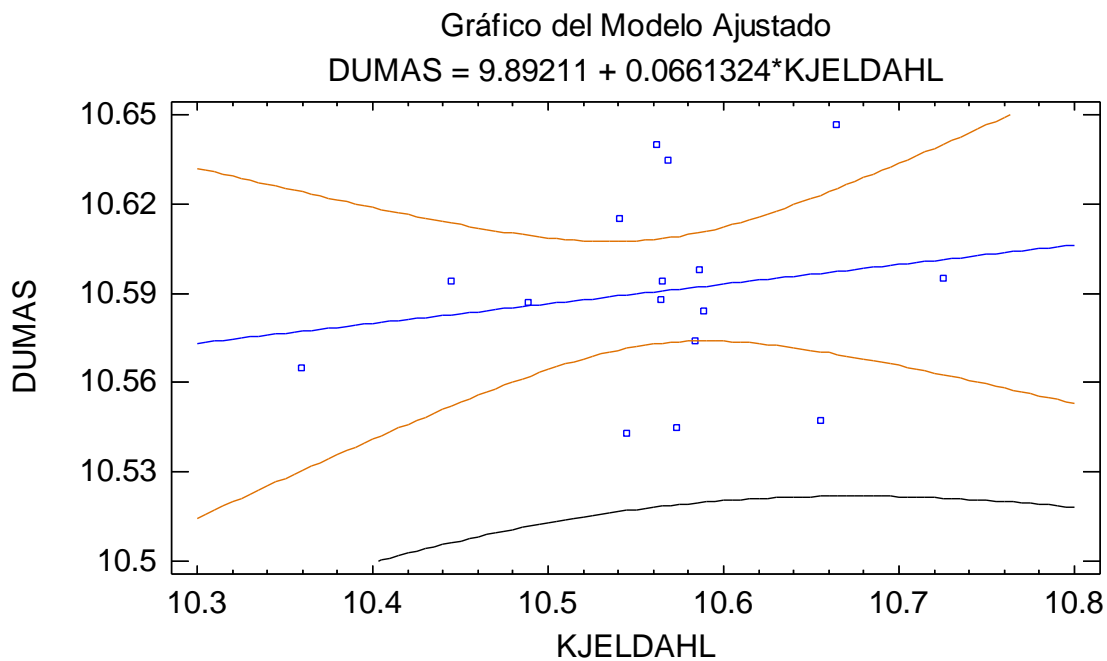
**Gráfico 15.** Repetibilidad del tratamiento con menor coeficiente de variación

#### 4.5.1. CORRELACIÓN ENTRE EL MÉTODO KJELDAHL Y DUMAS PARA UNA MUESTRA DE HARINA DE PESCADO

En la tabla 18, se muestra el contenido de nitrógeno a partir de la muestra de harina de pescado, se contrastó el método tradicional kjeldahl y con el método Dumas, este último tiene como parámetros la temperatura de combustión del horno a 900 °C y el tiempo de integración de 50 s y tamaño de muestra de 0.2 g y el otro método tiene temperatura de combustión del horno a 950 °C y el tiempo de integración de 45 s y tamaño de muestra de 0.2 g, los valores obtenidos del método Dumas se recogió de la tabla 10, utilizando el tratamiento 11 y los tratamientos 1, 5 y 13. En esta tabla se observa que en promedio el método dumas es mayor que el método kjeldahl por 0.032 % en cuanto a detección del contenido de nitrógeno.

**Tabla 18.** Correlación de métodos a igual concentración

MUESTRA DE HARINA DE PESCADO	KJELDAHL	DUMAS			
		Temp.=900 °C Tiempo= 50 s Muestra= 0.2 g	Temp.=950 °C Tiempo= 45 s Muestra= 0.2 g		
1	10.541	10.615	10.826	10.817	10.865
2	10.568	10.635	10.848	10.826	10.848
3	10.573	10.545	10.813	10.860	10.845
4	10.545	10.543	10.877	10.845	10.892
5	10.565	10.594	10.814	10.839	10.851
6	10.586	10.598	10.823	10.883	10.849
7	10.562	10.640	10.884	10.883	10.841
8	10.564	10.588	10.885	10.742	10.859
9	10.445	10.594	10.885	10.893	10.749
10	10.489	10.587	10.875	10.804	10.885
11	10.584	10.574	10.848	10.847	10.893
12	10.359	10.565	10.735	10.793	10.782
13	10.725	10.595	10.873	10.884	10.783
14	10.589	10.584	10.894	10.855	10.883
15	10.655	10.547	10.879	10.885	10.839
16	10.664	10.647	10.866	10.854	10.844
<b>Promedio</b>	<i>10.563</i>	<i>10.591</i>			<i>10.847</i>

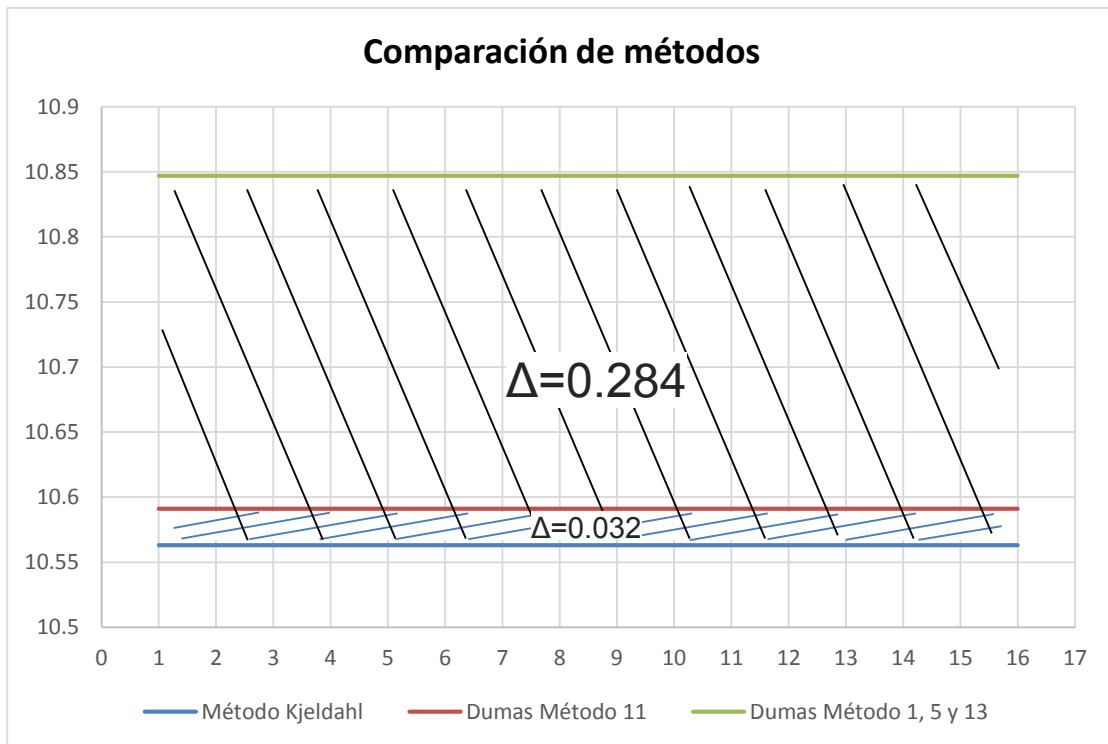


**Gráfico 16.** Correlación entre el método Kjeldahl y método Dumas de una misma muestra

En gráfico 16, se muestra los resultados de la correlación entre el método Dumas (tratamiento 11) y el método Kjeldahl para una muestra de harina de pescado, como se observa de ésta gráfica, describe una relación entre métodos, del cual obtenemos la siguiente ecuación de correlación:  $Dumas = 9.89211 + 0.0661324 * Kjeldahl$ .

En una investigación reportado por Etheridge (1998), realizó una correlación entre ambos métodos, con el equipo de Leco FP CNS 2000, en el cual encontró una mínima diferencia en ambos métodos.





**Gráfico 17.** Diferencia entre el método de Kjeldahl y el método Dumas

El gráfico 17, podemos observar que existe una diferencia de 0.032 % del método Dumas con el tratamiento 11 y 0.284 % del método Dumas con los tratamientos 1, 5 y 13, con respecto al método kjeldahl.

## V. CONCLUSIONES

- Utilizando el diseño Box Behnken, con la ayuda de la herramienta estadística Statgraphics centurión, se logró optimizar los parámetros del equipo Dumas CHNS 628, se determinó dos condiciones óptimas, la primera, para detectar la mayor cantidad de nitrógeno, tiene como parámetros: temperatura del horno de combustión es de 956.06 °C, el tiempo óptimo de integración óptimo es de 46.50 s y el tamaño de muestra óptima es de 0.2, y la segunda para lograr repetibilidad, tiene como parámetros: temperatura del horno de combustión es de 900 °C, el tiempo de integración de 50 s y el tamaño de muestra óptima es de 0.2.
- Al utilizar los parámetros optimizados para determinar el contenido de nitrógeno en Dumas con respecto al mejor tratamiento, se obtuvo una sensibilidad expresada como coeficiente de variación, el tratamiento 1, 5 y 13 para detectar el mayor contenido de nitrógeno tenemos en promedio 0.378 y para el tratamiento 11, que presenta mayor repetibilidad tenemos 0.304. La mayor concentración de nitrógeno no necesariamente garantiza la repetibilidad a través del tiempo, por lo cual el método más estable viene a ser el que presenta menor coeficiente de variación, y éste tiene los siguientes parámetros; temperatura de combustión de 900 °C, tiempo de integración de 50 s y el tamaño de muestra de 0.2 gramos.
- Se determinó que el factor de corrección entre el método Kjeldahl y el método Dumas con el tratamiento 1, 5 y 13 para una muestra de harina de pescado es de 0.284 %, y para el tratamiento 11 es 0.032 %. A través de la correlación entre el método Kjeldahl y el método Dumas con el tratamiento 11, se obtuvo la siguiente ecuación:  $Dumas = 9.89211 + 0.0661324 * Kjeldahl$ .
- En general, el método Dumas es más eficiente en cuanto a detección del porcentaje de Nitrógeno, los resultados toman alrededor de 3 minutos y no requiere reactivos controlados que causan daño al medio ambiente.

## VI. RECOMENDACIONES

- Las muestras que se sometan al método de combustión Dumas, debe de contener un porcentaje de humedad no superior al 10 %.
- Las muestras envueltas en papel estaño deben estar correctamente empacadas ya que influye en la determinación de nitrógeno.
- Para la realización de procedimiento de determinación de nitrógeno con el método kjeldahl se debe de tener precauciones al utilizar los reactivos.
- Realizar estudios de optimización de parámetros para la determinación de Nitrógeno por el método Dumas para otras muestras (cereales, lácteos, carnes, etc).
- Es recomendable que las muestras estén completamente trituradas, tamizadas con un tamiz número 120 y homogenizado antes de ser ingresadas al Analizador CHNS628.
- Es necesario identificar la calidad de los gases para los análisis en el CHNS628, ya que estos deben ser al alta pureza (UHP 99.9993%), puesto que si estos no son de la calidad recomendada los resultados serían no confiables.
- Según los resultados obtenidos el tamaño no influye significativamente, entonces se puede tomar 0.1 g de muestra para mayor practicidad.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

**ALEJANDRO MARCÓ, ET AL. (2002).** Comparison of the Kjeldahl method and a combustion method for total nitrogen determination in animal feed. *Talanta*, 57, 1019-1026.

**AYSUN KOP AND ALI YILDIRIM KORKUT (2010).** Effects of Diets with Different Fish Meal Origins on the Performance of Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 9(3), 581-583.

**BOHINSKI, R. C. (1991).** Bioquímica. 5ta. Ed. México: Editorial Pearson.

**JEAN-CLAUDE CHEFTEL, JEAN-LOUIS CUQ Y DENIS LORIENT (1989).** Proteínas alimentarias, bioquímica, propiedades funcionales, valor nutritivo, modificaciones químicas. Ed. Acribia, S. A., Zaragoza, España: Acribia.

**CRUZ-SUAREZ L. E. (1988).** Necesidades Nutricionales de Crustáceos. Proteínas y Aminoácidos. Memorias del Seminario Nacional de Nutrición y Alimentación Acuícola. Monterrey, México.

**DEL VALLE FRANCISCO (2008).** Una contribución a la solución del problema de la desnutrición de proteínas en México: un método nuevo para la conservación rápida y barata del pescado. DF México: Banco Nacional de Comercio Exterior.

**ERIC L. MILLER, ANTHONY P. BIMBO, STUART M. BARLOW AND BERNI SHERIDAN (2007).** Repeatability and Reproducibility of Determination of the Nitrogen Content of Fishmeal by the Combustion (Dumas) Method and Comparison with the Kjeldahl Method: Interlaboratory Study. *Journal Of AOAC International*, 90(1), 6-20.

**FAO (1961).** Alimentación. Futura evolución de la producción y utilización de la harina de pescado. *Roma, Vol II.* Italia.

**FAO (1975).** La producción de harina y aceite de pescado. Roma. Italia.

**FAO (1984).** Anuario Estadístico de Pesca. Productos Pesqueros. Roma. Italia.

**FAO (1986).** Anuario Estadístico de Pesca. Productos Pesqueros. Roma. Italia.

**FAO (1987).** Anuario Estadístico de Pesca. Productos Pesqueros. Roma. Italia.

**FAO (1989).** Anuario Estadístico de Pesca. Productos Pesqueros. Roma. Italia.

**FAO (1990).** Anuario Estadístico de Pesca. Productos Pesqueros. Roma. Italia.

**FAO (1991).** Anuario Estadístico de Pesca. Productos Pesqueros. Roma. Italia.

- FAO (1992).** Anuario Estadístico de Pesca. Productos Pesqueros. Roma. Italia.
- FAO (1993).** Anuario Estadístico de Pesca. Productos Pesqueros. Roma. Italia.
- FAO (1994).** Anuario Estadístico de Pesca. Productos Pesqueros. Roma. Italia.
- FAO (1995).** Anuario Estadístico de Pesca. Productos Pesqueros. Roma, Italia.
- FAO (2010).** Visión general del sector pesquero nacional Perú.
- FAO (2010).** Fish Meal, Department of trade and industry torry research station.
- FAO (2015).** Obtenido de <http://www.fao.org/3/a-y4705s/y4705s02.pdf>
- FERENC SZABADVÁRY (2016).** History of Analytical Chemistry: International Series of Monographs in Analytical Chemistry. 1ra ed. USA: Pergamon.
- FIGUEROA EUGENIO B. (2005).** Biodiversidad Marina: Valoración, usos y perspectivas hacia dónde va Chile? 1ra Ed. Santiago de Chile: Editorial Universitaria.
- FRANCISCO J. ZALDÍVAR LARRAIN (2002).** Las Harinas y Aceites de Pescado en la Alimentación Acuícola. Simposium internacional de Nutrición Acuícola (3 al 6 de septiembre del 2002). Cancún, México.
- GRAHAM GEORGE G., ANGEL CORDANO AND JUAN BAERTL (1963).** Studies in infantile malnutrition. II. Effect of protein and calorie intake on weight gain. *The Journal Nutrition*, 81(3), 249-254.
- GRAÜ DE MARÍN CRUCITA, MARVAL HILDA Y ZERPA DE MARCANO ARACELYS (2007).** Utilización de la harina de pescado en la formulación de alimentos para crecimiento y engorde animal. *Sitio Argentino de Producción Animal INIA*, 93-95.
- GREENFIELD H. AND SOUTHGATE D.T.A. (2006).** Datos de composición de alimentos: obtención, gestión y utilización. 2da ed. Roma: FAO.
- GUILLERMO LÓPEZ CUETO LOPEZ, (2005).** Lección inaugural curso 2004/2005: Química Analítica y Premio Nobel. Universidad de Alicante, Alicante, España.
- HARRY L. FISHER (2012).** Laboratory Manual of Organic Chemistry. 1ra ed. USA: Forgotten Books.
- JOANNA M. LYNCH AND DAVID M. BARBANO (1999).** Kjeldahl Nitrogen Analysis as a Reference Method for Protein Determination in Dairy Products. *JOURNAL OF AOAC INTERNATIONAL*, 82(6), 1389 -1398.
- JOHN M. WALKER (2009).** The Protein Protocols Handbook; Methods in Molecular Biology. 3ra ed. New Jersey: Humana Press.

**JOHN R. BROBECK, (2003).** Bases Fisiológicas de la práctica médica. 13va. Ed. Buenos Aires, Argentina: Editorial Panamericana.

**JOSÉ M. MACARULLA Y FELIX M. GOÑI (2002).** Biomoléculas: lecciones de bioquímica estructural. 3ra. Ed. España: Reverté.

**JÜRGEN MÜLLER (2014).** A White Paper from FOSS: Dumas or Kjeldahl for reference analysis? Comparison and considerations for Nitrogen/Protein analysis of food and feed.

**KLEEBERG F. Y ROJAS M., (2012).** Pesquería y Acuicultura en el Perú. 1 ed. Lima: Editorial Universidad de Lima.

**LABCONCO CORPORATION (1998).** A Guide To Kjeldahl Nitrogen Determination Methods and Apparatus. Houston, TX, USA.

**LECO CORPORATION (2014).** CHN 628 Carbon/Hydrogen/ Nitrogen Determinator Instruction Manual. Version 1.3x.

**LILIANA ALEJANDRA MERA RAMÍREZ (2015).** Comparación de los métodos kjeldahl y dumas para análisis de proteína cruda en materias primas y productos terminados en una planta de alimentos balanceados (Tesis de pregrado). Universidad Central de Ecuador, Quito, Ecuador.

**MADL RONALD L. (1993).** Evolution of protein quality determination. Technical Briefe. *Food and Drug Administration's proposed labeling rules for protein*, 38 (18), 296-297.

**MARIÑO SARA, ET AL. (2012).** Harina de pescado. Universidad Politécnica Territorial del edo Portuguesa J.J. Montilla. Ingeniería Agroalimentaria, Acarigua-edo Portuguesa. Venezuela.

**MARTIN ROY E., PAINE CARTER EMILY, J. FLICK GEORGE JR., LYNN M. DAVIS (2000).** Marine and Freshwater Products Handbook. 1st ed. Pensilvania, USA: board.

**MARTÍNEZ AUGUSTIN Y E. MARTÍNEZ DE VICTORIA MUÑOZ (2006).** Proteínas y péptidos en nutrición enteral. *Nutrición Hospitalaria*, 21, 1-14.

**MEDINA ROCIO (1993).** Implementación del sistema de análisis de riesgos y control de puntos críticos en la elaboración de harina de pescado (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Agraria la Molina, Lima, Perú.

**MICHAEL THOMPSON, LINDA OWEN, KATE WILKINSON, ROGER WOOD AND ANDREW DAMANT (2004).** Testing for bias between the Kjeldahl and Dumas methods for the determination of nitrogen in meat mixtures, by using data from a designed interlaboratory experiment. *Meat Science*, 68, 631- 634.

**MORRISON R.T. Y BOYD R. N. (1998).** Química Orgánica. 5ta Ed. Mexico: Addison Wesley Longman.

**NASIM AL MAHMUD, M.D. ROBIUL HASAN, M. BELAL HOSSAIN AND MARUF HOSSAIN MINAR (2012).** Proximate Composition of Fish Feed Ingredients Available in Lakshmipur Region, Bangladesh. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.*, 12(5), 556-560.

**NORBERTO RAMÍREZ LAVI (2014).** Harina a partir de los residuos sólidos crudos del procesamiento de conservas de filete y graded de *Colossoma Macropomum* (gamitana) por el método de prensado (Tesis de pregrado). Universidad Nacional De La Amazonía Peruana, Iquitos, Perú.

**OSBORNE, D. R. AND VOOGT P. (1978).** The analysis of nutrients in food. 1st. Ed. London, Inglaterra: Academic Press.

**PASTOR EDUARDO (1995).** Harinas especiales: Procesos, desarrollo y mercado. Revista Pesca.

**PESCA (1962).** Harina de pescado para consumo humano. *Revista editada por la Sociedad Nacional de Pesquería*, 11-17. Lima, Perú.

**PIKE J. (1990).** Perspectivas internacionales sobre las harinas de pescado especiales. Conferencia Anual de la IAFMM en Hong Kong.

**PILAR ROCA, JORDI OLIVER, ANA MARÍA RODRÍGUEZ (2003).** Bioquímica: técnicas y métodos. 1ra ed. Madrid, España: HELICE.

**R.D. ETHERIDGEA, G.M. PESTIB AND E.H. FOSTERA (1998).** A comparison of nitrogen values obtained utilizing the Kjeldahl nitrogen and Dumas combustion methodologies (Leco CNS 2000) on samples typical of an animal nutrition analytical laboratory. *Animal Feed Science and Technology*, 73, 21 - 28.

**RAMIREZ M. (1974).** La harina de pescado para el consumo humano. *Revista viernes médico*, 25(2), 207-211.

**RODNER BOYER, (2000).** Conceptos de Bioquímica. 1ra. Ed. Mexico: Internacional Thomson Editores.

**ROJAS SERGIO (1995).** Comercialización de la harina de pescado para consumo animal. En Mundo Avícola N° 15. Lima. Perú.

**RUITER, A. (1995).** Fish and fishery products composition, nutritive properties and stability, *Food Chemistry*, 56 (2), 195-196.

**SANDBOL (1993).** Nueva Tecnología en la Producción de Harina de Pescado para Piensos: Implicaciones sobre la evaluación de la calidad. IX curso de especialización FEDNA Barcelona, España.

**SALLATO BERNARDITA C. (2015).** El mito de las diferencias entre nitrógeno Kjeldahl y Dumas. *Red agrícola*, 59, 1-2.

**SERRANO S., RINCÓN F., J. GARCÍA-OLMO, (2013).** Cereal protein analysis via Dumas method: Standardization of a micro-method using the EuroVector Elemental Analyser. *Journal of Cereal Science*, 58, 31-36.

**SIMONNE A.H, E.H SIMONNE, R.R EITEN MILLER, H.A. MILLS Y C.P CRESMAN. (1997).** Could the Dumas Method Replace the Kjeldahl Digestion for Nitrogen and Crude Protein Determination in Foods?. *J. Sci Food Agric*, 73, 39 – 45.

**SONIA LEONOR TALLEDO ESPINOSA (2010).** Situación y perspectiva de la harina de pescado: Caso peruano de 1980-2007 (Tesis de postgrado). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

**SUÁREZ LOPEZ M. M., KIZLANZKY A. Y LÓPEZ L. B. (2006).** Evaluación de la calidad de las proteínas de los alimentos calculando el escore de aminoácidos corregido por digestibilidad. *Nutrición Hospitalaria*, 21(1), 47-51.

**SWEENEY R.A, P.R. REXROAD. (1987).** Comparison of LECO FP-228 ‘Nitrogen Determinator’ with AOAC copper catalyst Kjeldahl method for crude protein. *J. AOAC 70. J Assoc Off Anal Chem*, 70(6), 1028-1030.

**THIERRY SAINT-DENIS AND JACQUES GOUPY (2004).** Optimization of a nitrogen analyser based on the Dumas method. *Analytica Chimica Acta*, 515, 191-198.

**VALENZUELA ALFONSO B., SANHUEZA JULIO C. Y DE LA BARRA FERNANDO D. (2012).** El aceite de pescado: ayer un desecho industrial, hoy un producto de alto valor nutricional. *Revista chilena de nutrición*, 39 (2), 201-2019.

**VAN VEEN A. AND M. VAN VEEN. 1973.** Labor precursora sobre alimentos ricos en proteínas. *Noticiario de Nutrición*, 111(4), 23-26.

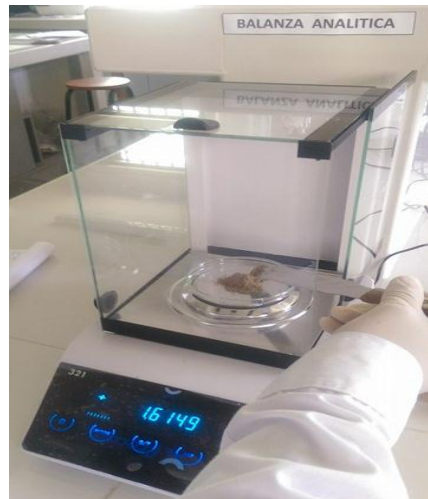
**VRSANSKA MARTINA, KUMBAR VOJTECH (2015).** A comparison of Biuret, Lowry and Bradford methods for measuring the egg’s proteins. *Mendel Net*, 394-398.

**ZALDIVAR JAVIER (1996).** La calidad de la harina de pescado y sus formas de control. *Revista Chile Pesquer*, N° 95, 47-50.



## VIII. ANEXOS

### Anexo 1. Determinación De Humedad



$$\%Humedad = \frac{P_i - P_f}{P_i} * 100$$

Pi = Masa inicial de la muestra en gramos.  
Pf = Masa final de la muestra en gramos.

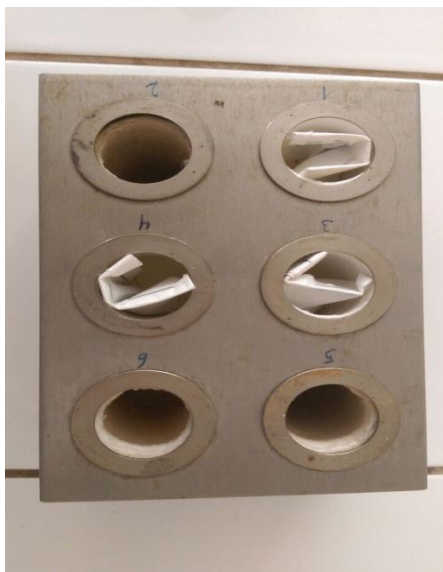
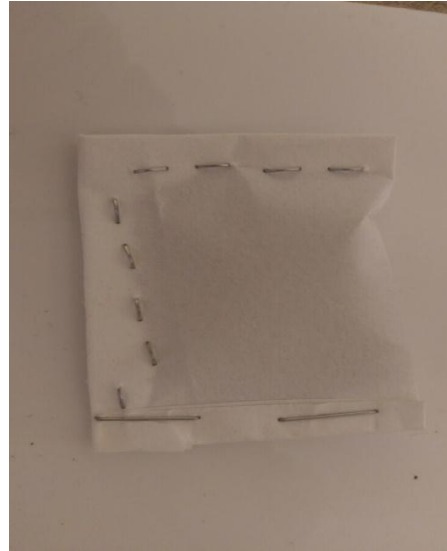
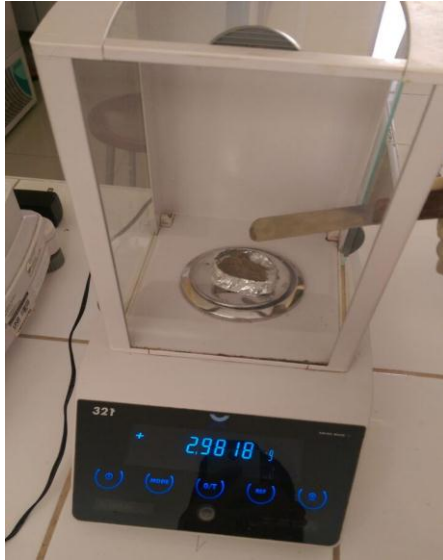
## Anexo 2. Determinación De Ceniza



$$\%Ceniza = \frac{P_i - P_f}{P_i} * 100$$

Pi = Masa inicial de la muestra en gramos.  
Pf = Masa final de la muestra en gramos.

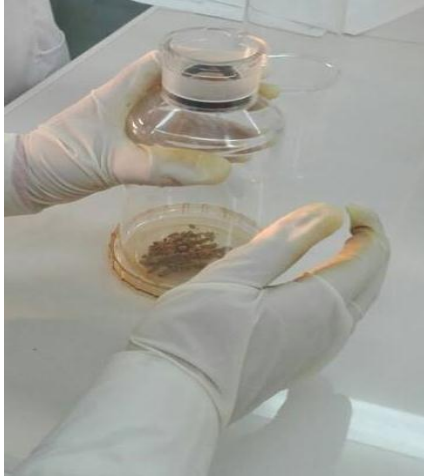
### Anexo 3. Determinación De Grasa



$$\text{Aceite, \%} = \frac{D_f - D_i}{W}$$

**$D_f$** : Deposito final  
 **$D_i$** : Deposito Inicial  
 **$W$** : Peso de muestra

#### Anexo 4. Determinación De Fibra



$$FDT, \% = \frac{\frac{r_1+r_2}{2} - C - P - B}{\frac{m_1-m_2}{2}} * 100$$

**$r_1$ : Residuo 1**

**$r_2$ : Residuo 2**

**$C$ : Ceniza**

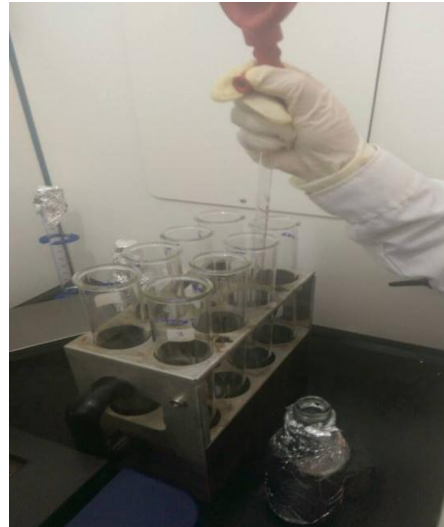
**$P$ : Proteína**

**$B$ : Blanco**

**$m_1$ : Peso de muestra 1**

$m_2$ : Peso de muestra 2

### Anexo 5. Determinación de Nitrógeno por el Metodo Kjeldahl



$$\text{Nitrogeno, \%} = \frac{1.4007 * V_g * M}{W}$$

$V_g$ : Volumen del gasto  
 $M$ : Molaridad  
 $W$ : Peso de muestra

## Anexo 6. Creación de método de análisis

Methods - CHNS628 Series

Analysis Parameters | Element Parameters | Burn Profile | Macro Ballast Parameters

Sample Size  
Macro (10 mgs - 0.5 grams)

No Sample Drop Detection  times N Blank

Furnace  
Temperature  0 - 1050 °C  
Afterburner Temperature  0 - 1050 °C

OK Cancel Help

---

Methods - CHNS628 Series

Analysis Parameters | Element Parameters | Burn Profile | Macro Ballast Parameters

	Nitrogen	Carbon	Hydrogen	Range
Analyze	Yes	Yes	Yes	
Baseline Delay	10	0	0	0 - 60 seconds
Minimum Analy	40	45	45	0 - 400 seconds
Comparator Lev	100.00	100.00	100.00	0 - 100%
Endline Time	2	1	1	0 - 5 seconds
Conversion Fact	1.00	1.00	1.00	0.01 - 99.9
Significant Digi	5	5	5	1 - 5

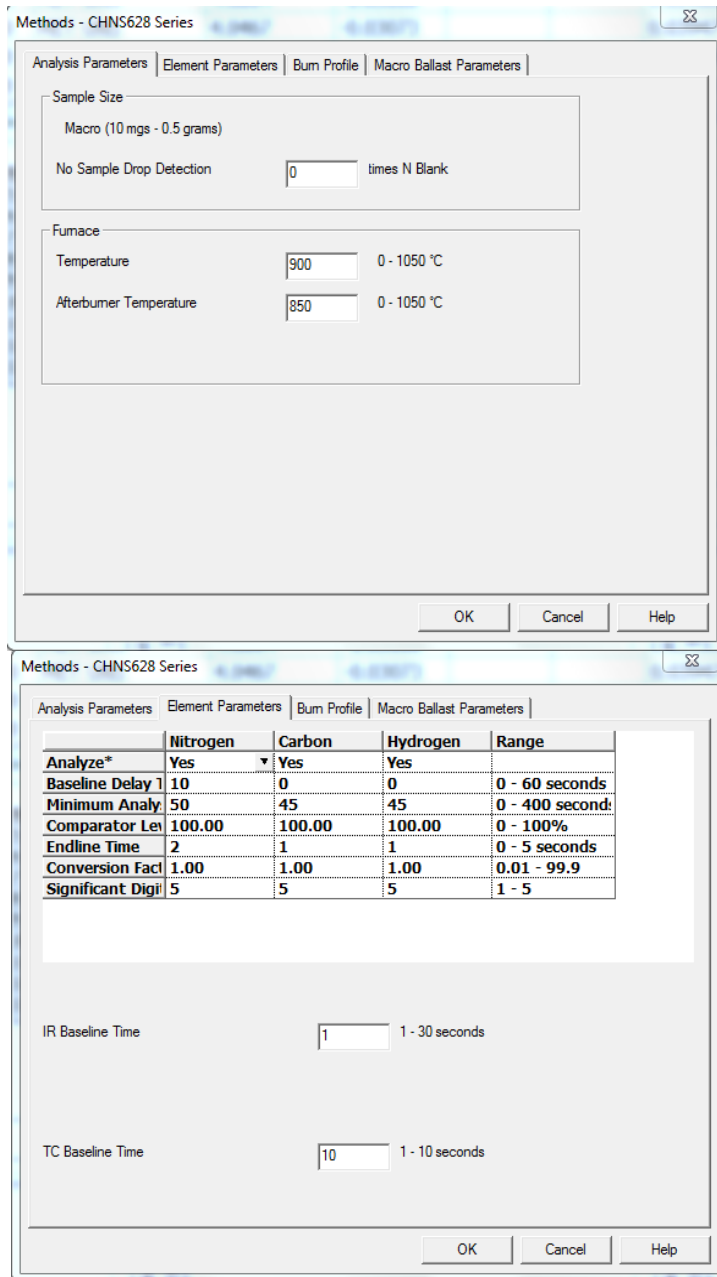
IR Baseline Time  1 - 30 seconds

TC Baseline Time  1 - 10 seconds

OK Cancel Help

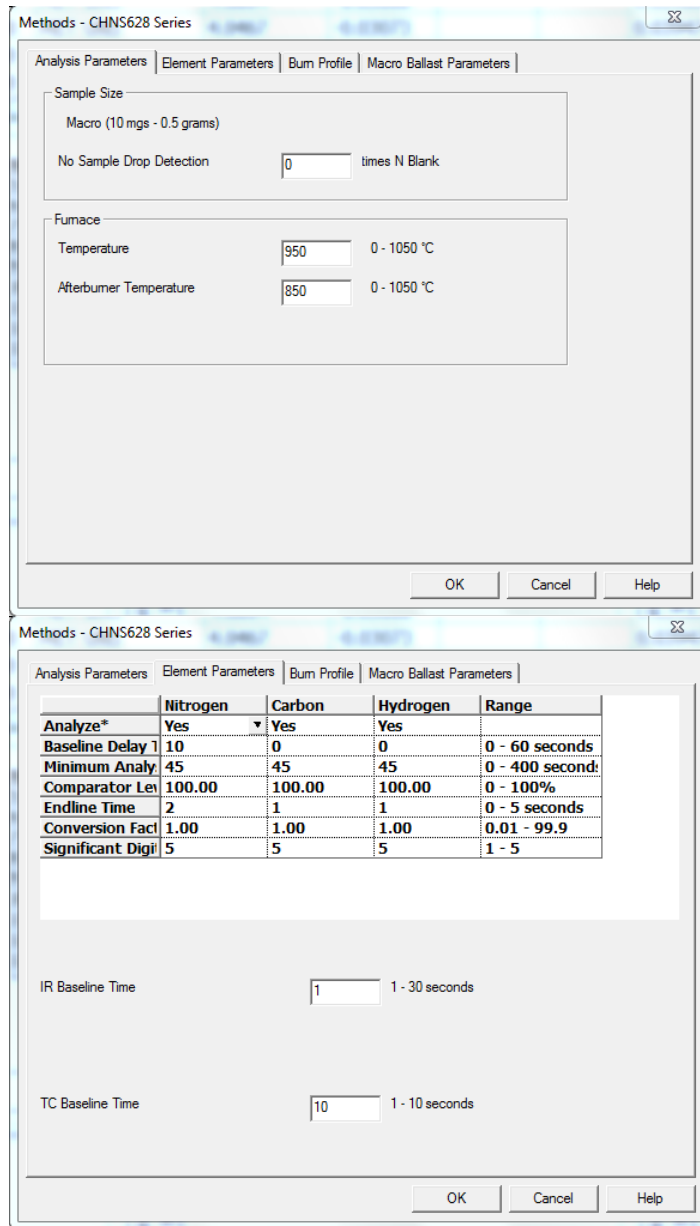
**Figura 30.** Temperatura de combustión a 900°C y Tiempo de Integración de 40 segundos.



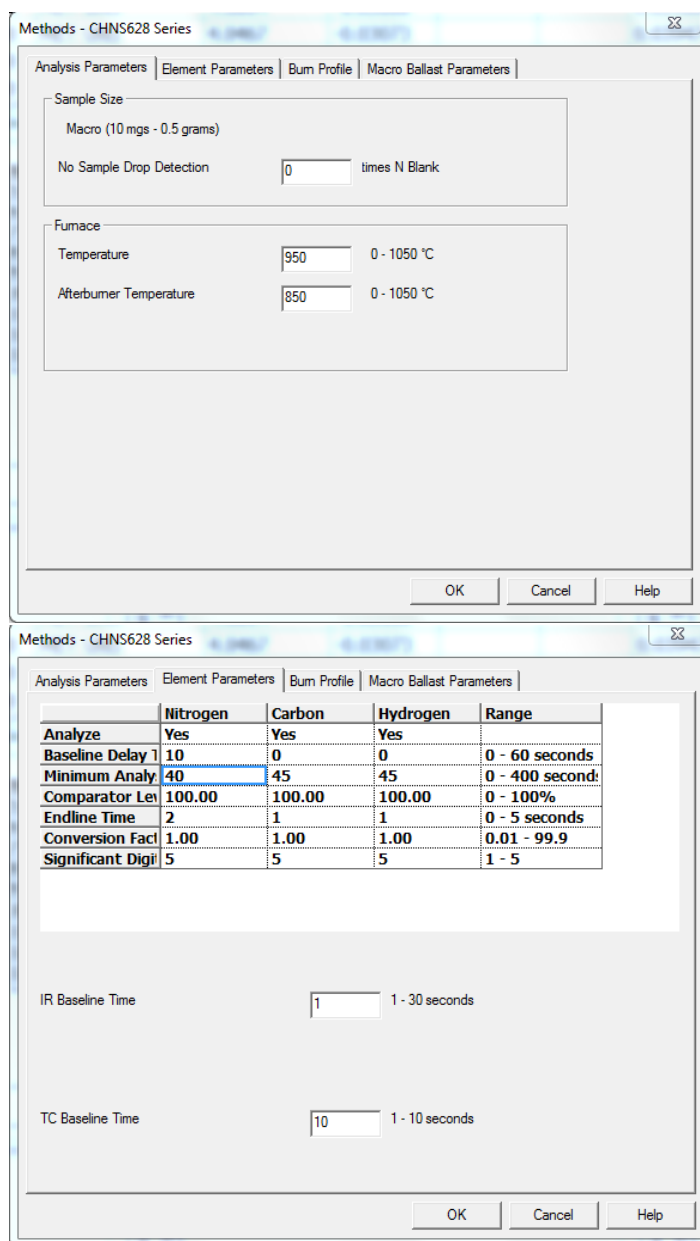


**Figura 31.** Temperatura de combustión a 900°C y Tiempo de Integración de 50 segundos.

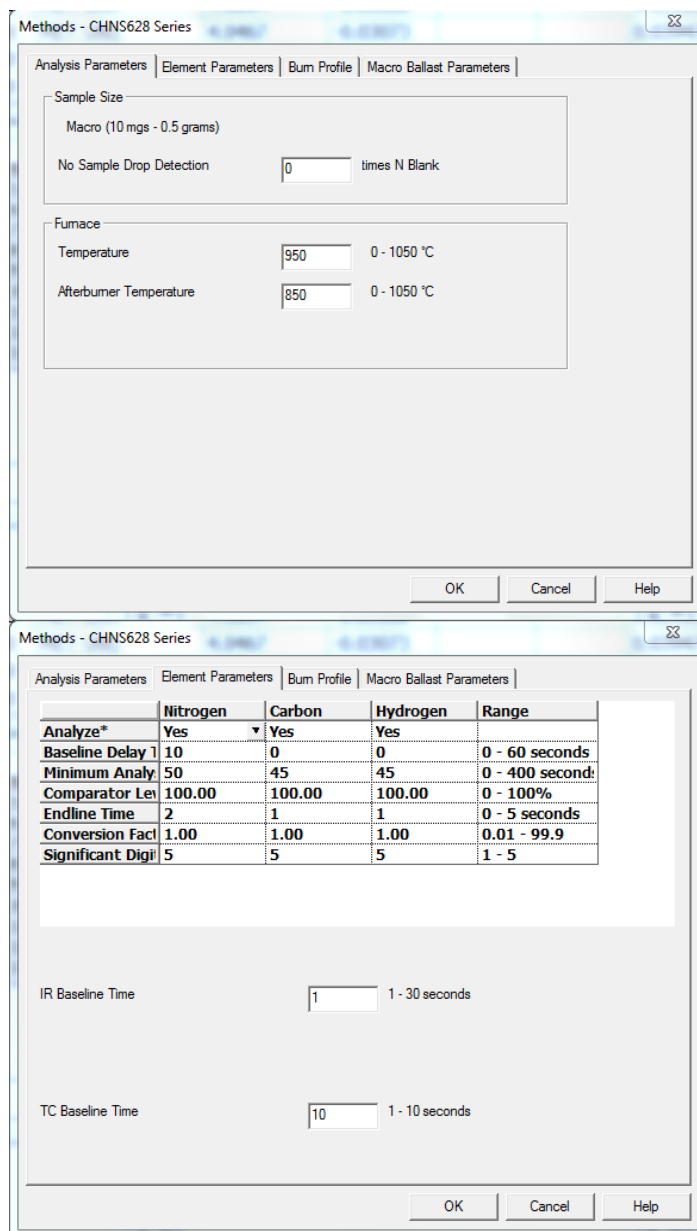




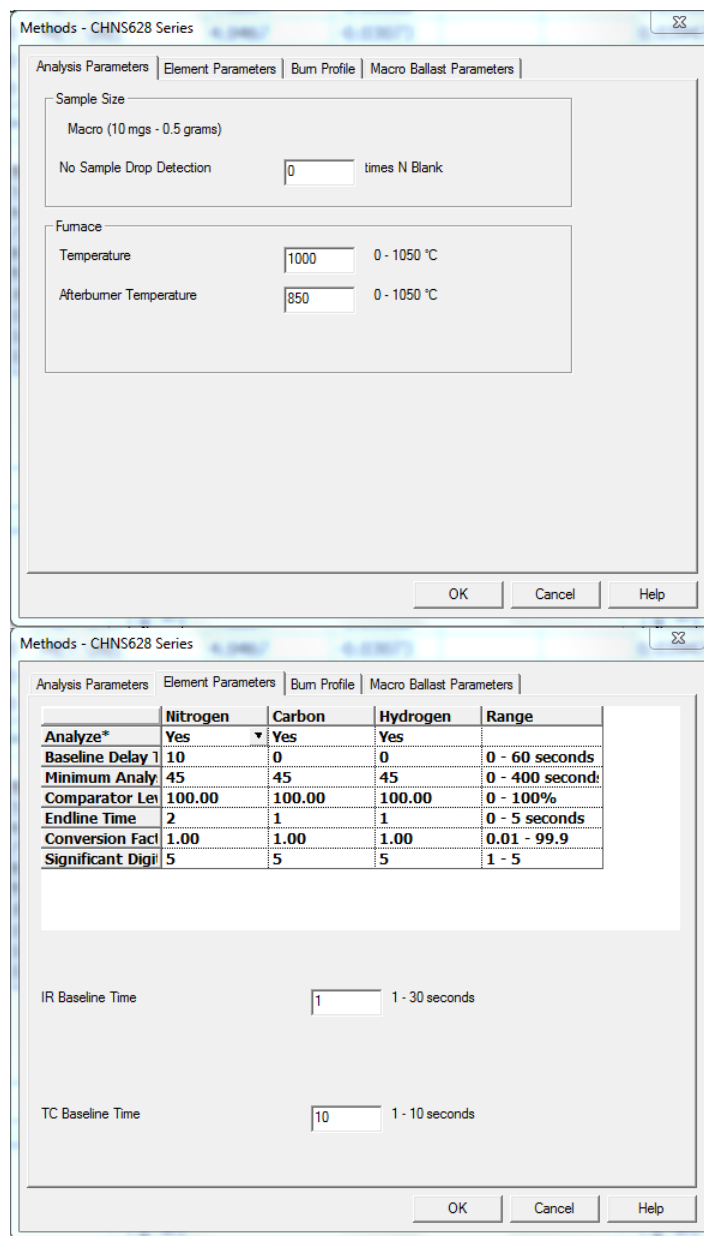
**Figura 32.** Temperatura de combustión a 950°C y Tiempo de Integración de 45 segundos.



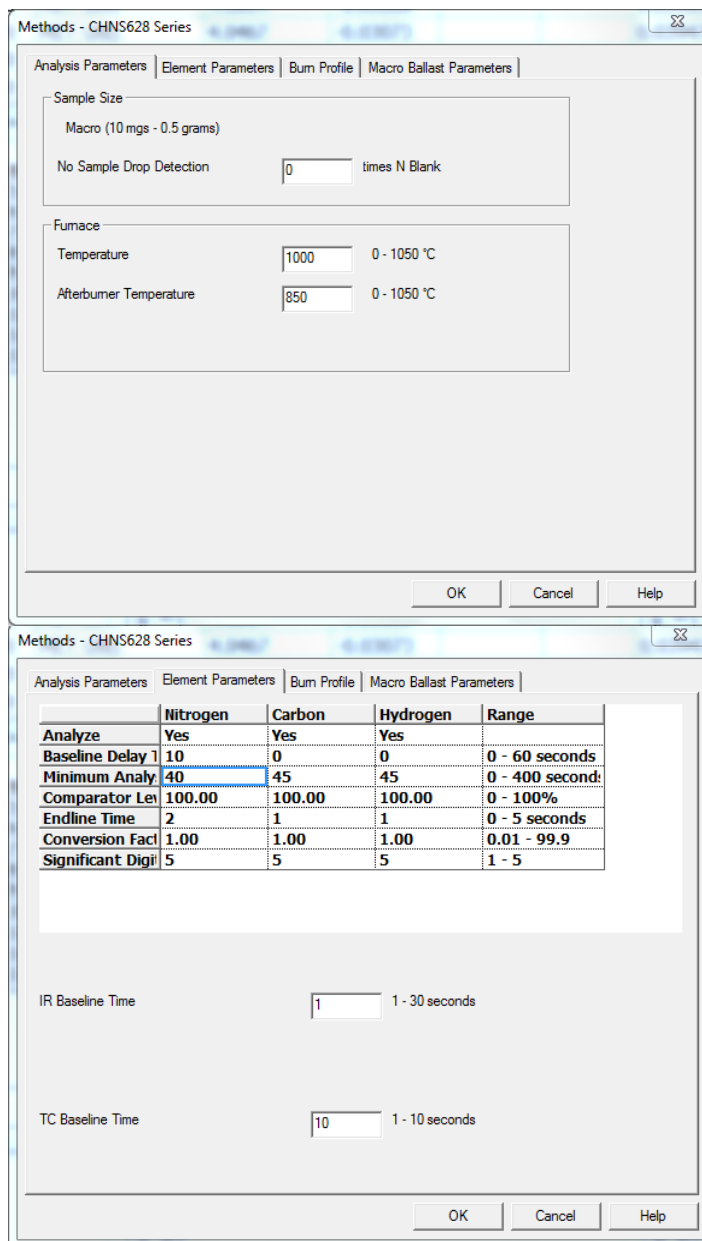
**Figura 33.** Temperatura de combustión a 950°C y Tiempo de Integración de 40 segundos.



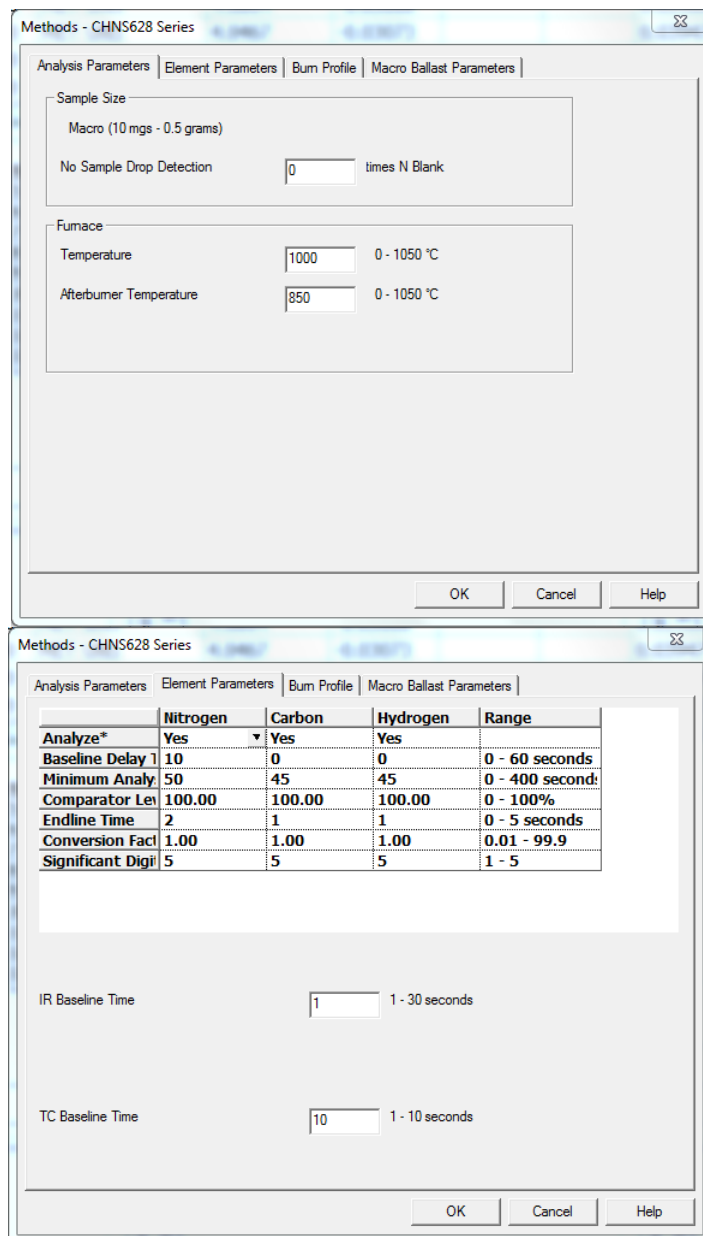
**Figura 34.** Temperatura de combustión a 950°C y Tiempo de Integración de 50 segundos.



**Figura 35.** Temperatura de combustión a 1000°C y Tiempo de Integración de 45 segundos.



**Figura 36.** Temperatura de combustión a 1000°C y Tiempo de Integración de 40 segundos.



**Figura 37.** Temperatura de combustión a 1000°C y Tiempo de Integración de 50 segundos.