

PROYECTO FIN DE CARRERA

INGENIERÍA TÉCNICA INDUSTRIAL QUÍMICA INDUSTRIAL

Determinación de proteínas en productos alimenticios con contenidos proteicos medios/altos.

Optimización de un sistema
semiautomático de digestión-destilación
basado en el método Kjeldahl

Guillermo Ortega Alonso
Septiembre 2013

Director: Dr. Jesús Vela Rodrigo

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. PROTEÍNA Y MUESTRAS ALIMENTICIAS	1
1.1.1. DEFINICIÓN DE PROTEÍNA	1
1.1.2. FUNCIÓN DE LAS PROTEÍNAS	2
1.1.3. PROBLEMAS RELACIONADOS CON EL EXCESO DE PROTEÍNAS	2
1.1.4. PROBLEMAS RELACIONADOS CON LA DEFICIENCIA DE PROTEÍNAS	3
1.1.5. PROTEÍNAS EN LEGUMBRES (GARBANZOS)	3
1.1.6. PROTEÍNAS EN LECHE EN POLVO DESNATADA (LÁCTEOS)	4
1.2. MÉTODO DE ANÁLISIS	5
1.2.1. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE PROTEÍNAS	5
1.2.1.1. Método Kjeldahl	5
1.2.1.2. Otros	6
2. OBJETIVOS	8
3. EXPERIMENTAL	9
3.1. DESCRIPCIÓN DEL EQUIPO	9
3.2. MATERIAL UTILIZADO	10
3.3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	12
4. RESULTADOS	14
4.1. OPTIMIZACIÓN INSTRUMENTAL	14
4.1.1. OPTIMIZACIÓN DEL VOLUMEN DE ÁCIDO SULFÚRICO	14
4.1.2. OPTIMIZACIÓN DE LA CANTIDAD DE CATALIZADOR	15
4.1.3. OPTIMIZACIÓN DEL TIEMPO DE DIGESTIÓN	15
4.1.4. OPTIMIZACIÓN DE LA TEMPERATURA DE DIGESTIÓN	16
4.1.5. ENSAYOS DE REPETIBILIDAD	16
4.1.6. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN REAL DEL ÁCIDO CLORHÍDRICO VALORANTE	16
4.1.7. CALIBRACIÓN DEL EQUIPO DE DESTILACIÓN	18
4.2. LEGUMBRE. GARBANZO	19
4.2.1. CONSIDERACIONES PREVIAS	19
4.2.2. OPTIMIZACIÓN DEL VOLUMEN DE ÁCIDO SULFÚRICO	21
4.2.3. OPTIMIZACIÓN DE LA CANTIDAD DE CATALIZADOR	21
4.2.4. OPTIMIZACIÓN DEL TIEMPO DE DIGESTIÓN	22
4.2.5. OPTIMIZACIÓN DE LA TEMPERATURA DE DIGESTIÓN	24
4.2.6. ENSAYOS DE REPETIBILIDAD	27
4.3. LÁCTEO. LECHE EN POLVO DESNATADA	27
4.3.1. CONSIDERACIONES PREVIAS	27
4.3.2. OPTIMIZACIÓN DEL VOLUMEN DE ÁCIDO SULFÚRICO	28
4.3.3. OPTIMIZACIÓN DE LA CANTIDAD DE CATALIZADOR	28
4.3.4. OPTIMIZACIÓN DEL TIEMPO DE DIGESTIÓN	29
4.3.5. OPTIMIZACIÓN DE LA TEMPERATURA DE DIGESTIÓN	30
4.3.6. ENSAYOS DE REPETIBILIDAD	31

5. CONCLUSIONES	<u>32</u>
5.1. PARÁMETROS ÓPTIMOS	32
5.1.1. GARBANZOS	32
5.1.2. LECHE EN POLVO DESNATADA	32
5.2. RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS	32
5.3. RESULTADOS DE LA REPETIBILIDAD	33
6. BIBLIOGRAFÍA	<u>34</u>
7. ANEXOS	<u>36</u>
7.1. LISTA DE TABLAS Y FIGURAS	36
7.1.1. LISTA DE TABLAS	36
7.1.2. LISTA DE FIGURAS	37

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Proteína y muestras alimenticias

1.1.1. Definición de proteína

Las proteínas son macronutrientes esenciales para los seres vivos, se definen como macromoléculas constituidas por cadenas de aminoácidos que están unidas por enlaces peptídicos¹ (1).

Los aminoácidos son moléculas orgánicas con un grupo amino, un grupo carboxilo y un radical. Son las unidades básicas que forman las proteínas y existen veinte aminoácidos distintos caracterizados por su radical (2).

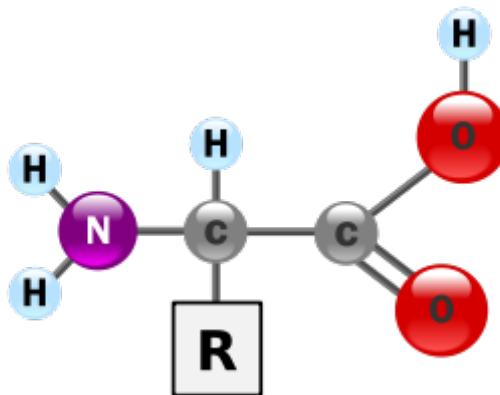


Figura 1. Estructura general de un aminoácido.

Están formadas básicamente por carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno, aunque pueden contener otros elementos.

La unión de un bajo número de aminoácidos por enlaces peptídicos; hasta diez aminoácidos; se conoce como oligopéptido, si es mayor de diez se llama polipéptido, y si el número de aminoácidos es superior a cincuenta se conoce como proteína (2).

Existen diferentes tipos de proteínas con distintas funciones, lo que diferencia a las proteínas es la disposición de los aminoácidos y los tipos de aminoácidos que la forman.

Se distinguen cuatro niveles de estructuración de las proteínas: estructura primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria (2).

¹ Enlaces que se establecen por la reacción química entre el grupo amino $-NH_2$ de uno de los aminoácidos y el grupo carboxilo $-COOH$ del otro (3).

1.1.2. Función de las proteínas

Las proteínas dirigen la mayoría de los procesos vitales, los tipos de funciones que cumplen dependen del tipo de proteína. Todas las proteínas desarrollan sus funciones por unión selectiva a moléculas.

Las funciones principales de las proteínas son las siguientes (2):

- Estructural: las proteínas contribuyen a formar el soporte físico que aporta elasticidad y resistencia a órganos y tejidos.
- Enzimática: la función enzimática de las proteínas es actuar como catalizadores acelerando las reacciones químicas del metabolismo. En su función como enzimas, las proteínas interaccionan específicamente con diferentes moléculas.
- Hormonal: algunas proteínas desempeñan funciones hormonales: regulan los niveles de glucosa en la sangre, otras están relacionadas con el crecimiento de los tejidos y músculos, y también hay proteínas que tienen funciones en el mantenimiento y reparación del sistema inmunológico.
- Defensiva: las proteínas crean anticuerpos y regulan factores contra agentes extraños o infecciones.
- Transporte: también tienen funciones de transporte, transportan oxígeno y lípidos en la sangre.
- Reserva: la función de reserva la cumplen en forma de reserva energética, las proteínas son macronutrientes que contienen hasta cuatro kilocalorías por gramo.
- Reguladoras: algunas proteínas como sirven para regular la división celular y otras regulan la expresión de ciertos genes.
- Contracción muscular: la contracción de los músculos es una función de las proteínas contráctiles que facilitan el movimiento de las células que constituyen las fibras musculares, que son responsables de la contracción de los músculos.
- Función homeostática: las proteínas funcionan como amortiguadores, manteniendo en diversos medios tanto el pH interno como el equilibrio osmótico.

1.1.3. *Problemas relacionados con el exceso de proteínas*

El consumo de proteínas es necesario para el organismo, pero el consumo excesivo de las mismas produce diversos perjuicios.

Produce un incremento en la excreción de ácidos, que aumenta la excreción de calcio en la orina lo que puede conllevar problemas como el retardo del

crecimiento en niños, la disminución de masa ósea y muscular en adultos y la formación de cálculos renales (4).

También hay que tener en cuenta que dado que no existen reservas de proteínas en el organismo, los aminoácidos en exceso se transformarán en energía o en ácidos grasos, una dieta hiperproteíca aumenta las calorías ingeridas lo que puede conllevar al sobrepeso (5).

1.1.4. Problemas relacionados con la deficiencia de proteínas

Cuando la ingestión de proteínas es baja también existen efectos nocivos para la salud, al comenzar el ciclo de alimentación hipoproteíca disminuye la eliminación de nitrógeno urinario para compensar la deficiencia de proteínas. Pero llegado cierto punto el cuerpo ya no puede adaptarse y se presenta deficiencia de proteínas con edema, desgaste de tejidos corporales, hígado adiposo, dermatosis, disminución de las respuestas inmunológicas, debilidad y pérdida de vigor.

Los trastornos asociados a la carencia de proteínas en la nutrición son: el marasmo, en el cual la deficiencia es principalmente de alimentos energéticos; kwashiorkor, que se caracteriza por la carencia de proteínas; y el kwashiorkor marásrico, en el que existe una deficiencia de proteínas y energía.

El marasmo es un trastorno crónico de semi-inanimación y afecta principalmente a niños.

El kwashiorkor origina hipoalbuminemia, edema con fóvea e hígado adiposo crecido y suelen padecerlo sobre todo lactantes y niños pequeños.

El kwashiorkor marásrico combina los síntomas de ambos trastornos (6).

1.1.5. Proteínas en legumbres (garbanzos)

Las legumbres son los alimentos de origen vegetal que albergan mayor cantidad de proteínas, con un 22% de contenido en proteínas promedio.

Las proteínas de las legumbres son básicamente de tres tipos:

- Globulinas (60-70%).
- Albúminas (20-25%).
- Glutenina y prolamina (10%).

Pese al alto porcentaje de proteínas, el valor biológico² de estas no es tan elevado como las proteínas de origen animal, esto se debe a la cantidad de cada tipo de aminoácido que contienen y a la estructura que forman principalmente.

Cocinar las legumbres y combinarlas con otros alimentos (como los cereales) aumenta el valor biológico de sus proteínas (8).

² El valor biológico es la medida de la absorción y síntesis en el cuerpo de las proteínas procedentes de la ingesta de alimentos (7).

Alimento	Valor biológico
Huevos	100
Leche de vaca	91
Clara de huevo	88
Carne (músculo)	84
Pescado	83
Soja	78
Arroz	72
Maíz	57
Legumbres	40-50
Garbanzo	52-78
Lenteja	32-58
Judía común	62-68
Guisante seco	48
Soja	64-80

Figura 2. Tabla de valores biológicos de algunos alimentos comunes.

En los garbanzos el contenido de proteínas es ligeramente inferior al promedio de las legumbres, entre 17-22% dependiendo de la variedad del garbanzo.

En general, los garbanzos son pobres en aminoácidos ricos en azufre por lo que es recomendable consumirlos con alimentos que contengan abundantemente esos aminoácidos (como los cereales ya mencionados) (9).

1.1.6. Proteínas en leche en polvo desnatada (lácteos)

La concentración de proteína en la leche varía entre 3-4% dependiendo de la raza de la vaca y la cantidad de la grasa en la leche, cuanto más grasa es una leche, mayor es la cantidad de proteína.

Esto último sin tener en cuenta los procesos de desnatado, una leche con una concentración determinada de proteínas que es descremada, aumentará su concentración de proteínas al disminuir su masa por perder materia grasa, este hecho es especialmente relevante para la leche en polvo (deshidratada).

Las proteínas de la leche de vaca se clasifican en dos grandes grupos (10):

- Caseínas (80%)
- Séricas (20%)

Las proteínas de la leche de vaca son de origen animal con un alto valor biológico.

La leche en polvo desnatada es leche de vaca que ha sido desnatada y deshidratada, por lo tanto sus componentes se encuentran en gran concentración.

El contenido de proteínas en la leche en polvo desnatada es muy alto, entre 34-36% dependiendo de los mismos factores que la leche de vaca.

1.2. Método de análisis

1.2.1. Métodos de análisis de proteínas

1.2.1.1. *Método Kjeldahl*

Es un método analítico para determinar el contenido de nitrógeno de una compuesto orgánico, recibe su nombre en honor al químico danés Johan Kjeldahl que lo desarrollo (11).

Consiste en tres etapas: digestión, destilación y valoración.

La digestión se realiza con una combustión de la muestra con ácido sulfúrico y catalizador a altas temperaturas. Durante este proceso el nitrógeno se convierte en ión amonio.

En la destilación se añade hidróxido de sodio a la muestra para alcanzar un pH básico, y así convertir el ión amonio en amoniaco, después se arrastra el amoniaco con vapor de agua a una disolución ácida de ácido bórico, que se recogerá en forma de ión amonio.

Durante la valoración se valora el ión amonio recogido con ácido, lo que indica la cantidad de nitrógeno contenido en la muestra original.

Una vez conocido el contenido de nitrógeno de la muestra, se relaciona con el contenido de proteínas a través de un factor de corrección que varía con el tipo de alimento, y depende de la naturaleza de las proteínas que lo componen.

Los principales inconvenientes de este método son: la indistinción de nitrógeno no orgánico y orgánico (12), el tiempo requerido (la digestión es un proceso prolongado), los problemas que se puedan occasionar por una espumosidad excesiva y la acción corrosiva del ácido sulfúrico sobre el sistema de extracción de humos así como la contaminación producida por la descarga de estos humos (13).

1.2.1.2. Otros

Los métodos más relevantes en la determinación de proteínas son los métodos de Biuret, Lowry, Bradford, BCA y Dumas:

- **Método de Biuret:** es una colorimetría: consiste en formar un complejo coloreado y medir la intensidad de la coloración.
El complejo coloreado se forma entre el Cu^{2+} y los grupos NH de los enlaces peptídicos en medio básico. Cada átomo de Cu^{2+} se acompleja con 4 NH.
La intensidad de coloración es proporcional a la concentración de enlaces peptídicos, y por ende a las proteínas.
La reacción es bastante específica, pocas sustancias interfieren; mientras que la sensibilidad del método es muy baja y sólo se recomienda para la cuantificación de proteínas en muestras con concentraciones altas de proteínas (14).
- **Método de Lowry:** es una mejora al método de Biuret.
Análogamente al método anterior, primero se forma un complejo con el Cu^{2+} y los grupos NH en medio básico.
Después se reduce el complejo con el reactivo de Folin-Ciocalteau (una mezcla de fosfomolibdato y fosfotungstato) para fenoles, entonces se forma un complejo de color azul oscuro y se analiza por colorimetría.
La intensidad de coloración es proporcional a la concentración de enlaces peptídicos, y por ende a las proteínas.
El método de Lowry es muy sensible, no obstante tiene por desventaja que la coloración depende del tipo de proteína que contenga la muestra, esto se corrige con una curva de calibrado con patrones adecuados (15).
- **Método de Bradford:** como el método Biuret, se trata de un método colorimétrico, la principal diferencia es que se utiliza un colorante diferente y se utiliza medio ácido.
El colorante que se utiliza se llama azul brillante G-250 Coomassie, este colorante existe en dos formas una azul y otra naranja.
Las proteínas se unen mayoritariamente a la forma azul para formar un complejo.
Este método es específico aunque existen sustancias interferentes como los detergentes y soluciones básicas, tiene bastante sensibilidad (1-15 µg), y se trata de un procedimiento simple, rápido y barato (14).

- **Método de BCA:** es un método también basado en la colorimetría, se añaden iones de cobre que son reducidos a Cu²⁺ por las proteínas en medio alcalino.

Después se agrega el BCA (ácido bicinconílico) de color verdoso que se compleja con los iones Cu²⁺ de color azul, para formar un complejo de color morado.

La estabilidad del reactivo y el cromóforo dotan al método de mucha sensibilidad, además se trata de un método sencillo y específico (14).

- **Método de Dumas:** consiste en realizar una pirólisis completa de la muestra y medir la concentración de nitrógeno en los gases de combustión. Después se relaciona el contenido en nitrógeno con el contenido en proteínas mediante el uso de un factor de corrección.

El nitrógeno puede ser medido con manómetro después de absorber el dióxido de carbono en una solución alcalina o por conductividad térmica en métodos automatizados.

El método Dumas es el más similar al método Kjeldahl, ambos utilizan reacciones de combustión.

También tiene sus desventajas, este método no distingue entre nitrógeno orgánico u inorgánico, requiere pequeñas cantidades de muestra 5-50 mg, finamente dividida y homogénea para minimizar el error de muestreo, además la muestra tiene que estar desecada (13).

Los métodos descritos han sido los más ampliamente usados, pero todos ellos son relativamente antiguos, en la actualidad existen métodos muy diversos, entre ellos métodos ópticos no destructivos como por ejemplo:

- **Espectroscopia infrarroja:** se aprovecha la absorción del grupo amida del enlace peptídico a 6,46 Tm.

Es un método rápido, no destructivo y analiza múltiples componentes. Sin embargo es interferido por agua y tiene un proceso de calibración complejo (13).

- **Espectroscopia infrarroja reflectante:** la muestra se ilumina con seis longitudes de onda cercanas a la radiación infrarroja (0,75-2,5 Tm) y se detecta la luz reflejada.

Como el método anterior, se trata de un proceso rápido, de análisis de múltiples componentes, aplicable a materiales sólidos y no presenta interferencias en presencia de agua.

Sus desventajas son la interferencia de almidones y lípidos, que existe desplazamiento del espectro de reflectancia por humedad contenida en las partículas y el requerimiento de un proceso de calibración complejo (13).

- **Espectrofotometría ultravioleta:** mide las proteínas en disolución con absorción máxima a 280nm atribuible a los anillos aromáticos de tirosina y triptófano y entre 180-220nm. También es un método rápido y no destructivo, útil para monitorizar eluyentes en columnas cromatográficas. Pero existe interferencia de algunos compuestos (ácidos nucleicos, nucleótidos) (13).

2. OBJETIVOS

El objetivo genérico de este proyecto fin de carrera es la determinación cuantitativa de la concentración de proteína en productos alimentarios (legumbre -garbanzos- y en leche en polvo desnatada) de alto contenido proteico.

Para ello se llevará a cabo una optimización de los parámetros de digestión en un sistema semiautomático de digestión-destilación basado en el método Kjeldahl, para después proceder a la determinación cuantitativa del contenido proteico de ambos tipos de muestra, así como estudiar la repetibilidad del método.

3. EXPERIMENTAL

3.1. Descripción del equipo

Para el método analítico con el que se realizarán los experimentos se utilizarán dos instrumentos, uno para el proceso de digestión y otro para el de destilación.

- **Digestor:** en la etapa de digestión se empleará un bloque digestor de la marca "P Selecta" y modelo "R.A.T Bloc Digest 6".

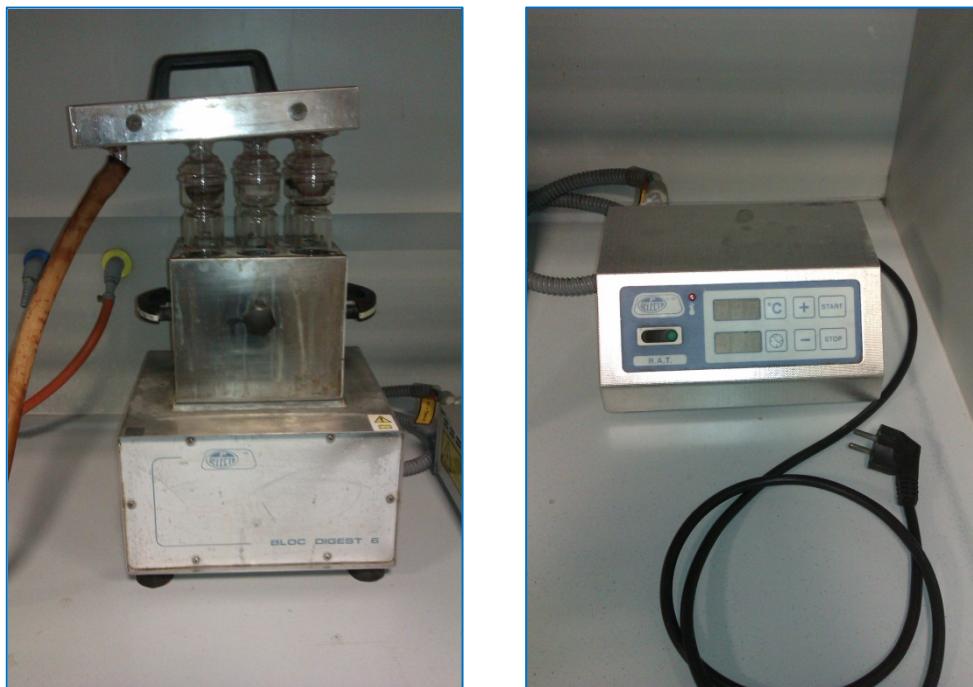


Figura 3. Fotografías del bloque digestor en el laboratorio. Bloque digestor con seis tubos y trompa de agua (izquierda) y calentador con controlador digital (derecha).

El instrumento consiste en un bloque digestor para seis tubos cuya temperatura y tiempo de operación se pueden regular mediante un controlador digital, además incluye un extractor de gases que se acopla a la parte superior de los tubos y que está conectado a una trompa de agua que permite succionar los gases procedentes de la digestión.

- **Destilador:** para el proceso de destilación el instrumento que se utilizará será de la marca “Büchi”, modelo “K-314”.



Figura 4. Fotografía del destilador en el laboratorio.

Este destilador es apto en destilaciones para análisis de nitrógeno por los métodos de Kjeldahl y Devarda³, así como para otras destilaciones de vapor de agua (16).

En la parte izquierda del destilador se acopla el tubo donde se digirió la muestra, se establece un medio básico y se destila con vapor de agua. En la parte de la derecha se recoge el amoniaco destilado en forma de ión amonio en un medio ácido.

3.2. Material utilizado

3.2.1. Material

- Material volumétrico de laboratorio.
- Tubos digestores de vidrio, VidaFroc.

³ El método de Devarda consiste en mezclar una disolución de iones nitrato con una disolución acuosa de hidróxido de sodio, entonces se añade la aleación de Devarda y se calienta la mezcla, en el proceso se libera amoniaco, después se puede proceder a la destilación y valoración como procede en el método Kjeldahl (17).

3.2.2. Reactivos

- Ácido sulfúrico 95-97%, Scharlau.
- Ácido bórico en cristales, Probus.
- Ácido clorhídrico 37%, Scharlau.
- Hidróxido de sodio, Prolabo.
- Sulfato de amonio, Probus.
- Catalizador Kjeldahl Cu-Se (1,5% CuSO₄•5H₂O), Panreac
- Fenolftaleína, Merck's Indikatoren.
- Rojo de metileno, Fluka AG Buchs.
- Azul de metileno, Fluka AG Buchs.
- Carbonato de sodio, Scharlau.
- Agua desionizada.

3.2.3. Muestras analizadas:

- Garbanzos "Categoría extra" 20,0% contenido proteico "Hacendado".
- Leche en polvo desnatada "Sveltesse" 35,2% contenido proteico, "Nestlé".

3.2.4. Reactivos preparados en el laboratorio:

- Ácido bórico 4%.
- Ácido clorhídrico 0,1N.
- Hidróxido de sodio 40%.
- Fenolftaleína 1% en etanol.
- Indicador mixto en etanol.

Ácido bórico 4%: 4g de H₃BO₃ por cada 100ml de agua: para la preparación de 1 litro de disolución, se añade con la espátula 40g de H₃BO₃ en cristales, Probus; en un vidrio de reloj. Se traspasa cuantitativamente a un vaso de precipitado de 1 litro, se arrastra desde el vidrio de reloj los cristales que puedan quedar con agua destilada, se añade un volumen de agua menor que 1 litro, se introduce un núcleo magnético y se remueve la disolución en un agitador. Una vez se ha disuelto por completo el H₃BO₃, se enrasa a 1 litro.

El ácido bórico se utiliza en la etapa de destilación en exceso para recoger el destilado por lo que no es necesario el uso de material aforado.

Ácido clorhídrico 0,1N: 0,1 moles de HCl por cada litro de agua: la preparación del ácido clorhídrico se llevará a cabo para botellas de 1 y 2 litros. Se dispone de ácido clorhídrico al 37% cuya densidad es de 1,184g por cada mililitro y se conoce que el peso molar del HCl molar es de 36,46g por cada mol:

$$36.46 \frac{g}{mol} \times 0,1 mol = 3,646 g$$

Se necesitan 3,646 gramos de cloruro de hidrógeno por cada litro de disolución:

$$\frac{3,646 \text{ g}}{1,184 \frac{\text{g}}{\text{ml}}} \div 37\% = 8,323 \text{ ml}$$

Se pipetean 8,3 ml de HCl, Scharlau; se vierten en un matraz aforado de 1 litro y se enrasa con agua destilada.

Para la preparación de 2 litros de disolución 0,1N; se toma el doble de volumen de HCl comercial y se vierten en un matraz aforado de 2 litros.

Hidróxido de sodio 40%: 40g de NaOH en 100ml de agua: para la preparación 1 litro de disolución, se toman con la espátula aproximadamente 400g de NaOH, Prolabo; se vierten en un vaso de precipitado de 1 litro, se añade un volumen de agua inferior a 1 litro y un núcleo magnético, se calienta a unos 70°C y se remueve automáticamente en el agitador con un vidrio de reloj en la parte superior como reflujo, se mantiene hasta que las perlas están totalmente disueltas, y se enrasa a 1 litro.

El hidróxido de sodio se utiliza en la etapa de destilación en exceso para alcanzar un medio básico antes de destilar con vapor de agua por lo que no es necesario el uso de material aforado.

Indicador de fenolftaleína 1% en etanol: 1ml de fenolftaleína en 100ml de agua: para preparar 100 ml de disolución indicadora se toma con pipeta 1ml de fenolftaleína, Merck's Indikatoren; y se añade a un matraz aforado de 100ml, luego se enrasa con agua destilada y se agita.

Indicador mixto en etanol: 0,2g de rojo de metíleno y 0,1g de azul de metíleno en 100 ml de agua destilada: para la preparación de 100 ml de indicador mixto se toman con la espátula 0,2g de rojo de metíleno, Fluka AG Buchs; en un vidrio de reloj y 0,1g de azul de metíleno, Fluka AG Buchs en otro vidrio de reloj. Se traspasa cuantitativamente a un matraz aforado de 100 ml, se arrastra ambos vidrios de reloj con agua destilada y se enrasa el matraz aforado hasta los 100ml.

3.3. Procedimiento experimental

A continuación se detalla el procedimiento seguido en la experimentación:

Primero se programa el calentador a 125°C, el proceso de digestión se produce desde una rampa de calor hasta la temperatura objetivo y sólo una vez se ha alcanzado esa temperatura comienza la medición del tiempo hasta alcanzar el valor programado del mismo, una vez se cumple el tiempo programado la digestión ha concluido. Por lo que configurar la temperatura al inicio de la sesión a 125°C nos da siempre la misma temperatura inicial al comienzo de la digestión a la vez que acorta la duración de la rampa de temperatura, a temperaturas inferiores la digestión será siempre incompleta por lo que ese tramo de temperatura es irrelevante al estudio.

Después se ha de preparar la muestra, eso se hace desecándola durante dos días o más introduciéndola en un pesa-sustancias que a la vez se coloca en un desecador con gel de sílice.

A continuación utilizando una balanza analítica se toma con una espátula la cantidad de muestra necesaria (1g para las muestras de garbanzos y 0,55g para las muestras de leche en polvo desnatada, ambos valores aproximados) sobre un vidrio de reloj y se trasvaza cuantitativamente a un tubo digestor.

El bloque digestor dispone seis posiciones distribuidas en dos filas paralelas para tres tubos cada una de ellas, por lo que se repite la toma de la muestra hasta cuatro veces, y también se añaden dos blancos cuya única diferencia es que contienen 5ml de agua en vez de muestra.

Las muestras se colocan en las posiciones exteriores de la fila y los blancos en las dos posiciones intermedias de la misma. Se ha tomado la decisión de utilizar esta disposición en base a los resultados obtenidos en el proyecto de fin de carrera previo realizado por Estela Guallar Herrero (18).

A todos los tubos se les añade ácido sulfúrico y tabletas de catalizador cuyo volumen y número (respectivamente) dependen del experimento.

También se agrega una pieza de porcelana en cada tubo para que actúe como núcleo de la reacción.

Después se coloca la tapa de los tubos digestores que extraerá los gases mediante la trompa de agua, se abre esta trompa y se configura el controlador digital del calentador para los valores de tiempo y temperatura que dependerán de nuevo del experimento.

Una vez ha terminado la digestión, se apaga y desconecta el calentador, se saca la gradilla que contiene los seis tubos del bloque digestor y se deja enfriar al aire.

Cuando los tubos están a una temperatura suficientemente baja para ser manipulados con las manos se retira la tapa extractora de gases y se cierra la trompa de agua.

A continuación se pasa a destilar el contenido de cada uno de los tubos, primero se destilarán los dos blancos y después las muestras.

La destilación procede como se detalla:

Primero se enciende el destilador y se abre la trompa de agua que sale desde el aparato, después se levanta la palanca de seguridad que sujetá los tubos digestores (en la parte de la izquierda), se le añaden dos gotas de indicador de fenolftaleína 1% en etanol a dicho tubo, se coloca el mismo y se baja la palanca.

En la parte donde se recoge el destilado (derecha) se coloca un Erlenmeyer que contiene 25ml de ácido bórico 4% disuelto en agua desionizada y tres gotas de indicador mixto en etanol, se añade suficiente agua para que la boquilla del tubo por donde sale el destilado quede sumergida en la disolución (enrasando a 100ml es suficiente).

A continuación se añade hidróxido de sodio 40% al tubo digestor mediante el control automático en pequeñas ráfagas para controlar la violencia de la reacción (puede causar fugas de gas) hasta que la disolución cambia de

color (indica que el medio ha cambiado de ácido a básico), 80ml de hidróxido de sodio suele ser más que suficiente.

Una vez el tubo digestor está en medio básico se abre la corriente de vapor de agua para que arrastre y destile el amoniaco (la llave se tiene que abrir hasta la mitad o podría borbotear demasiado la disolución a destilar y contaminar el destilado). Se destila la disolución hasta que el contenido del Erlenmeyer torna de morado a verde, si bien es conveniente destilar hasta un volumen de 200ml (es un valor en exceso pero utilizarlo asegura no dejar amoníaco el tubo digestor ni en el aparato destilador como se ha visto en ciertos experimentos).

Una vez la destilación ha concluido se retira el Erlenmeyer y se valora con ácido clorhídrico de normalidad exacta conocida mediante una bureta de 25ml previamente homogeneizada.

Con los datos obtenidos de la valoración se procede a calcular el contenido porcentual de proteína en la muestra analizada.

Además de este procedimiento, se requieren experimentos de determinación de la normalidad del ácido clorhídrico valorante y de calibración del equipo de destilación que son detallados en apartados posteriores.

4. RESULTADOS

4.1. Optimización instrumental

Los parámetros que se estudiarán en el proyecto serán las principales variables del proceso de digestión: temperatura de digestión, tiempo de digestión, ácido sulfúrico añadido, número de tabletas agregadas.

También se realizarán experimentos de repetibilidad para comprobar la consistencia del procedimiento y para comprobar la existencia de errores no aleatorios.

Además, se valorarán las disoluciones de ácido clorhídrico 0,1N que se utilizarán en las valoraciones de las muestras y periódicamente se realizarán experimentos de calibración del equipo de destilación.

En este apartado se describirán los ensayos de optimización a realizar con las muestras de garbanzos y de leche en polvo desnatada.

4.1.1. Optimización del volumen de ácido sulfúrico

El ácido sulfúrico que se agrega en cada tubo tiene por objeto digerir la muestra junto al catalizador por lo que es una variable importante.

Una cantidad demasiado pequeña de ácido sulfúrico conllevará a un proceso de digestión incompleto, y parte del nitrógeno de las proteínas no se convertirá a amonio por lo que la valoración y los cálculos posteriores mostrarán una concentración de nitrógeno menor de la real contenida en la muestra.

Asimismo, una adición excesiva de ácido sulfúrico aumentará el ácido sulfúrico en exceso tras la digestión y, en consecuencia, se necesitará un mayor volumen de hidróxido de sodio al 40% para que el medio pase de ácido a básico, necesario para la destilación del amoniaco. Esa adición es un proceso muy exotérmico que genera altas temperaturas en el tubo de digestión y sería posible pensar en una pérdida de nitrógeno de la muestra por una destilación temprana del amoniaco. En cualquier caso, volúmenes de ácido sulfúrico generan problemas de manipulación y procedimiento.

Con el objetivo de elegir un valor óptimo se realizaron experimentos con diferentes volúmenes de ácido sulfúrico: 5ml, 10ml, 15ml y 20ml.

4.1.2. Optimización de la cantidad de catalizador

Otro de los parámetros que se optimizarán en el proceso de digestión es la cantidad de catalizador que se añaden en cada tubo.

Si bien teóricamente un exceso de catalizador no debería influir en el resultado final del análisis, un déficit de éste si podría tener consecuencias debido a la propia definición de catalizador (sustancia que, sin participar en una reacción química determinada, modifica la cinética de la misma)

En muestras de contenido proteico relativamente bajo, se ha comprobado (18) que una tableta de catalizador es más que suficiente. Sin embargo, dado que en este proyecto las concentraciones de proteína de las muestras a analizar son mayores, se ha decidido incluir este ensayo para dilucidar si una tableta es, o no, suficiente para obtener resultados exactos y precisos.

4.1.3. Optimización del tiempo de digestión

El proceso de digestión es la etapa más lenta del método analítico empleado, por lo que optimizar esta variable resulta de especial interés.

Valores demasiado pequeños de tiempo de digestión podrían resultar en una conversión no completa del nitrógeno orgánico a amonio, con lo que ello implica.

Valores demasiado altos en tiempos de digestión posiblemente no influyan cuantitativamente en el resultado final, pero si en la ralentización del procedimiento de análisis hasta tiempos de análisis difícilmente aceptables en un procedimiento industrial.

Los experimentos de optimización del tiempo de digestión se han fijado entre 0 minutos (realmente el tiempo mínimo será 1 minuto puesto que es el mínimo admisible por el controlador digital del equipo digestor) hasta 75 minutos.

4.1.4. Optimización de la temperatura de digestión

La temperatura de digestión influye directamente sobre la cinética de las reacciones y es, posiblemente, la variable de la que depende de manera más importante los resultados obtenidos.

Valores demasiado bajos pueden resultar en una digestión incompleta de la muestra y, en consecuencia, resultados de concentraciones de proteína inferiores a los reales.

Valores de temperatura de digestión elevados seguramente no mejorarían apreciablemente el resultado cuantitativa pero, como poco, si complicarían el procedimiento experimental y la vida media de los tubos de digestión.

Así, se ha fijado el rango de 200 a 400°C de temperatura a estudiar.

4.1.5. Ensayos de repetibilidad

Los experimentos de repetibilidad se llevan a cabo para asegurar que los valores de los experimentos son reproducibles, consistentes y precisos; y que los errores que se produzcan son de naturaleza aleatoria.

4.1.6. Determinación de la concentración real del ácido clorhídrico valorante

El HCl utilizado en la etapa de valoración es preparado en el laboratorio por lo que no es un patrón primario, para conocer su normalidad de manera más exacta se procedió a valorar 6 muestras de masa conocida de Na_2CO_3 con cada botella de HCl 0,1N preparado en el laboratorio.

La situación ideal será que las 6 valoraciones muestren valores de desviación estándar relativa menores del 1% para que el valor medio de normalidad obtenido pueda considerarse exacto y preciso.

En estas determinaciones se pesarán 6 muestras de Na_2CO_3 (que es patrón primario), procediendo de la siguiente manera 6 veces:

Se conoce que el peso molecular del Na_2CO_3 es de 105,988 gramos por cada mol, y para mejorar la exactitud y precisión de las determinaciones se pretende utilizar un volumen de 20 ml (aproximadamente) por cada valoración, se desconoce la normalidad exacta del HCl pero es aproximadamente 0,1 N:

$$20 \text{ ml} \times 0,1 \frac{\text{eq}}{\text{l}} \times \frac{l}{1000 \text{ ml}} \times 1 \frac{\text{mol}}{\text{eq}} = 2 \times 10^{-3} \text{ mol}$$

Tienen que reaccionar 2×10^{-3} mol HCl, como la estequiométría de la reacción es 1:1:

$$2 \times 10^{-3} \text{ mol} \times 105,988 \frac{\text{g}}{\text{mol}} = 0,212 \text{ g}$$

Se tienen que pesar valores cercanos a 0,212 gramos de Na_2CO_3 .

Se toman 0,212g de Na_2CO_3 y se disuelve con agua en un Erlenmeyer y se añaden dos gotas de indicador de fenolftaleína 1% en etanol. Se agita hasta que queda completamente disuelto.

A continuación se homogeneíza (esto solo es necesario la primera vez) una bureta de 25ml y se valoran 25ml del HCl 0,1N preparado en el laboratorio.

Para la valoración de los experimentos descritos en este proyecto se utilizaron 3 botellas de HCl 0,1N preparado en el laboratorio, las dos primeras de 1 litro y la tercera de 2,5 litros:

Valoración (nº)	Masa Na_2CO_3 (g)	HCl (ml)	Normalidad HCl (eq/l)	Pm Na_2CO_3 (g/mol)
1	0,2243	22,40	0,09448	105,988
2	0,2248	22,30	0,09511	RSD (%)
3	0,2067	20,05	0,09727	1,36
4	0,2153	21,15	0,09605	N media HCl (eq/l)
5	0,2203	21,95	0,09469	
6	0,2263	21,90	0,09750	0,09585

Tabla 1. Resultados del experimento número 1 de la determinación de la concentración real de ácido clorhídrico valorante. Botella de 1 litro.

Valoración (nº)	Masa Na_2CO_3 (g)	HCl (ml)	Normalidad HCl (eq/l)	Pm Na_2CO_3 (g/mol)
1	0,2221	21,20	0,09885	105,988
2	0,2114	20,20	0,09874	RSD (%)
3	0,2132	20,20	0,09958	0,36
4	0,2180	20,80	0,09889	N media HCl (eq/l)
5	0,2159	20,65	0,09865	
6	0,2190	20,95	0,09863	0,09889

Tabla 2. Resultados del experimento número 2 de la determinación de la concentración real de ácido clorhídrico valorante. Botella de 1 litro.

Valoración (nº)	Masa Na_2CO_3 (g)	HCl (ml)	Normalidad HCl (eq/l)	Pm Na_2CO_3 (g/mol)
1	0,2103	21,05	0,09426	105,988
2	0,2188	21,80	0,09470	RSD (%)
3	0,2210	22,10	0,09435	0,26
4	0,2129	21,20	0,09475	N media HCl (eq/l)
5	0,2155	21,55	0,09435	
6	0,2095	21,00	0,09413	0,09442

Tabla 3. Resultados del experimento número 3 de la determinación de la concentración real de ácido clorhídrico valorante. Botella de 2,5 litros.

Se observa que la desviación estándar relativa porcentual de la primera botella es ligeramente superior a la deseada, mientras que las dos otras botellas presentan valores precisos.

4.1.7. Calibración del equipo de destilación

Periódicamente se realizarán experimentos para calibrar la exactitud y precisión de los resultados del equipo de destilación.

Estos experimentos consisten en añadir en un tubo digestor vacío la cantidad de sulfato de amonio de grado analítico necesaria para valorarlo con 20,0 ml de ácido clorhídrico:

$$20 \text{ ml} \times 0,1 \frac{\text{eq}}{\text{l}} \times \frac{l}{1000 \text{ ml}} \times 1 \frac{\text{mol}}{\text{eq}} = 2 \times 10^{-3} \text{ mol}$$

Tienen que reaccionar 2×10^{-3} mol HCl, como la estequiometría de la reacción es 1:2:

$$2 \times 10^{-3} \text{ mol} \div 2 \times 132,134 \frac{\text{g}}{\text{mol}} = 0,132 \text{ g}$$

Se tienen que pesar valores cercanos a 0,212 gramos de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Después se diluye en una pequeña cantidad de agua desionizada, se le añade el mismo ácido sulfúrico que a las muestras (10 ml) y se destila como si se tratase de una muestra.

Una vez destilado, se valorará y se comparará el resultado obtenido con la cantidad de sulfato de amonio añadido al tubo digestor para estudiar el porcentaje de recuperación del proceso.

Estos experimentos se realizarán de forma periódica a modo de comprobación rutinaria.

A continuación se presentan las tablas de los experimentos de calibración del equipo de destilación:

Pm $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g/mol)	Masa $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pesada (g)	HCl valorado (ml)	Normalidad HCl valorante (eq/l)	Recuperado (%)
132,134	0,1320	20,15	0,09585	96,67

Tabla 4. Resultados del experimento número 1 de la calibración del equipo de destilación.

Pm $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g/mol)	Masa $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pesada (g)	HCl valorado (ml)	Normalidad HCl valorante (eq/l)	Recuperado (%)
132,134	0,1268	18,90	0,09442	92,98

Tabla 5. Resultados del experimento número 2 de la calibración del equipo de destilación.

Pm $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g/mol)	Masa $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pesada (g)	HCl valorado (ml)	Normalidad HCl valorante (eq/l)	Recuperado (%)
132,134	0,1253	19,70	0,09442	98,08

Tabla 6. Resultados del experimento número 3 de la calibración del equipo de destilación.

Pm $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g/mol)	Masa $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pesada (g)	HCl valorado (ml)	Normalidad HCl valorante (eq/l)	Recuperado (%)
132,134	0,1320	20,85	0,09442	98,53

Tabla 7. Resultados del experimento número 4 de la calibración del equipo de destilación.

En el segundo experimento (tabla 5) se observó una pequeña fuga de gas durante el proceso de destilación.

Los resultados de los experimentos de calibración del equipo de destilación muestran valores cercanos pero siempre ligeramente inferiores a la completa recuperación mediante destilación del amonio disuelto. A la vista de estos resultados, es posible concluir que el equipo de destilación trabaja adecuadamente.

4.2. Legumbre. Garbanzo

4.2.1. Consideraciones previas

Para los cálculos de concentración de proteína para muestras de garbanzos se ha utilizado un factor que relaciona la masa del nitrógeno con la masa de la proteína en la muestra: esta relación es de 1:6,25 (por cada 1g de nitrógeno de la muestra obtenido en la valoración, corresponde a una masa de 6,25g de proteína en la muestra).

Al objeto de minimizar errores, se pretende realizar la determinación del amoniaco con el máximo volumen posible de una única bureta de 25 ml de ácido clorhídrico. Como no se conoce la normalidad real del HCl, se supondrá un HCl 0,1N y se fijarán 20 ml como un volumen óptimo:

$$\frac{20 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}} l \times 0,1 \text{ N} = 2,0 \times 10^{-3} \text{ mol}$$

Se utilizarán $2,0 \times 10^{-3}$ mol de HCl para valorar el amoniaco recogido, tienen que recogerse $2,0 \times 10^{-3}$ mol de NH_3 , es decir, la muestra tiene que contener esos mismos moles de nitrógeno orgánico, se conoce que el peso molar del nitrógeno es de 14,007g por cada mol:

$$2,0 \times 10^{-3} \text{ mol} \times 14,007 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \times 6,25 = 0,1787 \text{ g}$$

La muestra inicial debe contener 0,1787g de proteína, como la muestra tiene un contenido del 20,0% de proteína:

$$\frac{0,1787 \text{ g}}{20.0\%} = 0,8936 \text{ g}$$

Como las muestras de garbanzos se tomarán añadiendo garbanzos enteros, se utilizarán como muestra masas de 1g o menor, que es el peso aproximado de un garbanzo grande, o de dos pequeños.

Leyenda: los resultados de los experimentos se representarán en tablas como esta:

RSD (%)		Tabletas catalizador (nº)			
5,31		2	2	2	2
Muestra (nº)		1	2	3	4
Masa (g)	0,8595	1,0232	0,8596	0,9840	
HCl valorado(ml)	11,30	20,80	16,85	21,40	
Proteínas (%)	11,4	17,6	17,0	18,8	
Parámetros fijos: 400°C, 60min, 10 ml H ₂ SO ₄ ; 29/5/13					
N (HCl)=	0,09889	Proteínas (%medio)=			17,8

Tabla 8. Resultados del experimento de optimización de la de catalizador.

Dónde:

- **RSD (%)**: desviación estándar relativa porcentual (su valor se indica debajo).
- **Tiempo (min)**: la variable objeto de optimización y las unidades de la misma (su valor se indica debajo).
- **Muestra (nº)**: indica el número de muestra.
- **Masa (g)**: la masa de muestra inicial pesada.
- **HCl valorado (ml)**: el volumen de HCl utilizado en la valoración del destilado.
- **Proteínas (%)**: el porcentaje en masa de proteínas calculado en la muestra.
- **Parámetros fijos**: las condiciones de la etapa de digestión del experimento.
- **N (HCl)**: la normalidad obtenida para la botella de HCl que se emplea en la valoración.
- **Proteínas (%medio)**: el porcentaje en masa medio de proteínas calculado en la muestra.

Además los valores de proteínas en **rojo** indican que en la destilación de la muestra existió una fuga de gas, y por lo tanto ese dato no se tiene en cuenta en los cálculos de valor medio ni en la desviación estándar relativa, es desecharido.

Valores en **naranja** indican que existen anotaciones especiales en referencia a la destilación de esa muestra.

4.2.2. Optimización del volumen de ácido sulfúrico

Para la optimización del volumen de ácido sulfúrico a utilizar se ha llevado a cabo un único ensayo, el cual consiste en utilizar diferentes cantidades de H_2SO_4 añadido a cada uno de los 4 tubos digestores del experimento. Las cantidades de volumen de H_2SO_4 añadido son: 5, 10, 15 y 20ml.

Los parámetros fijos del experimento se muestran en la tabla 9:

		Volumen H_2SO_4 (ml)			
		5	10	15	20
Muestra (nº)		1	2	3	4
Masa (g)		0,9365	1,0432	1,1002	0,9965
HCl valorado(ml)		3,15	23,10	21,75	18,90
Proteínas (%)		3,3	18,6	16,6	15,9
Parámetros fijos: 400°C, 60min, 1tableta					
N (HCl)=		0,09585		Fecha: 9-5-13	

Tabla 9. Resultados del experimento de optimización del volumen de ácido sulfúrico.

Se observa que a excepción de un volumen añadido de 5 ml, el resto de volúmenes de ácido sulfúrico podrían ser adecuados para la digestión. Se ha optado por el volumen más pequeño de los tres (10 ml) puesto que, el resultado de concentración de proteína es el mayor de los tres pero la utilización de volúmenes mayores de ácido implica más problemas procedimentales en el proceso de digestión (que podría reflejarse en peores resultados).

4.2.3. Optimización de la cantidad de catalizador

Para la optimización de la cantidad de catalizador a utilizar se ha llevado a cabo un único ensayo.

Se ha realizado este experimento con objeto de comprobar, o no, la mejora de los resultados con la adición de una segunda tableta de catalizador.

En el ensayo que se ha llevado a cabo para esta optimización se añadirán dos pastillas de catalizador en todos los tubos digestores.

Los parámetros fijos para el experimento se muestran en la tabla 10:

RSD (%)	Tabletas catalizador (nº)			
5,31	2	2	2	2
Muestra (nº)	1	2	3	4
Masa (g)	0,8595	1,0232	0,8596	0,9840
HCl valorado(ml)	11,30	20,80	16,85	21,40
Proteínas (%)	11,4	17,6	17,0	18,8
Parámetros fijos: 400°C, 60min, 10ml H ₂ SO ₄ ; 29/5/13				
N (HCl)=	0,09889	Proteínas (%medio)=		17,8

Tabla 10. Resultados del experimento de optimización de la de catalizador.

Durante la destilación de la muestra número 1 se observó la existencia de una fuga de gas, por lo que se desechó su resultado.

Comparando los valores obtenidos en la tabla 10 con los del experimento de repetibilidad de la tabla 11:

Proteína (% medio)	RSD (% medio)	Número de medidas	Valor de referencia	Error relativo medio (%)
18,8	11,44	4	20,0	6,0

Tabla 11. Resultados del experimento de repetibilidad.

Condiciones: 1 tableta de catalizador, 10 ml de H₂SO₄, y 60 minutos de digestión a 400°C.

Se concluye que la adición de más de una tableta de catalizador no influye en una mejora en la exactitud de los resultados.

4.2.4. Optimización del tiempo de digestión

Para optimizar el tiempo de digestión en el análisis de garbanzos se ha realizado 4 ensayos cuyos tiempos de digestión han sido: 0, 30, 45 y 75 min.

Los parámetros fijos son iguales para los 4 ensayos:

RSD (%)	Tiempo (min)			
13,19	0	1	2	3
Muestra (nº)		1	2	3
Masa (g)	1,1035	1,0724	0,9707	0,9923
HCl valorado(ml)	22,25	20,95	14,55	19,80
Proteínas (%)	16,7	16,1	12,4	16,5
Parámetros fijos: 400°C, 1tableta, 10ml H ₂ SO ₄ ; 19/6/13				
N (HCl)=	0,09442	Proteínas (%medio)=		15,4

Tabla 12. Resultados del experimento de optimización del tiempo de digestión.

RSD (%)		Tiempo (min)			
10,59		30			
Muestra (nº)		1	2	3	4
Masa (g)	0,9703	0,8956	1,0127	0,9147	
HCl valorado(ml)	21,00	15,20	18,60	16,70	
Proteínas (%)	18,7	14,7	15,9	15,8	
Parámetros fijos: 400°C, 1tableta, 10ml H ₂ SO ₄ ; 6/6/13					
N (HCl)=	0,09889	Proteínas (%medio)=		16,3	

Tabla 13. Resultados del experimento de optimización del tiempo de digestión.

RSD (%)		Tiempo (min)			
6,70		45			
Muestra (nº)		1	2	3	4
Masa (g)	0,9947	0,8888	1,0900	0,9367	
HCl valorado(ml)	20,00	20,55	21,95	20,00	
Proteínas (%)	17,4	20,0	17,4	18,5	
Parámetros fijos: 400°C, 1tableta, 10ml H ₂ SO ₄ ; 5/6/13					
N (HCl)=	0,09889	Proteínas (%medio)=		18,3	

Tabla 14. Resultados del experimento de optimización del tiempo de digestión.

RSD (%)		Tiempo (min)			
14,60		60			
Muestra (nº)		1	2	3	4
Masa (g)	1,0371	1,0808	1,0901	1,0373	
HCl valorado(ml)	20,40	21,45	26,90	27,05	
Proteínas (%)	16,3	16,4	20,4	21,6	
Parámetros fijos: 400°C, 1tableta, 10ml H ₂ SO ₄ ; 20/6/13					
N (HCl)=	0,09442	Proteínas (%medio)=		18,7	

Tabla 15. Resultados del experimento de repetibilidad.

RSD (%)		Tiempo (min)			
8,38		75			
Muestra (nº)		1	2	3	4
Masa (g)	0,9570	0,9175	0,9154	1,0462	
HCl valorado(ml)	22,35	21,50	18,45	17,90	
Proteínas (%)	20,2	20,3	17,4	14,8	
Parámetros fijos: 400°C, 1tableta, 10ml H ₂ SO ₄ ; 11/6/13					
N (HCl)=	0,09889	Proteínas (%medio)=		19,3	

Tabla 16. Resultados del experimento de optimización del tiempo de digestión.

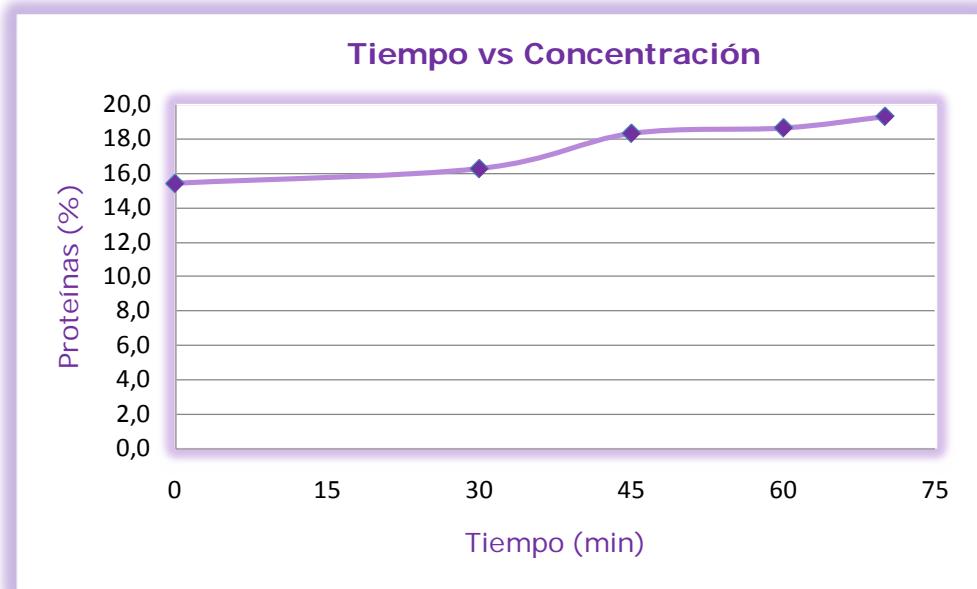


Figura 5. Gráfica de tiempo de digestión frente a concentración de proteína para muestras de garbanzos.

Parece observarse una cierta aproximación a los resultados proporcionados por el fabricante conforme aumenta el tiempo de digestión. Aunque los resultados tras unos tiempos de digestión de 60 y 75min (18,7% y 19,3% respectivamente) son relativamente próximos y no se puede afirmar de manera rotunda y sin tener en cuenta otras consideraciones que la utilización de 75 min de tiempo de digestión frente a 60 min siempre es mejor. En cualquier caso, los resultados obtenidos en ambos experimentos están próximos al valor suministrado por el fabricante.

4.2.5. Optimización de la temperatura de digestión

Como ya se ha comentado, la temperatura de digestión es una de las variables fundamentales a la hora de lograr una digestión completa de la muestra. Es por ello que para optimizar dicha se han llevado a cabo 5 ensayos a diferentes temperaturas: 200, 250, 300, 350 y 400 °C.

Los parámetros fijos -iguales para los cinco ensayos- se muestran en las respectivas tablas.

RSD (%)		Temperatura (°C)			
11,12		200			
Muestra (nº)		1	2	3	4
Masa (g)	1,1415	0,8787	1,0068	1,1364	
HCl valorado(ml)	8,35	4,45	8,90	8,35	
Proteínas (%)	6,3	4,4	7,7	6,4	
Parámetros fijos: 60min, 1tableta, 10ml H ₂ SO ₄ ; 13/06/2013					
N (HCl)=	0,09889	Proteínas (%medio)=			6,8

Tabla 17. Resultados del experimento de optimización de la temperatura de digestión.

RSD (%)		Temperatura (°C)			
11,48		250			
Muestra (nº)		1	2	3	4
Masa (g)	1,0342	1,0387	1,0718	1,0761	
HCl valorado(ml)	16,10	14,05	12,60	15,20	
Proteínas (%)	12,9	11,2	9,7	11,7	
Parámetros fijos: 60min, 1tableta, 10ml H ₂ SO ₄ ; 14/6/13					
N (HCl)=	0,09442	Proteínas (%medio)=			11,4

Tabla 18. Resultados del experimento de optimización de la temperatura de digestión.

RSD (%)		Temperatura (°C)			
5,98		300			
Muestra (nº)		1	2	3	4
Masa (g)	0,8330	0,9692	0,8530	0,8049	
HCl valorado(ml)	14,40	18,90	16,90	15,40	
Proteínas (%)	14,9656	16,8821	17,1520	16,5637	
Parámetros fijos: 60min, 1tableta, 10ml H ₂ SO ₄ ; 30/5/13					
N (HCl)=	0,09889	Proteínas (%medio)=			16,4

Tabla 19. Resultados del experimento de optimización de la temperatura de digestión.

RSD (%)		Temperatura (°C)			
10,83		350			
Muestra (nº)		1	2	3	4
Masa (g)	0,9645	1,0907	1,0714	1,0038	
HCl valorado(ml)	20,85	25,25	21,40	18,00	
Proteínas (%)	18,7	20,0	17,3	15,5	
Parámetros fijos: 60min, 1tableta, 10ml H ₂ SO ₄ ; 4/6/13					
N (HCl)=	0,09889	Proteínas (%medio)=			17,9

Tabla 20. Resultados del experimento de optimización de la temperatura de digestión.

RSD (%)	Temperatura (°C)			
14,60	400			
Muestra (nº)	1	2	3	4
Masa (g)	1,0371	1,0808	1,0901	1,0373
HCl valorado(ml)	20,40	21,45	26,90	27,05
Proteínas (%)	16,3	16,4	20,4	21,6
Parámetros fijos: 60min, 1tableta, 10ml H ₂ SO ₄ ; 20/6/13				
N (HCl)=	0,09442	Proteínas (%medio)=		18,7

Tabla 21. Resultados del experimento de repetibilidad.

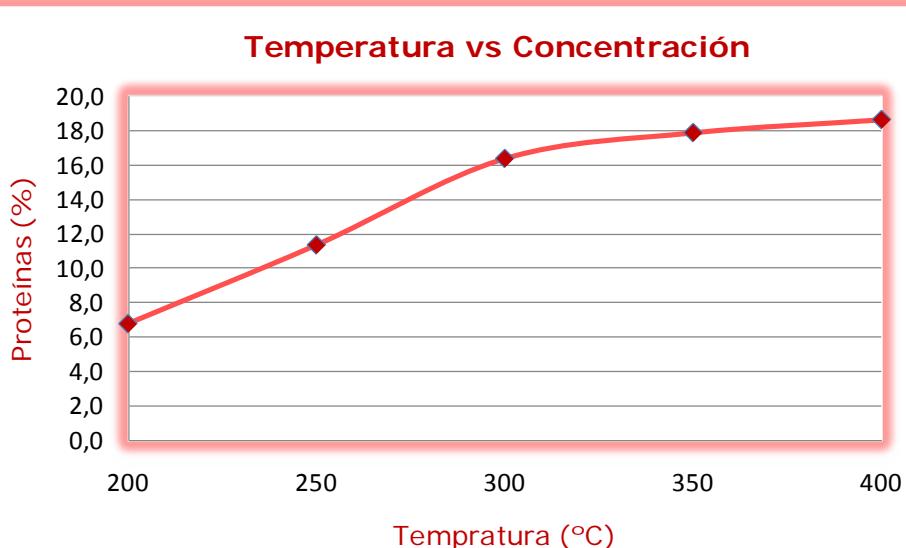


Figura 6. Gráfica de temperatura de digestión frente a concentración de proteína para muestras de garbanzos.

En la figura 6 se observa cómo, a una temperatura de digestión de 200°C, los resultados obtenidos están muy lejos de los esperados. Además, se constató durante el ensayo que quedaba materia sólida ennegrecida tras el proceso de digestión por lo que esta temperatura no es suficiente para conseguir una digestión total.

El mismo argumento se puede utilizar para un valor de temperatura de digestión de 250°C. La concentración de proteína es superior al obtenido con 200°C, aunque muy lejano del valor de referencia y también se observa que queda en el tubo materia no digerida.

Con valores de 300°C de temperatura de digestión, se observa que los valores ya se aproximan a los reales, pero aún se puede apreciar contenido ennegrecido en los tubos digestores al finalizar el proceso de digestión (aunque a esta temperatura no quedan restos sólidos como ocurría en los dos casos anteriores).

Para valores de 350 y 400 °C temperatura de digestión, los % de proteínas ya están muy cercanos al valor de referencia proporcionado por el fabricante (diferencia relativa del 10,5 y 6,7% respectivamente).

4.2.6. Ensayos de repetibilidad

Para conocer la exactitud y precisión de los resultados obtenidos para este tipo de análisis, se han diseñado cuatro ensayos de repetibilidad fijando las siguientes condiciones: 400°C de temperatura de digestión, 60 minutos de tiempo de digestión, 1 tableta de catalizador añadida al tubo digestor, 10ml de H₂SO₄ agregados al tubo digestor. Se han llevado a cabo a lo largo del trabajo de laboratorio y, en esas condiciones citadas, se han obtenido 16 valores, de los cuales han sido eliminados 2 de ellos por razones experimentales (se observaron fugas). El valor de %proteínas promedio obtenido fue de 18,5, con una %RSD de 12,9 y una diferencia con respecto al valor de referencia del fabricante del 7,3%.

Se podría concluir que, si bien los resultados son relativamente cercanos a los reales, la precisión de los mismos es manifiestamente mejorable. Esta falta de precisión podría ser debida a la heterogeneidad de la muestra (se pesaron garbanzos individuales), por lo cual una opción de mejora podría ser introducir la muestra de garbanzos previamente molidos.

4.3. Lácteo. Leche en polvo desnatada

4.3.1. Consideraciones previas

El factor de relación entre la masa de nitrógeno orgánico de la muestra y la masa de proteína en la misma para la leche en polvo desnatada es el mismo factor de relación que para productos lácteos: 6,38. (Por cada 1g de nitrógeno orgánico hay 6,38g de proteína en la muestra).

Al igual que en el caso de los garbanzos, se pretende realizar la determinación del amoniaco con el máximo volumen posible de una única bureta de 25 ml de ácido clorhídrico. Como no se conoce la normalidad real del HCl, se supondrá un HCl 0,09442N (es la normalidad de la botella de gran volumen valorada que durará para todos los experimentos de la leche en polvo desnatada) y se fijarán 23 ml como un volumen óptimo:

$$\frac{23 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}} l \times 0,09442 \text{ N} = 2,1717 \times 10^{-3} \text{ mol}$$

Se utilizarán 2,1717 x 10⁻³mol de HCl para valorar el amoniaco recogido, tienen que recogerse 2,1717 x 10⁻³ mol de NH₃, es decir, la muestra tiene que contener esos mismos moles de nitrógeno orgánico, se conoce que el peso molar del nitrógeno es de 14,007g por cada mol:

$$2,1717 \times 10^{-3} \text{ mol} \times 14,007 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \times 6,38 = 0,1941 \text{ g}$$

La muestra inicial debe contener 0,1941g de proteína, como la muestra tiene un contenido del 35,20% de proteína:

$$\frac{0,1941 \text{ g}}{35,20\%} = 0,5513 \text{ g}$$

Se tomarán muestras del bote de leche en polvo desnatada de 0,55g aproximadamente.

4.3.2. Optimización del volumen de ácido sulfúrico

La optimización del volumen de ácido sulfúrico que se añade se hace de nuevo mediante un experimento, como el descrito para el apartado de los garbanzos consiste en utilizar diferentes cantidades de H_2SO_4 añadido a cada uno de los 4 tubos del bloque digestor. Las cantidades de volumen de H_2SO_4 añadido son: 5, 10, 15 y 20ml.

Los parámetros fijos del experimento se muestran en la tabla 22:

H_2SO_4 añadido (ml)	5	10	15	20
Proteína (%)	34,1	34,5	31,1	29,9

Tabla 22. Resultados del experimento de optimización del volumen de ácido sulfúrico.
Condiciones: 1 tableta de catalizador, 10 ml de H_2SO_4 , y 60 minutos de digestión a 400°C.

Se puede ver que el volumen óptimo para los experimentos vuelve a ser 10ml, se puede pensar que la coincidencia sea gracias a que se ha calculado una cantidad de muestra para la leche en polvo desnatada con la que se obtienen la misma masa de nitrógeno y una masa muy parecida de proteínas, como ambos alimentos tienen poca grasa cabría pensar que la mayor parte del H_2SO_4 añadido al proceso de digestión se emplea para degradar las proteínas.

4.3.3. Optimización de la cantidad de catalizador

Si bien la cantidad de muestra que se digiere es pequeña (0,55g aproximadamente) y es previsible que una tableta de catalizador sea más que suficiente, se ha optado por realizar un ensayo con dos tabletas de catalizador para comprobar empíricamente esa predicción

Tal y como se muestra en la tabla X, se ha llevado a cabo un ensayo con adición de 1 y 2 tabletas de catalizador. El resto de condiciones del ensayo también se muestran en la citada tabla.

20) Tabletas catalizador (nº)				
	1	1	2	2
Muestra (nº)	1	2	3	4
Masa (g)	0,5525	0,5735	0,5518	0,5500
HCl valorado(ml)	22,80	23,70	18,20	21,05
Proteínas (%)	34,8	34,9	27,8	32,3
Parámetros fijos: 400°C, 60min, 10 ml				
N (HCl)=	0,09442	Fecha: 2-7-13		

Tabla 23. Resultados del experimento de optimización de la de catalizador.

A la vista de los valores obtenidos, se puede observar que una mayor adición de tabletas de catalizador no mejora los resultados obtenidos, más bien al contrario (en términos de exactitud y precisión), por lo cual se fijará 1 tableta como el valor óptimo en este apartado.

4.3.4. Optimización del tiempo de digestión

La optimización de la variable de tiempo ha constado de 6 ensayos con los siguientes tiempos de digestión: 0, 15, 30, 45, 60 y 75 min.

El resto de variables han sido las mismas en todos los ensayos y se muestran, junto con los resultados obtenidos, en la tabla 24 de resultados:

Tiempo (min)	Proteína (% medio)	RSD (%)	Error relativo medio (%)
0	32,6	2,4	7,4
15	33,8	1	4,0
30	34,0	0,9	3,4
45	34,0	0,9	3,4
60	34,6	0,6	1,7
75	34,6	0,6	1,7

Tabla 24. Experimento de optimización de tiempo de digestión. Condiciones: 400°C de temperatura de digestión, 1 tableta de catalizador añadida y 10ml de H₂SO₄ agregados. Porcentaje de referencia de contenido de proteína: 35,2%.

En la tabla 24 se expone que incluso para tiempo 0 de digestión, el resultado obtenido es, moderadamente bueno (en términos de exactitud y precisión). Conforme aumenta el tiempo de digestión, estos resultados mejoran en exactitud y precisión.

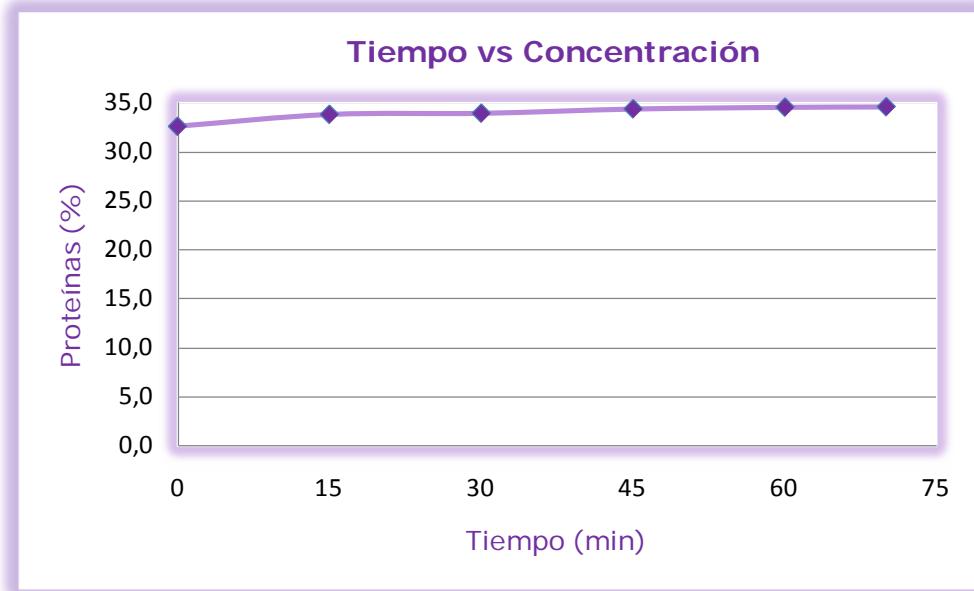


Figura 7. Gráfica de tiempo de digestión frente a concentración de proteína para muestras de leche en polvo desnatada.

4.3.5. Optimización de la temperatura de digestión

Para optimizar la temperatura de digestión se han realizado 5 ensayos a distintas temperaturas: 200, 250, 300, 350 y 400°C.

En la tabla 25 se pueden observar los resultados obtenidos, así como las condiciones en las que estos han sido obtenidos:

Temperatura (°C)	Proteína (% medio)	RSD (%)	Error relativo medio (%)
200	4	2,9	88,6
250	13,5	67,9	61,6
300	30,1	11,9	14,5
350	34,1	2,7	3,1
400	34,6	0,6	1,7

Tabla 25. Experimento de optimización de la temperatura de digestión. Condiciones: 60 minutos de digestión, 1 tableta de catalizador añadida y 10ml de H₂SO₄agregados.
Porcentaje de referencia de contenido de proteína: 35,2%.

En la tabla 25 se muestra que una temperatura de 200°C es claramente insuficiente para lograr una digestión completa. Conforme la temperatura de digestión va aumentando, se observa una mejora en los valores de exactitud y precisión.

Los resultados obtenidos a 250°C han sido muy dispersos (como se observa por la RSD), mejorando a 300°C, aunque sin llegar a los valores deseables. A temperaturas de 350 y 400 °C, esa dispersión desaparece y se encuentran resultados que ya si muestran valores adecuados de exactitud y precisión.

La dispersión de resultados obtenida en los ensayos con las temperaturas bajas podría ser explicada por anomalías en los procesos de calentamiento del bloque digestor. Una posible diferencia en el proceso de calentamiento haría que, a altas temperaturas se minimizasen relativamente esas diferencias dentro de cada uno de los tubos del bloque digestor (que en teoría deberían ser las mismas). Sin embargo, a bajas temperaturas, esas diferencias serían relativamente mayores.

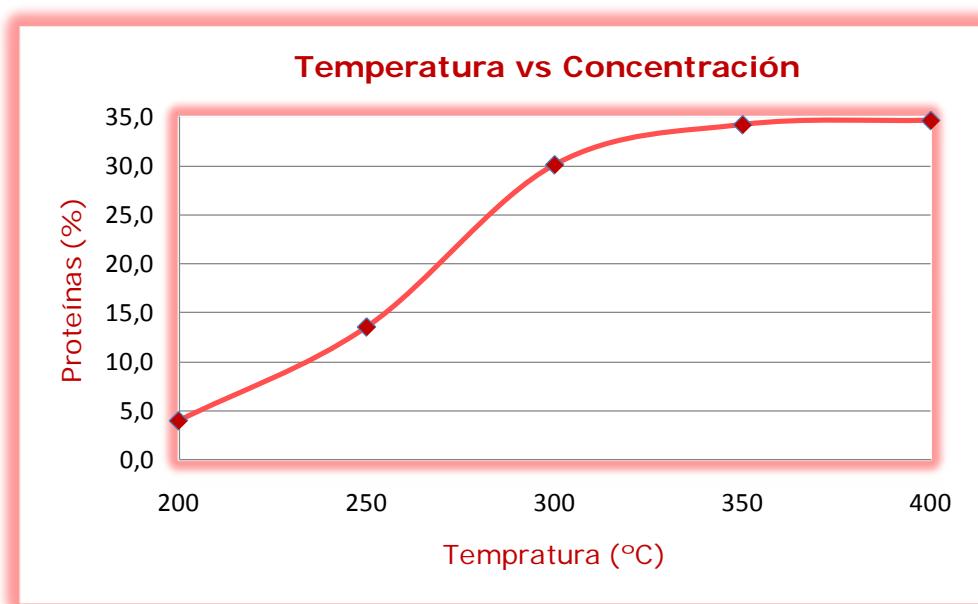


Figura 8. Gráfica de temperatura de digestión frente a concentración de proteína para muestras de leche en polvo desnatada.

4.3.6. Ensayos de repetibilidad

Como se ha procedido con las muestras de garbanzos y para conocer la exactitud y precisión de los resultados obtenidos para este tipo de análisis, se han diseñado dos ensayos de repetibilidad fijando las siguientes condiciones: 400°C de temperatura de digestión, 60 minutos de tiempo de digestión, 1 tableta de catalizador y 10ml de H₂SO₄ agregados al tubo digestor. Se han llevado a cabo a lo largo del trabajo de laboratorio y, en esas condiciones citadas, se han obtenido 8 valores. Se obtuvo un contenido porcentual de proteína medio de 34,6, con una desviación estándar relativa porcentual de 0,17 y un error relativo porcentual medio respecto al valor de del fabricante de 1,8%.

A diferencia del caso de los garbanzos, para este tipo de muestra se puede concluir que el método de análisis proporciona resultados exactos y precisos. El formato de la muestra (la leche en polvo son partículas con gran área específica lo cual mejora la cinética del proceso de digestión) hacen pensar que la homogeneidad de la misma tiene influencia en los resultados obtenidos, sobre todo en términos de precisión.

5. CONCLUSIONES

5.1. Parámetros óptimos

5.1.1. Garbanzos

Con los resultados obtenidos, se concluye que las condiciones óptimas para el análisis de la concentración de proteína en muestras de garbanzos con un sistema semiautomático de digestión-destilación basado en el método Kjeldahl son la adición de 1 tableta de catalizador y 10 ml de ácido sulfúrico. Respecto al tiempo de digestión, es posible utilizar un rango de tiempos desde 60 a 75 minutos y un rango de entre 350 y 400°C para temperaturas de digestión.

5.1.2. Leche en polvo desnatada

Con los resultados obtenidos, se concluye que las condiciones óptimas para el análisis de la concentración de proteína en muestras de leche en polvo desnatada con un sistema semiautomático de digestión-destilación basado en el método Kjeldahl son la adición de 1 tableta de catalizador y 10 ml de ácido sulfúrico. En cuanto al tiempo de digestión, es posible utilizar un rango de tiempos que va desde 30 a 75 minutos y un rango de entre 350 y 400°C para temperaturas de digestión.

5.2. Resultados de los análisis

Con los datos obtenidos de los experimentos de las muestras de garbanzos y de leche en polvo desnatada respectivamente, se obtienen los resultados representados en las siguientes tablas:

Proteína (% medio)	RSD (% medio)	Número de medidas	Valor de referencia	Error relativo medio (%)
18,5	12,9	14	20,0	7,5

Tabla 26. Resultados de los análisis de la concentración de proteína en muestras de garbanzos. Condiciones: 1 tableta de catalizador, 10 ml de H_2SO_4 , y 60 minutos de digestión a 400°C.

Proteína (% medio)	RSD (% medio)	Número de medidas	Valor de referencia	Error relativo medio (%)
34,6	0,17	6	35,2	1,7

Tabla 27. Resultados de los análisis de la concentración de proteína en muestras de leche en polvo desnatada. Condiciones: 1 tableta de catalizador, 10 ml de H_2SO_4 , y 60 minutos de digestión a 400°C.

5.3. Resultados de la repetibilidad

En términos de repetibilidad, se ha observado que para la leche en polvo desnatada, los valores de precisión obtenidos han sido mucho mejores que para el caso de los garbanzos. Ello se puede deber en gran medida a la diferencia de la homogeneidad de la muestra (diferente formato de la muestra). En el caso de la leche en polvo, se trata de una muestra en polvo, muy homogénea, que presenta gran superficie específica que permite una cinética de digestión rápida. En el caso de los garbanzos, se trata de una muestra sólida, más heterogénea que la leche en polvo, cuya digestión completa podría no ser tan fácil y rápida como ésta. Es por ello que para el análisis de garbanzos se necesita un mayor número de ensayos para lograr valores adecuados en términos de exactitud, que no de precisión.

Con objeto de aumentar esta precisión sería interesante mejorar la homogeneidad de las muestras de garbanzos con una etapa de preparación de muestra anterior a su digestión (lo cual disminuiría el número de ensayos necesarios para conseguir valores exactos). Esta preparación consistiría en la molienda de garbanzos y posterior homogenización. Quizás con este paso previo se pudiesen mejorar los resultados obtenidos en este proyecto.

6. BIBLIOGRAFÍA

(1) "Aspectos generales de las proteínas" en "Proteínas". Página 2:
http://www.uco.es/master_nutricion/nb/Mataix/proteinas.pdf

(2) "Aminoácidos", "Introducción", "Estructura de las proteínas" y "Funciones y ejemplos de proteínas" en "Estructura y propiedades de las proteínas". Página 4, 4, 11 y 19 respectivamente:
http://www.uv.es/tunon/pdf_doc/proteinas_09.pdf

(3) "Enlace peptídico":
<http://medmol.es/glosario/76/>

(4) "Resumen" en "Las dietas hiperproteícas y sus consecuencias metabólicas". Página 1:
<http://www.scielo.org.ve/pdf/avn/v22n2/art07.pdf>

(5) "Dieta rica en proteínas" en "Metabolismo de aminoácidos". Página 26:
http://www.fmv-uba.org.ar/grado/medicina/ciclo_biomédico/segundo_a%C3%B1o/bioquímica/Seminario12/seminario12file3.pdf

(6) "Deficiencia de proteínas" en "Proteínas". Página 7:
http://www.uco.es/master_nutricion/nb/Krause/proteinas.pdf

(7) "Valor biológico":
http://es.wikipedia.org/wiki/Valor_biol%C3%B3gico

(8) "Proteínas" en "Legumbres". Página 2:
<http://www.unican.es/NR/rdonlyres/D3BC1E89-8BA2-4DB3-B53BE601230086FE/84336/Legumbres2.pdf>

(9) "Protein Content" en "Amino Acid Profile". Página 7:
http://oar.icrisat.org/6107/2/BJN_Chickpea_Paper_Gaur_et.al._2012_Review.pdf

(10) "Proteínas" en "Composición de la leche y valor nutricional". Página 2:
http://babcock.wisc.edu/sites/default/files/de/es/de_19.es.pdf

(11) "Johan Kjeldahl":
http://es.wikipedia.org/wiki/Johan_Kjeldahl

(12) "Método Kjeldahl":
http://es.wikipedia.org/wiki/M%C3%A9todo_Kjeldahl

(13) "Método de Kjeldahl", "Método de Biuret" y "Métodos físicos" en "Capítulo 15. Métodos de análisis para la determinación de nitrógeno y constituyentes nitrogenados en alimentos" en "Métodos de determinación de nitrógeno total". Página 2, 5 y 8 respectivamente:
<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/ah833s/AH833S08.pdf>

(14) "1.1 Métodos para la cuantificación de proteínas": ventajas e inconvenientes" en "Métodos para la cuantificación de proteínas". Página 3:

<http://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/27%20M%C3%89TODOS%20PARA%20LA%20CUANTIFICACI%C3%93N%20DE%20PROTE%C3%8DNAS.pdf>

(15) "Determinación de proteínas por el método de Lowry". Página 1:

<http://acasti.webs.ull.es/docencia/practicas/4.pdf>

(16) "3. Función" en "Manual de operaciones de la unidad de destilación Büchi K-314". Página 6.

(17) "General mechanism" "Devarda's alloy"

http://en.wikipedia.org/wiki/Devarda's_alloy

(18) Proyecto fin de carrera: "Determinación del contenido proteico en pastas alimenticias y cereales expandidos. Optimización de un sistema semiautomático de digestión-destilación basado en el método Kjeldahl" por Estela Guallar Herrero, febrero 2013. Universidad de Zaragoza.

7. ANEXOS

7.1. Lista de tablas y figuras

7.1.1. Lista de tablas

Tabla 1. Resultados del experimento número 1 de la determinación de la concentración real de ácido clorhídrico valorante. Botella de 1 litro.

Tabla 2. Resultados del experimento número 2 de la determinación de la concentración real de ácido clorhídrico valorante. Botella de 1 litro.

Tabla 3. Resultados del experimento número 3 de la determinación de la concentración real de ácido clorhídrico valorante. Botella de 2,5 litros.

Tabla 4. Resultados del experimento número 1 de la calibración del equipo de destilación.

Tabla 5. Resultados del experimento número 2 de la calibración del equipo de destilación.

Tabla 6. Resultados del experimento número 3 de la calibración del equipo de destilación.

Tabla 7. Resultados del experimento número 4 de la calibración del equipo de destilación.

Tabla 8. Resultados del experimento de optimización de la de catalizador.

Tabla 9. Resultados del experimento de optimización del volumen de ácido sulfúrico.

Tabla 10. Resultados del experimento de optimización de la de catalizador.

Tabla 11. Resultados del experimento de repetibilidad.

Condiciones: 1 tableta de catalizador, 10 ml de H_2SO_4 , y 60 minutos de digestión a 400°C.

Tabla 12. Resultados del experimento de optimización del tiempo de digestión.

Tabla 13. Resultados del experimento de optimización del tiempo de digestión.

Tabla 14. Resultados del experimento de optimización del tiempo de digestión.

Tabla 15. Resultados del experimento de repetibilidad.

Tabla 16. Resultados del experimento de optimización del tiempo de digestión.

Tabla 17. Resultados del experimento de optimización de la temperatura de digestión.

Tabla 18. Resultados del experimento de optimización de la temperatura de digestión.

Tabla 19. Resultados del experimento de optimización de la temperatura de digestión.

Tabla 20. Resultados del experimento de optimización de la temperatura de digestión.

Tabla 21. Resultados del experimento de repetibilidad.

Tabla 22. Resultados del experimento de optimización del volumen de ácido sulfúrico.

Condiciones: 1 tableta de catalizador, 10 ml de H_2SO_4 , y 60 minutos de digestión a 400°C.

Tabla 23. Resultados del experimento de optimización de la de catalizador.

Tabla 24. Experimento de optimización de tiempo de digestión.
Condiciones: 400°C de temperatura de digestión, 1 tableta de catalizador añadida y 10ml de H_2SO_4 agregados.

Porcentaje de referencia de contenido de proteína: 35,2%.

Tabla 25. Experimento de optimización de la temperatura de digestión.
Condiciones: 60 minutos de digestión, 1 tableta de catalizador añadida y 10ml de H_2SO_4 agregados.

Porcentaje de referencia de contenido de proteína: 35,2%.

Tabla 26. Resultados de los análisis de la concentración de proteína en muestras de garbanzos. Condiciones: 1 tableta de catalizador, 10 ml de H_2SO_4 , y 60 minutos de digestión a 400°C.

Tabla 27. Resultados de los análisis de la concentración de proteína en muestras de leche en polvo desnatada. Condiciones: 1 tableta de catalizador, 10 ml de H_2SO_4 , y 60 minutos de digestión a 400°C.

7.1.2. Lista de figuras

Figura 1. Estructura general de un aminoácido.

Figura 2. Tabla de valores biológicos de algunos alimentos comunes.

Figura 3. Fotografías del bloque digestor en el laboratorio. Bloque digestor con seis tubos y trompa de agua (izquierda) y calentador con controlador digital (derecha).

Figura 4. Fotografía del destilador en el laboratorio.

Figura 5. Gráfica de tiempo de digestión frente a concentración de proteína para muestras de garbanzos.

Figura 6. Gráfica de temperatura de digestión frente a concentración de proteína para muestras de garbanzos.

Figura 7. Gráfica de tiempo de digestión frente a concentración de proteína para muestras de leche en polvo desnatada.

Figura 8. Gráfica de temperatura de digestión frente a concentración de proteína para muestras de leche en polvo desnatada.