

46



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

DECOLORACION DE LA HEMOGLOBINA PARA EL APROVECHAMIENTO DE LAS PROTEINAS DEL PAQUETE GLOBULAR DE LA SANGRE DE CERDO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A :

MARISOL SALDAÑA CORTES

14/03/2000



MEXICO, D.F.

2000

IMPRESA...



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado:

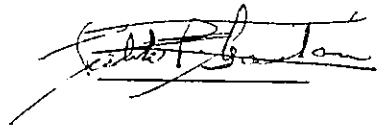
Presidente: Profa. Zoila Nieto Villalobos.
Vocal: Prof. Felipe de Jesús Rodríguez Palacios.
Secretario: Prof. Pablo Pérez-Gavilán Escalante.
1^{er} Suplente: Profa. Ruth Villaseñor Gutiérrez.
2^{do} Suplente: Profa. Gabriela Alatorre García.

Sitio donde se desarrolló el tema:

Universidad Nacional Autónoma de México.
Instituto de Investigaciones Biomédicas.
Departamento de Biotecnología.

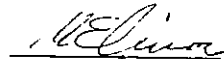
Asesor del tema:

Dr. Pablo Pérez-Gavilán Escalante.



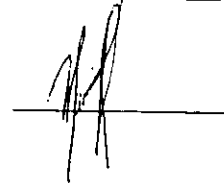
Supervisor técnico:

M. en C. Carmen Martha Elinos Báez.



Sustentante:

Marisol Saldaña Cortés.



DEDICATORIA

A Dios, por estar a mi lado y permitirme realizar este sueño.

A mis padres, Constancio y Guadalupe, por el apoyo que siempre me han brindado y por su gran esfuerzo.

A mis hermanos, Rubén y David, por enseñarme el camino.

A mi Laura, por alegrar los días.

A mis amigos, por los momentos compartidos.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

A la Facultad de Química.

Al Dr. Pablo Pérez-Gavilán Escalante por su valiosa ayuda y paciencia en la realización del proyecto, al igual que a la M. en C. Carmen Martha Elinos Báez.

A todas aquellas personas que de alguna manera han contribuido en el desarrollo y finalización de mi carrera.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1.Composición de la sangre	4
2.2.Valor nutrimental de la sangre	6
2.3.Hemoglobina	8
2.3.1. Estructura de la hemoglobina.....	8
2.3.2. Grupo hemo.....	10
2.3.3. Absorción en el espectro de la hemoglobina.....	12
2.3.4. Formación y destrucción de la hemoglobina.....	12
2.4.Aprovechamiento de la sangre	13
2.4.1. Aplicaciones de la sangre.....	14
2.4.2. Utilización de la sangre en la industria alimentaria.....	15
2.4.3. La sangre en rastros del D.F. y zona conurbada.....	15
2.5.Industrialización de la sangre	19
2.5.1. Recolección.....	19
2.5.2. Anticoagulantes.....	20
2.5.3. Fraccionamiento.....	21
2.5.4. Utilización del plasma.....	22
2.5.5. Utilización del paquete globular.....	23
2.6.Métodos de decoloración de la hemoglobina	24
2.6.1. Propiedades funcionales de la globina.....	31
2.6.2. Utilización de la globina.....	36
3. MÉTODOS Y MATERIALES	38
3.1.Estudios preliminares sobre las propiedades de la hemoglobina y del grupo hemo	38
3.1.1. Espectro de absorción de la hemoglobina.....	38
3.1.2. Efecto del pH en la solubilidad de la hemoglobina.....	38

3.1.3. Efecto del pH en la solubilidad del grupo hemo	39
3.1.4. Comportamiento del grupo hemo en diferentes solventes.....	39
3.2. Valoración de los distintos métodos de decoloración de la hemoglobina.....	39
3.2.1. Precipitación del grupo hemo con carboximetilcelulosa	39
3.2.2. Precipitación del grupo hemo con carboximetilcelulosa y efecto de la temperatura.....	40
3.2.3. Precipitación del grupo hemo con alginato de sodio.....	40
3.2.4. Precipitación de la globina con acetona ácida.....	41
3.2.5. Oxidación de la hemoglobina con peróxido de hidrógeno.....	41
3.3. Optimización de la decoloración de la hemoglobina con peróxido de hidrógeno.....	43
3.3.1. Efecto del pH en la decoloración de la hemoglobina.....	43
3.3.2. Efecto del tiempo y la concentración del peróxido de hidrógeno en la decoloración de la hemoglobina.....	43
3.3.3. Efecto del tiempo y la temperatura en la decoloración de la hemoglobina.....	44
3.3.4. Espectro de absorción de la hemoglobina con y sin tratamiento de decoloración con peróxido de hidrógeno.....	44
3.3.5. Valoración del % de peróxido de hidrógeno perdido durante el tratamiento de oxidación de la hemoglobina.....	44
3.4. Análisis proximal del producto obtenido por decoloración con peróxido de hidrógeno.....	45
3.4.1. Proteína cruda.....	45
3.4.2. Humedad.....	45
3.4.3. Cenizas totales.....	46
3.4.4. Determinación de hierro antes y después del tratamiento de decoloración con peróxido de hidrógeno.....	46
3.5. Propiedades funcionales del producto obtenido por decoloración con peróxido de hidrógeno.....	46
3.5.1. Solubilidad.....	46
3.5.2. Viscosidad.....	47
3.5.3. Gelatinización.....	47

3.5.4. Emulsificación.....	47
3.5.4.1. Índice de actividad emulsificante (EAI).....	48
3.5.4.2. Índice de estabilidad emulsificante (ESI).....	48
3.6. Definición del proceso sugerido para la decoloración de la hemoglobina.....	49
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	53
4.1. Estudios preliminares de las propiedades de la hemoglobina y el grupo hemo.....	53
4.1.1. Espectro de absorción de la hemoglobina.....	53
4.1.2. Efecto del pH en la solubilidad de la hemoglobina.....	54
4.1.3. Efecto del pH en la solubilidad del grupo hemo	55
4.1.4. Comportamiento del grupo hemo en diferentes solventes.....	56
4.2. Comparación de los métodos de decoloración de la hemoglobina.....	57
4.2.1. Decoloración con carboximetilcelulosa.....	57
4.2.2. Decoloración con alginato de sodio.....	58
4.2.3. Decoloración con acetona ácida.....	58
4.2.4. Decoloración con peróxido de hidrógeno.....	59
4.3. Optimización de la decoloración de la hemoglobina con peróxido de hidrógeno.....	60
4.3.1. Efecto del pH en la decoloración.....	60
4.3.2. Efecto del tiempo y la concentración del peróxido de hidrógeno en la decoloración.....	62
4.3.3. Efecto del tiempo y la temperatura en la decoloración.....	63
4.3.4. Espectro de absorción de la hemoglobina con y sin tratamiento con peróxido de hidrógeno.....	64
4.3.5. Degradación del peróxido de hidrógeno en la decoloración.....	65
4.4. Análisis proximal.....	66
4.4.1. Proteína, Cenizas y Humedad.....	66
4.4.2. Contenido de hierro.....	67

4.5. Propiedades funcionales del producto obtenido por decoloración con peróxido de hidrógeno	67
4.5.1. Solubilidad	67
4.5.2. Viscosidad.....	68
4.5.3. Gelatinización	69
4.5.4. Emulsificación.....	70
5. CONCLUSIONES	73
6. BIBLIOGRAFÍA	74

1. INTRODUCCIÓN

En México del sacrificio de los animales de rastro se obtienen 192 000 Ton de sangre la cual contiene aproximadamente 40 000 Ton de proteína, ésta sangre es desechada en su mayoría; su utilización se limita a productos de escasa demanda (morcillas), por lo que la sangre que no se aprovecha se tira al drenaje, aumentando considerablemente el riesgo de contaminaciones microbianas y la concentración de sólidos suspendidos en los efluentes. En algunos rastros la mayor parte de la sangre se utiliza en la fabricación de piensos para animales en forma de harina de sangre.

Del total de proteína que contiene la sangre (18%), el 20% se encuentra en el plasma y el 80% en el paquete globular. Estas proteínas pueden ser aprovechadas en la industria alimentaria debido a sus propiedades funcionales o para aumentar el contenido proteico de algunos alimentos, elevando de esta manera su valor nutricional.

La sangre extraída de los animales sanos es estéril y si se recoge en condiciones higiénicas puede emplearse para consumo humano, pero la adición de sangre en cantidades superiores a un pequeño porcentaje en productos cárnicos hace que se pongan demasiado oscuros y sean poco apetecibles.

Al adicionar anticoagulantes a la sangre se pueden separar por centrifugación sus fracciones, plasma y paquete globular; al desaprovechar éste último y utilizando solamente el plasma como aditivo alimentario se desperdician una gran cantidad de proteínas cárnicas. El paquete globular contiene la hemoglobina responsable del color rojo intenso de la sangre; para decolorar esta proteína y poderla utilizar se han propuesto diversos métodos, pero ninguno de ellos parece verdaderamente haber alcanzado la escala industrial.

En este proyecto se analizaron algunos métodos que se han propuesto para la decoloración de la hemoglobina, con la finalidad de encontrar un proceso adecuado para la industrialización de las proteínas del paquete globular; la factibilidad técnica y la viabilidad económica del proceso son

factores importantes que se deben de considerar al evaluar las diferentes metodologías. Dentro de los métodos estudiados se incluyen la precipitación, la extracción y la oxidación del grupo hemo. Los mejores resultados se presentaron en la decoloración con un agente oxidante; por lo que la siguiente etapa del proyecto fue establecer las condiciones óptimas para realizar este proceso.

La proteína obtenida por éste método se pretende pueda utilizarse como ingrediente en ciertos alimentos, sin que modifique o afecte de manera significativa las características sensoriales del producto.

Finalmente, después de la decoloración de la hemoglobina, se evaluaron algunas propiedades de la proteína obtenida, para tener una perspectiva más amplia del tipo de alimento al que se puede adicionar.

Justificación

Como se ha mencionado en México se obtiene un gran volumen de sangre, el cual tiene un alto contenido de proteína; la utilización de la sangre es escasa siendo desechada la mayor parte de ésta, lo que ocasiona problemas de contaminación, sin embargo sí se sometiera a un proceso de industrialización podría producir ingresos considerables.

Al separar la sangre en sus fracciones plasma y paquete globular se puede realizar una mejor valorización de las proteínas. La mayoría de las proteínas se encuentran en la fracción del paquete globular, pero si se adiciona éste en algunos alimentos se obtienen productos poco apetecibles, por lo que el objetivo del presente trabajo es decolorar la hemoglobina para obtener un producto de mejor apariencia que al emplearlo en algún sistema alimentario no afecte las características sensoriales del producto y además aumente su valor proteico.

Objetivos

- Comparar los métodos que existen para decoloración de la hemoglobina.
- Optimizar el método de decoloración de la hemoglobina que presente los mejores resultados.
- Valorar la factibilidad técnica y económica del proceso para ser utilizado como método de industrialización de proteínas en rastros TIF de México.
- Estudiar algunas propiedades de la proteína obtenida por el método de decoloración seleccionado.

2. ANTECEDENTES

2.1. Composición de la sangre

La sangre es un elemento constante del organismo, aunque su composición puede fluctuar en función de un gran número de factores como pueden ser: raza, edad, alimentación y estado fisiológico entre otros. Las composiciones dadas indican que los valores medios son: 80 % de agua, 18 % de proteínas y 2 % de glúcidos, lípidos y sales minerales. (Linden y Lorient, 1996)

Del 18 % de proteína que contiene la sangre, el 20 % se encuentra en el plasma y el 80 % restante en el paquete globular. (Autio et al., 1984)

El contenido en constituyentes minerales es relativamente constante, porque aseguran un papel amortiguador y la constancia de las características fisicoquímicas de la sangre.

Por el contrario, el contenido de lípidos es, según el período del día, muy variable; lo mismo ocurre para otros nutrientes. En el caso de los glúcidos intervienen en sistemas de regulación para poder mantener una proporción relativamente constante. (Cheftel et al., 1989)

Si se añaden anticoagulantes a la sangre se pueden separar por centrifugación sus fracciones, que son el paquete globular y el líquido restante que se denomina plasma. El paquete globular o sedimento contiene los glóbulos rojos o eritrocitos, los glóbulos blancos y las plaquetas; la proteína dominante en esta fracción es la *hemoglobina*. (Linden y Lorient, 1996).

De las sustancias que contiene el plasma (lípidos, glúcidos, aminoácidos, sales minerales, etc.), la mayor parte son sustancias nutritivas o desechos del metabolismo que se encuentran en tránsito por la sangre.

La composición de las proteínas plasmáticas es aproximadamente la siguiente: 44 % de *albúminas*, 14 % de α -*globulinas*, 11 % de β -*globulinas*, 30.4 % de γ -*globulinas* y 0.6 % de *fibrinógeno*. (Morrissey et al., 1991; Linden y Lorient, 1996). *Tabla 1.*

Las tablas siguientes muestran la composición media de las fracciones sanguíneas. *Tabla 1 y 2.*

Tabla 1. Composición de las distintas fracciones de la sangre

Componente (%)	Sangre	Plasma sanguíneo	Concentrado de células rojas	Plasma desecado	Globina desecada
Sólidos totales	18-20	8-9	28-37	96-97.5	96.5
Proteína	13-15	6-8	28-38	70-96	91-95.4
<i>Albúminas</i> (% proteínas)		44*			
<i>Globulinas</i> (% proteínas)		55.4*			
<i>Fibrinógeno</i> (% proteínas)		0.6*			
Grasa	<1	0.1-1	1	0-1.5	0
Carbohidratos	<1	<1	<1	-	-
Sales**	2	1.5	1-3	≤2	1-6
Agua	80-82	90-91	61-63	2.5-7.0	3.5

**La concentración de sales depende de la cantidad y tipo de anticoagulante empleado.

Fuentes: Ockermann y Hansen (1994)

*Linden y Lorient (1996)

*Morrissey et al. (1991)

Tabla 2. Composición de las diferentes fracciones de la sangre

Constituyentes	Sangre Entera		Suero (66 % de la sangre entera)		Plasma (60 % de la sangre entera)		Glóbulos (34 % de la sangre entera)	
• <i>Constituyentes no proteicos</i>	83		92.5		92.1		64.9	
Agua	80.8		91.2		90.8		60.8	
Sales minerales	0.9		0.8		0.8		1.1	
Lípidos	0.2		0.1		0.1		0.4	
Otras sustancias	1.1		0.4		0.4		2.6	
• <i>Constituyentes proteicos</i>	17	100 %	7.5	100 %	7.9	100 %	35.1	100 %
Globulinas	2.2	13 %	3.3	44 %	3.3	42 %	-	-
Fibrinógeno	0.3	1.7 %	-	-	0.4	5.1 %	-	-
Albúminas	2.8	16.5 %	4.2	56 %	4.2	53 %	-	-
Estroma	1.7	10 %	-	-	-	-	5.1	14.5 %
Hemoglobina	10.0	59 %	-	-	-	-	30.0	85.5 %

Fuente: Cheftel et al., 1989

2.2. Valor nutrimental de la sangre

La sangre es particularmente rica en hierro, en forma hemo, que es la forma biológica mejor utilizable. (Ockermann y Hansen, 1994) Además es una buena fuente de aminoácidos aunque es deficiente en isoleucina y pobre en metionina. (Tabla 3) por lo que puede mezclarse con proteínas que suplan estos aminoácidos; el caseinato puede ser un buen complemento.

Evaluaciones realizadas a diferentes fuentes proteicas muestran que la tasa de eficiencia de la proteína (PER) del plasma es de 2.8, siendo para la caseína de 2.5 (Young et al., 1973). El PER de la globina es de 1.0 pero si se suple con 1.2 % de isoleucina este valor aumenta a 2.9. (Ockerman y Hansen, 1994)

El valor nutrimental de las proteínas de la sangre o de sus fracciones no sólo depende de su composición inicial, las condiciones de tratamiento pueden alterar su valor intrínseco. (Linden y Lorient, 1996)

Tabla 3. Contenido de aminoácidos esenciales de la sangre de vacuno.

Aminoácido	Sangre entera	Plasma sanguíneo	Globina	*Patrón de aminoácidos esenciales ^a
Fenilalanina	7.0-8.0	5.1-5.7	7.6-8.0	2.8
Histidina	5.6	3.0-3.5	6.6-7.8	-
Isoleucina	0.4-0.9	1.0-3.4	0.2-0.3	4.2
Leucina	12.4-13.6	9.2-10.1	13.2-13.8	4.8
Lisina	9.2-9.7	6.5-9.2	9.8-10.5	4.2
Metionina	1.3-1.8	0.6-1.3	1.5-1.7	2.2
Treonina	4.7-5.2	2.6-7.1	3.8-4.1	2.8
Triptófano	1.4	0.6-1.9	1.3-2.0	1.4
Valina	8.0-9.1	6.8-7.4	9.4-9.6	4.2

(g/ 100 g de proteína)

Fuentes:

Ockermann y Hansen, 1994.

*Tybor et al., 1975.

^a FAO. Cantidades sugeridas para humanos adultos.

Como puede observarse en la *Tabla 3* los aminoácidos esenciales que se encuentran en altas cantidades en la sangre son: leucina y lisina, pero también existe una marcada deficiencia en isoleucina y metionina, lo cual no es un criterio de calidad fundamental, pues la utilización de la sangre o de alguna de sus fracciones (plasma o globina) no constituyen el único aporte proteico de un régimen alimenticio, sino más bien un ingrediente proteico utilizado en pequeñas cantidades. (Cheftel et al., 1989)

2.3. Hemoglobina

La hemoglobina que esta contenida en los hematies o eritrocitos, sirve como transportador de oxígeno en la sangre. Cuando la hemoglobina se combina con el oxígeno se forma *oxihemoglobina*, tal combinación no es una reacción de óxido-reducción, sino una fijación del oxígeno por el hierro (Fe^{2+}). Si el hierro se oxida (Fe^{3+}) se forma *metahemoglobina*, que es incapaz de transportar oxígeno. (Valdés, 1998; Rodríguez, 1986)

Esta proteína también puede combinarse con otros gases muy rápidamente, como con el monóxido de carbono para formar *carboxihemoglobina*. (Maclean, 1979; Valdés, 1998) La hemoglobina puede encontrarse en estas variantes en el organismo.

Al reducir la metahemoglobina se puede obtener nuevamente la hemoglobina, o bien se puede obtener *colehemoglobina* si la reducción es seguida de la oxidación del anillo de porfirina. Si la colehemoglobina sufre una nueva oxidación da como resultado *porfirinas libres y oxidadas*.

Cuando a la hemoglobina se le adiciona ácido caliente saturado con sal común se puede romper la asociación hemo-proteína, obteniéndose un producto modificado la *hemina* la cual es una sal férrica compleja.

2.3.1. Estructura de la hemoglobina

Los eritrocitos están compuestos en un 98 % por hemoglobina, la cual contiene del 94-96 % de globina y el 4-6 % restante corresponde al grupo

hemo. Del porcentaje total del grupo hemo el 9 % es hierro. (Autio et al., 1985a; Wismer-Pedersen, 1987)

La hemoglobina esta compuesta por cuatro cadenas, dos cadenas α y dos cadenas β , con un peso molecular de 64 450. (Morrissey et al., 1991) Cada subunidad contiene un grupo hemo en el interior de la molécula. (Hayakawa et al., 1986; Morrissey et al., 1991; Autio et al., 1984) Los cuatro péptidos de la hemoglobina forman una estructura esférica; las cadenas α y β están fuertemente asociadas por enlaces hidrógeno e iónicos, mientras que dos cadenas idénticas no tienen ningún contacto. Los cuatro núcleos hémicos están situados en la cúspide de un tetraedro.

En el enlace hemo con la globina cabe resaltar que el núcleo hémico está oculto en una cavidad hidrófoba de la globina, rodeado de numerosos residuos apolares como la leucina, valina, metionina y fenilalanina. No hay cadenas laterales de ácidos glutámico y aspártico, glutamina, asparragina, lisina o arginina en el interior de la molécula. Los residuos que tienen a la vez parte polar y parte no polar, como la treonina, la tirosina y el triptófano, están orientados de tal forma, que sus porciones no polares apuntan hacia el interior. Los únicos residuos polares en el interior de la molécula son dos histidinas. El exterior de la molécula contiene a la vez residuos polares y apolares. (Stryer, 1995) La unión heme-globina es especialmente de tipo hidrófobo. (Cheftel et al., 1989)

El átomo de hierro esta unido covalentemente con cuatro nitrogénos del anillo tetrapirrol de la protoporfirina IX. De las dos posiciones adicionales, en la quinta posición el átomo de hierro esta unido al grupo imidazol de la histidina de la globina. En la sexta posición el hierro puede estar unido con varios ligandos, como puede ser con el oxígeno que es transportado; si no se transporta oxígeno, el sexto enlace podría estar ocupado por una molécula de agua. (Maclean, 1979)

La estructura de la fracción proteica de la hemoglobina muestra diferencias en las distintas especies, consistentes en variaciones de determinados aminoácidos. La hemoglobina de cerdo es 85 % idéntica a la hemoglobina humana, los

aminoácidos idénticos entre la hemoglobina humana y la hemoglobina de cerdo son 84 % para la subunidad α y 86 % para la subunidad β . (Katz et al., 1994)

Las cadenas polipeptídicas de dos subunidades α tienen 141 aminoácidos (PM 15100), las otras dos subunidades β tienen 146 aminoácidos (PM 17200).

Aproximadamente el 70 % de las moléculas de hemoglobina están plegadas en una conformación helicoidal α . En general la hemoglobina tiene bajos niveles de isoleucina y metionina, pero altos contenidos de lisina y leucina. (Morrissey et al., 1991)

Como se ha mencionado la hemoglobina esta compuesta por cuatro cadenas individuales, las cuales no estan unidas covalentemente y pueden separarse relativamente fácil. (Ledward, 1984) La hemoglobina humana no se disocia apreciablemente a bajas concentraciones (0.2 mg/mL) a pH neutro y fuerza iónica moderada. En un rango de pH de 4.5 a 6.0, existe poca disociación de la hemoglobina, lo cual sugiere que las subunidades están unidas principalmente por fuerzas electrostáticas. (Morrissey et al., 1991) A valores de pH menores a 4.5, la hemoglobina empieza a disociarse en las unidades α y β , y a pH menor a 3; la disociación del grupo hemo es muy pronunciada. (Rossi-Fanelli et al., 1958; Hayakawa et al, 1986; Morrissey et al., 1991) La disociación de la hemoglobina también ocurre a pH's mayores a 9.5, a pH de 11 la proteína está disociada en un 50 % aproximadamente, arriba de este pH la disociación aumenta y la proteína es rápidamente desnaturalizada. La disociación y la desnaturalización son probablemente debidas a la desprotonización de los grupos básicos de los aminoácidos y la oxidación de los grupos SH. (Rossi-Fanelli et al., 1958; Morrissey et al., 1991) La globina disociada en sus subunidades α y β es menos estable que la hemoglobina nativa. (Autio et al., 1984)

2.3.2. Grupo hemo

El hemo está compuesto de dos partes, un átomo de hierro y un anillo

planar, la porfirina. (Fig. 1) La porfirina está formada de cuatro subunidades, el compuesto heterocíclico pirrol, unidas entre sí por puentes metino. (Fennema, 1993)

El hemo constituye el grupo prostético de la molécula de la hemoglobina y es más correcto denominarlo protohemo; se trata de un compuesto de coordinación muy estable de hierro y protoporfirina IX. Hay 15 posibles formas isómeras de protoporfirinas, que son debidas a la sustitución del ácido propiónico y los residuos vinilo y metilo, pero sólo la forma IX participa en la formación de hemo y es el único isómero importante en biología. El átomo de hierro del hemo se encuentra en estado ferroso (Fe^{2+}). (Maclean, 1979)

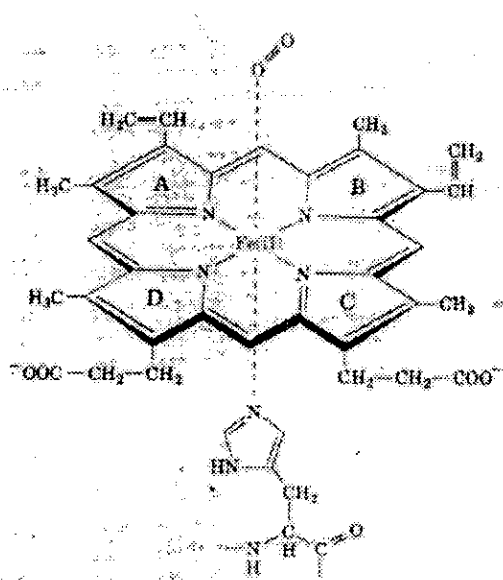


Fig.1. El hierro del grupo hemo se encuentra enlazado con el oxígeno y el grupo imidazol de la histidina.

2.3.3. Absorción en el espectro de la hemoglobina

Como todos los pigmentos de estructura tetrapirrólica, el hemo de la hemoglobina posee dos bandas de absorción en el campo visible. Una de ellas es poco intensa y presenta un máximo de absorción entre 550 y 660 nm característica del color rojo del pigmento y cuya longitud de onda de absorción máxima puede variar según el estado del hem (oxihemoglobina, metahemoglobina, etc.). La segunda banda de absorción es mucho más intensa y presenta un máximo de absorción hacia los 430 nm. En esa zona del espectro se puede apreciar, por espectrofotometría el poder colorante de la hemoglobina con gran sensibilidad. (Cheftel et al., 1989)

El análisis en el espectro en la región visible de la hemoglobina de cerdo presenta un máximo de absorción a una longitud de 405 nm para la hemoglobina (Katz et al., 1994; Zoon et al., 1990); y para la oxihemoglobina a 415 nm. (Katz et al., 1994)

2.3.4. Formación y destrucción de la hemoglobina

Los eritrocitos tienen una vida bastante limitada, por lo cual deben renovarse con frecuencia. El promedio de vida de los eritrocitos de humano es de 120 días. Como consecuencia, deben formarse continuamente en la médula ósea grandes cantidades de esas células. (Valdés, 1998) La destrucción de los eritrocitos tiene lugar en el bazo, médula ósea e hígado. La proteína se hidroliza en sus aminoácidos constituyentes y el grupo hemo se oxida para dar como productos biliverdina (tetrapirrol lineal), CO y Fe^{3+} . Posteriormente la biliverdina se reduce originando bilirrubina; el hierro obtenido en la degradación del grupo hemo es reutilizado para la síntesis de hemoglobina y los pigmentos biliares son llevados al hígado para ser excretados por el intestino gracias a la bilis. (Rodríguez, 1996; Valdés, 1998; Herrera, 1986; Stryer, 1995)

Todo el tubo digestivo tiene la capacidad de absorber hierro, pero la máxima actividad se halla en el duodeno y la parte alta del yeyuno, gracias a las óptimas condiciones de pH y potencial redox. Dicha absorción

tiene lugar en forma ferrosa, el ion férrico que forma hidróxidos insolubles a pH neutro o alcalino, debe reducirse antes de su absorción, para lo cual es indispensable un jugo gástrico ácido.

Las dificultades de reabsorción del hierro están en función de la ausencia de sustancias que favorecen dicha absorción, como el ascorbato. Así mismo de las sustancias que limitan dicha absorción, como oxalatos y fitatos. (Herrera, 1986)

2.4. Aprovechamiento de la sangre

La sangre es una importante fuente de proteína de alta calidad, sin embargo las fracciones de la sangre no han sido aprovechadas como alimento humano o como un ingrediente funcional en alimentos debido a su intenso color y sabor característico. (Morrissey et al., 1991; Zoon et al., 1990)

La sangre representa una gran proporción de la masa del animal (2.4-8 % del peso vivo, con un 6-7 % de las proteínas totales del animal; la sangre desecada puede ser hasta el 0.7 % del peso del animal vivo). Usualmente durante el desangramiento se recoge alrededor del 50 % de la sangre. El resto es retenido en el sistema capilar distribuido en el cuerpo.

En los rastros pequeños, la sangre usualmente no se aprovecha y se tira al drenaje, con ello aumenta considerablemente el riesgo de contaminaciones, ya que arrojando la sangre de esta manera se aumenta el consumo de oxígeno en los efluentes del orden de diez veces y se multiplica por tres la concentración de sólidos suspendidos. (Ockermann y Hansen, 1994; Gracey, 1989)

En algunos rastros sólo se utiliza para la alimentación humana, (como morcillas) o para usos industriales una pequeña proporción de la sangre que sobra en el rastro; el resto se emplea para la producción de piensos. (Ockermann y Hansen, 1994; Mann, 1978)

El aprovechamiento de la sangre constituye un ejemplo característico de la economía de la elaboración de subproductos, si no se utiliza puede ser

un medio adecuado para la transmisión de agentes patógenos debido a lo siguiente:

a) Se descompone con rapidez y entonces esparce malos olores y forma un medio excelente para el crecimiento de bacterias en el propio rastro o sus alrededores, perjudicando la carne al reducir seriamente sus cualidades de conservación.

b) Atrae moscas y roedores.

Sin embargo, si se somete a un proceso de elaboración puede producir ingresos considerables que contribuyan a los gastos generales del rastro o a reducir el costo de las operaciones de matanza.

La sangre contiene alrededor del 20 % de materias sólidas y por lo tanto 5 Kg de sangre fresca pueden producir 1 Kg de harina de sangre con un 12 % de humedad. (Mann, 1978)

2.4.1. Aplicaciones de la sangre

La sangre de los animales tiene muchas posibilidades de empleo en los alimentos, en piensos, en laboratorios, en usos médicos, como producto industrial y como fertilizante.

Tabla 4. Usos de la sangre

<i>Alimentos</i>	Aditivo de color, componente nutricional.
<i>Piensos</i>	Suplemento de lisina, sustituto de leche, componente nutricional.
<i>Fertilizantes</i>	Revestimiento de semillas, estabilizante del pH del suelo, componentes minerales.
<i>Laboratorio</i>	Medios de cultivo, carbón activo, hemina agar sangre, peptonas, albúminas, globulinas, catalasa.
<i>Medicina</i>	Pruebas de aglutinación, inmunoglobulinas, factores de coagulación, fibrinógeno, productos de fibrina, plasminógeno, aditivos de plasma.
<i>Industria</i>	Adhesivos, hormigón poroso, sustituto de clara de huevo, extintores de incendios.

Fuente: Ockermann y Hansen, 1994

2.4.2. Utilización de la sangre en la industria alimentaria

La sangre de los animales se aprovecha como colorante cárnico (especialmente en productos a base de pollo). La albúmina de la sangre se ha utilizado como sustituto de la albúmina de huevo en los alimentos, se emplea en la fabricación de embutidos y en la elaboración de pan.

La adición de la sangre en cantidades superiores a un pequeño porcentaje en productos cárnicos hace que se pongan demasiado oscuros y sean poco apetecibles. Si sólo se aprovecha el plasma se desperdicia una gran proporción de proteínas cárnicas.

La mayor parte de la sangre se utiliza en la fabricación de piensos para animales en forma de harina de sangre, como suplemento proteico.

Actualmente se han desarrollado nuevas técnicas para aprovechar este producto rico en proteínas (18 %). Formas simples de aprovechamiento son desecarla para elaborar harina de sangre o mezclarla antes con restos de carne y huesos y desecarla, consiguiendo harinas de sangre y huesos. Sin embargo, así se degrada el valor de la sangre, que no se aprovecha para consumo humano directo, y se reduce el valor biológico de las proteínas. Aunque añadiendo la sangre a las harinas de carne se aumenta el % de lisina, mejorando el valor biológico para los animales.

En algunos casos, el color rojo intenso de la sangre se considera una característica deseable y la sangre se ha empleado en pequeñas cantidades como aditivo para darle color a los productos cárnicos. Situación que es particularmente útil en los países que no están permitidos los colorantes rojos artificiales. (Ockermann y Hansen, 1994)

2.4.3. La sangre en rastros del D.F. y zona conurbada

La Confederación Nacional Ganadera (C.N.G) publicó en 1995 que la cantidad de sangre producida en México en el año 1994, fue de 192 000 Ton la cual contiene aproximadamente 40 000 Ton de proteína. (Tabla 5)

Tabla 5. Estimación del volumen de sangre obtenida en base a la producción de carne

Especie en Pie	Producción en toneladas	Sangre por cada 1000 kg de peso vivo (kg)		Cantidad de sangre Total (kg)		Litros de sangre Total	
		Min.	Máx.	Min.	Máx.	Min.	Máx.
Bovino	2,555,509	32.6	33.7	83,309,593	86,120,593	66,443,234	67,720,989
Porcino	1,212,676	29.2	35.1	35,410,139	42,564,928	27,891,548	33,954,928
Ovino	69,653	24.8	31.5	1,727,394	2,194,070	1,393,060	1,741,325
Caprino	83,567	24.8	31.5	2,072,462	2,632,361	1,671,340	2,089,175
Ave	1,396,419	42.1		58,789,240	58,789,240	44,685,408	44,685,408
Suma	5,317,824			181,308,828	192,301,252	142,084,590	150,191,825

Fuentes:

Confederación Nacional Ganadera (1995)
Ockerman y Hansen (1994)

En la zona conurbada al D.F. existen 11 rastros donde generalmente la sangre es tirada al drenaje, ocasionando la pérdida de grandes cantidades de proteína, además de ser una fuente de contaminación importante.

Un estudio realizado por el Servicio Nacional de Investigación de Mercados dependiente de la Secretaría de Comercio, reveló que los once rastros que existen en la zona conurbada al D. F. sacrificaron en los primeros ocho meses de 1997, alrededor de 157 000 cerdos y más de 33 000 bovinos, con estos datos se observa que la escala de los rastros es pequeña. (*Tabla 6*) Durante este mismo período se solicitó información sobre el destino de la sangre, dando respuestas ambiguas en la mayoría de los casos y en otros sólo reportaron la producción de harinas o morcillas.

De lo anterior se puede decir que el aprovechamiento de la sangre en México, consiste básicamente en la producción de harina de sangre o morcillas por procesos artesanales que permiten la industrialización de volúmenes pequeños, pero estos productos sólo utilizan una pequeña cantidad de la producción de sangre; debido a que difícilmente un rastro podría obtener las cantidades suficientes de sangre para utilizar procesos más modernos como centrifugación, ultrafiltración, ósmosis inversa, evaporación, lecho fluidizado, secado por aspersión, entre otros, que permitieran la obtención de productos de mayor valor agregado, pero con los volúmenes manejados en estos rastros estas operaciones resultan incosteables. (Valdés, 1998)

Tabla 6. Cantidad de sangre de cerdo y de bovino en rastros de la zona conurbana del D.F.

Rastros	Sacrificio Promedio Ene-Agos. 1997 Cerdos	Litros de Sangre Mensual Cerdos	Litros de Sangre Diarios Cerdos	Sacrificio Promedio Ene-Agos. 1997 Bovinos	Litros de Sangre Mensual Bovinos	Litros de sangre diarios Bovinos
Cuautitlán	75428	226283	7543	-	-	-
Arcos	19628	58884	1963	2470	27167	906
Tlalnepantla	7504	22512	750	1909	20999	700
Cerro Gordo	8276	24827	828	2153	23683	789
Temamatla	4247	12741	425	2884	32827	1094
Ecatepec	7283	21848	728	1936	21299	710
Naucalpan	7179	21536	718	7197	79163	2639
Muñora	5342	16026	534	-	-	-
La Paz	5826	17478	583	6190	68089	2270
Neza	8860	26578	886	4162	45778	1526
Atizapan	7701	23104	770	4162	45778	1526
Suma	157274	471817	15728	33163	364783	12160

Fuente: Servicio Nacional de Información de Mercados.

2.5. Industrialización de la sangre

2.5.1. Recolección de la sangre

La sangre extraída de los animales sanos es estéril y si se recoge en condiciones sanitarias puede emplearse para consumo humano. (Ockermann y Hansen, 1994) La sangre que va ser utilizada como alimento humano no deberá estar contaminada con contenido estomacal, orina u otra sustancia extraña, igualmente deberá proceder de animales sanos que hayan pasado la inspección veterinaria. Si un animal se decomisa, su sangre también deberá ser decomisada.

La sangre es un producto demasiado valioso para desecharlo. La sangría higiénica con fines comestibles, se realiza con cuchillo hueco de acero inoxidable (*Fig 2*); el cual consta de un mango tubular con una placa deflectora y dos hojas con un ángulo recto entre ellas. Esta combinado con un tubo que dispensa anticoagulante.(Gracey, 1989) Para recoger la sangre de los cerdos el cuchillo se inserta en la zona arterial del cuello, la cual se sanitiza previamente. (Ockermann y Hansen, 1994; Gracey, 1989; Piäna et al., 1994)

En los rastros de pequeña capacidad se utilizan recipientes individuales para recoger la sangre, cuando se procesan muchos animales y a un ritmo de sacrificio rápido pueden utilizarse varios cuchillos para la sangría (hasta 14) conectados a un "carrusel" que gira sincrónicamente con el sistema de transporte. Debe contarse con todo lo necesario para esterilizar de forma rutinaria los cuchillos; el personal para realizar estas operaciones adicionales deberá mantener estrictas medidas de higiene. (Gracey, 1989)

También se puede utilizar para la recolección aséptica un trocar unido a un tanque con un vacío ligero (Cheffel et al., 1989); con la desventaja de que el vacío puede colapsar los vasos sanguíneos, bloqueando la salida de la sangre, por lo que su uso es limitado. (Valdés, 1998)

La sangre autorizada tiene que enfriarse a 2 °C para evitar el desarrollo microbiano y después almacenarse en recipientes herméticos. La sangre se almacena normalmente entre 0 y 2 °C y es posible conservarla de 4 a 6 días. Si no se siguen estrictas medidas de higiene, la sangre puede

presentar una contaminación de 2.5×10^5 microorganismos por mL, cuyo número puede aumentar rápidamente durante el almacenamiento. (Ockermann y Hansen, 1994)

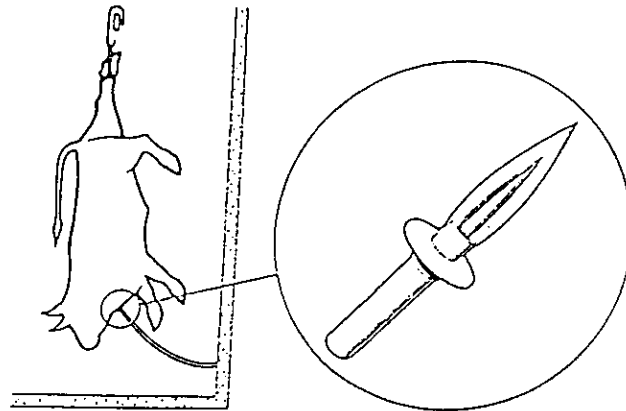


Fig. 2. Cuchillo hueco de acero inoxidable para la recolección de la sangre.

Fuente: Ockermann y Hansen, 1994

2.5.2. Anticoagulantes

La sangre se coagula entre 3 y 10 minutos después de su exposición al aire, dependiendo de la temperatura ambiente, la reacción fundamental en la coagulación de la sangre es la conversión del fibrinógeno, proteína soluble del plasma, en fibrina insoluble (polímero). La conversión del fibrinógeno en fibrina es catalizada por la trombina, la cual se forma a partir de su precursor circulante en el plasma, la protrombina. Cuando se deja sedimentar la fibrina, se contrae y absorbe la mayoría de los glóbulos rojos y blancos, emitiendo un líquido amarillento llamado suero. (Ockermann y Hansen, 1994; Mann, 1978; Cheftel et al., 1989)

Los anticoagulantes más comunes son el citrato trisódico y el ácido cítrico, a una concentración del 0.2 %. También se ha empleado como anticoagulante una mezcla de fosfatos (22 % de ortofosfato, 22 % de difosfato tetrasódico, 16 % de difosfato disódico y 40 % de cloruro sódico).

Esta mezcla se utiliza a razón de 10 g/L de sangre. También se han empleado ocasionalmente la heparina y los oxalatos.

Los anticoagulantes actúan en virtud de diversos mecanismos de acción. La heparina es el componente natural de la sangre que previene la coagulación en el animal vivo. El mecanismo de acción de oxalato es precipitar el calcio necesario para la coagulación. Aunque no se utiliza cuando la sangre es para consumo humano debido a que es venenoso.

El citrato sódico convierte el calcio en formas no ionizadas, previniendo la coagulación. El ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) se emplea en dosis de 2 g/L de sangre y actúa como quelante del calcio. En lugar de los anticoagulantes se han empleado enzimas proteolíticas para conseguir proteínas de alta calidad con una concentración reducida de cenizas. El efecto anticoagulante es debido a su actividad proteolítica sobre la fibrina. El enfriamiento rápido de la sangre a 1-2 °C evita la coagulación sin necesidad de anticoagulantes, pero la sangre se coagula cuando se eleva la temperatura. (Ockermann y Hansen, 1994)

2.5.3. Fraccionamiento

La sangre aprobada pasa a una centrifuga en la que se separa el plasma de los eritrocitos (la densidad del plasma es de 1.019-1.029, la de los corpúsculos 1.084-1.098 y la de la sangre total es 1.042-1.056.) (Ockermann y Hansen, 1994) Al centrifugar la sangre y separar sus fracciones, se puede realizar una valorización más interesante de sus proteínas. (Linden y Lorient, 1996) Cuando el plasma es separado de la sangre aproximadamente el 80 % del total de la proteínas permanece en la fracción celular. (Autio et al., 1985b)

Durante el procesado es importante prevenir la hemólisis o ruptura de las membranas de los hematíes. Este fenómeno tiene lugar cuando los hematíes entran en contacto con soluciones de menor presión osmótica que determinan la absorción de agua y el estallido del glóbulo. También producen hemólisis la presencia de grasa, que disuelve las membranas

celulares, las variaciones súbitas de temperatura y una congelación inadecuada. (Gracey, 1989)

Cuando las fracciones de sangre se quieren conservar por largos períodos de tiempo hay que desecarlas o congelarlas.

Cuando la sangre se deseca hay que cuidar que la desnaturalización proteica sea mínima, ya que si no se reduce la calidad de la fracción desecada. (Ockermann y Hansen, 1994)

2.5.4. Utilización del plasma

El plasma porcino es de color grisáceo o rosado. El color más oscuro es debido a la hemoglobina, como consecuencia de una separación incompleta o debido a la ruptura de los eritrocitos. (Ockermann y Hansen, 1994)

El plasma sanguíneo se conserva de 0 a 5 °C como máximo entre 4 y 6 días; el plasma sanguíneo salado (3-4 % de NaCl) se conserva a 0 °C hasta 10 días; agregando ácido carbónico se prolonga la capacidad de conservación, pudiendo alcanzar hasta tres semanas o más. Otra manera de conservarlo es mediante congelación, con lo cual puede durar largo tiempo, y por último, la desecación puede ser otra opción que amplíe la vida de anaquel de este producto. (Piña et al., 1994).

El plasma obtenido por desecación, primero se concentra y después se deseca; recientemente se ha concentrado pasando el fluido a presión sobre filtros o membranas de plástico (ósmosis inversa), pero lo más común es la concentración por evaporación; o bien el plasma concentrado puede desecarse por atomización o en lecho fluidizado. Este último sistema es generalmente más económico que un sistema de atomización.

También existe una nueva forma de industrialización propuesta en 1998 (Pérez-Gavilán E. y Valdés R.) la cual tiene la ventaja de ser un método que puede utilizarse para procesar pequeñas cantidades de plasma, sin la necesidad de un equipo demasiado costoso, lo cual lo hace factible para ser utilizado en rastros pequeños como los que existen en México. En el proceso el plasma de la sangre es coagulado y conservado con ácido

acético y CO₂, el producto presenta una amplia vida de anaquel y características aceptables para utilizarse como aditivo en productos alimenticios para humano.

El plasma en polvo se utiliza principalmente en embutidos, especialmente en salchichas. (Parés et al., 1998; Caldironi y Ockerman, 1982; Autio et al., 1985a; Autio y Mietsch, 1990) Otro empleo del plasma se refiere a la sustitución de la albúmina de huevo en panadería, debido a su gran capacidad espumante. (Ockerman y Hansen, 1994) El plasma sanguíneo también puede incorporarse diluido en las salmueras inyectadas a las piezas de carne sólidas. (Ockermann y Hansen, 1994) También se ha planteado la utilización de plasma en la fortificación de pastas alimenticias (Hinojosa y López, 1981) y se ha evaluado la posibilidad de utilizar el plasma en la fabricación de quesos de imitación (Liu et al., 1996); además en 1998 (Pérez-Gavilán E. y Valdés R.) utilizaron plasma coagulado en la fabricación de queso tipo Manchego, el cual al ser evaluado por un panel sensorial presentó buenas características.

2.5.5. Utilización del paquete globular

La fracción paquete globular tiene aproximadamente un 35 % de sólidos y se puede desecar sin concentrar previamente.

Como se ha mencionado la mayor cantidad de proteínas de la sangre se encuentra en la fracción del paquete globular, específicamente en la hemoglobina de los eritrocitos. El paquete globular induce un color demasiado oscuro, indeseable si se incorpora a los alimentos en una proporción superior al 1 %. (Ockermann y Hansen, 1994) Uno de los usos del paquete globular está ligado tradicionalmente a productos de color oscuro como las morcillas, embutidos de sangre o pasteles de sangre. Sin embargo, la demanda de este tipo de productos es muy limitada y sólo se puede destinar a estos productos una pequeña proporción de la hemoglobina. (Ockermann y Hansen, 1994; Gracey, 1989)

El paquete globular desecado se usa generalmente en la alimentación animal, principalmente en dietas para animales monogástricos. Es recomendado en alimentos preiniciadores e iniciadores para cerdos como una fuente proteínica de alta digestibilidad y elevada aportación de lisina y treonina, le ofrece una gran palatabilidad al alimento preiniciador, generalmente se recomiendan contenidos entre el 2 y 4 % en estos alimentos.

De la misma manera es utilizado en la formulación de alimentos para pollo de engorda o gallina de postura, como fuente de aminoácidos esenciales.

En los rumiantes se utiliza como proteína no fermentable en el rumen por lo cual cubre necesidades de este tipo de proteína en los bovinos de engorda y principalmente en vacas lecheras de alta producción. (Valdés, 1998)

2.6. Métodos de decoloración de la hemoglobina

La hemoglobina no es utilizada en la industria de los alimentos por su desagradable color. Para reducir el color oscuro se han propuesto diversas alternativas, entre las que destacan: la estabilización del color, el enmascaramiento del color o la decoloración.

En la **estabilización**, se han ensayado numerosas sustancias reductoras para estabilizar el color rojo intenso de la sangre fresca, con el fin de utilizar la hemoglobina como colorante (en salazones por ejemplo). Los ensayos realizados han mostrado que reductores suaves tales como el ácido ascórbico lo más que consiguen es retardar la oxidación de la hemoglobina y solamente compuestos como el óxido de carbono o los nitritos dan con la hemoglobina combinaciones estables. La hemoglobina estabilizada por nitrosilación podría servir también para dar color a productos análogos a la carne preparados a partir de proteínas vegetales texturizadas. (Cheftel et al., 1989)

En el **enmascaramiento** del color, se propone utilizar la sangre o el paquete globular y hacer mezclas con leche descremada a 95 °C en presencia de CaCl₂. Se obtiene un precipitado proteico que puede ser

empleado para reemplazar hasta el 15 % de la carne de vaca en salchichas. En cuanto a las técnicas de **decoloración** de la sangre todas tienen por principio el permitir la ruptura del enlace hemo-proteína de la molécula de hemoglobina y la separación de estas dos fracciones.

Según las técnicas consideradas, la ruptura del enlace puede obtenerse por vía química o enzimática; la separación de las fracciones está basada en su diferencia de masa molecular, o en la solubilidad diferencial en los solventes empleados. Se han propuesto varios procedimientos, pero ninguno de ellos parece verdaderamente haber alcanzado la escala industrial. (Linden y Lorient, 1996)

Los procedimientos que se han propuesto son los siguientes:

Precipitación del grupo hemo con carboximetil celulosa (CMC)

Sato et al., (1981) desarrollaron un método para la preparación de globina usando carboximetilcelulosa en cromatografía en columna, pero este método no es aplicable en tecnología a gran escala. (Autio et al., 1985b) Por lo que en 1983, Autio et al. modificaron el proceso con CMC.

Según Autio et al. (1985b) el paquete globular se separa del plasma por centrifugación, se hemoliza el paquete con agua destilada y se adiciona ácido clorhídrico, hasta obtener un pH menor de 3 para romper los enlaces entre la globina y el hemo. Se agrega una solución de carboximetilcelulosa (CMC) con una concentración que va de 0.06 a 0.35 %, para obtenerse un precipitado de color café oscuro (complejo hem-CMC) que puede separarse de la solución de globina por medio de centrifugación a 8 000 x g, en un período de tiempo que puede ser desde 30 min hasta 178 h. En esta patente no se especifica la calidad del producto obtenido y en la metodología donde se emplea cromatografía en columna la solución de globina obtenida es incolora.

Precipitación del grupo hemo con carboximetil celulosa (CMC) y efecto de la temperatura

Las interacciones CMC-hemo y proteína-hemo son competitivas a pH bajo; al desnaturalizar la proteína por medio de un tratamiento térmico las interacciones hemo-proteína se debilitan y se incrementa la interacción de la CMC con el grupo prostético, por lo que se puede decolorar de una manera más eficiente. Por esto en 1986, Hayakawa et al. propusieron el siguiente método:

La hemoglobina se disuelve en agua destilada (5 g/100 mL), ajustando el pH a un valor inicial de 1.50 con HCl 1N y calentando la solución a 77 °C por 10 min. Posteriormente se mezcla la solución de hemoglobina con un volumen equivalente de solución de CMC al 0.72 %, se ajusta inmediatamente el pH final a 2.25. Después se agita por 30 min a 20 °C y se centrifuga la mezcla a 1000 x g por 10 min. El sobrenadante corresponde a la solución de globina. (Hayakawa et al., 1986)

Precipitación del grupo hemo con Alginato de sodio

Se ha sugerido que la mayoría de los iones metálicos divalentes forman complejos con alginatos; además se ha encontrado que la capacidad de intercambio del ion del ácido algínico es cuatro veces mayor que de la carboximetil celulosa. Por lo anterior en 1990, Zoon et al. propusieron un método para la precipitación del grupo hemo de la hemoglobina, con alginato de sodio, el método consiste en lo siguiente:

La hemoglobina es disuelta en agua desionizada hasta obtener una concentración de 0.3 % y ser usada como una solución stock. También se prepararon soluciones de alginato de sodio y cloruro de sodio, ambas a una concentración de 2.5 % p/v, las cuales son adicionadas a 20 mL de solución de hemoglobina hasta obtener una concentración de 0.107 % y 0.348 % respectivamente en la solución final, a la cual se le ajustó el pH a 2.25. El volumen final es ajustado a 25 mL con agua desionizada. Los experimentos de precipitación se realizaron a 20 °C, con agitación constante

por 20 min y posterior centrifugación a 5000 x g por 15 min, con lo que se obtuvo una porción sobrenadante la cual correspondió a la proteína en solución. El pH fue ajustado con soluciones de HCl y/o NaOH (0.5N).

Precipitación de la globina con acetona ácida

El más popular proceso para la separación de la hemoglobina en sus fracciones grupo hemo y globina es el método de acetona ácida; (Rossi-Fanelli et al., 1958) en 1975 Tybor et al., desarrollaron un proceso continuo a nivel planta piloto para la decoloración de la globina utilizando este solvente, (Zoon et al., 1990) aunque también se ha precipitado la globina con etanol. (Autio et al., 1984)

Las cadenas globulares de las proteínas precipitan debido a la desnaturalización de las moléculas, siendo la acetona más efectiva que el alcohol. (Ockermann y Hansen, 1994)

El proceso a nivel piloto para la preparación de globina de Tybor et al. (1973, 1975) es el siguiente:

La sangre entera fue recolectada del rastro y se mezcló con una solución de NaCl al 0.85 % y citrato de sodio al 0.02 % para evitar la coagulación. La mezcla fue mantenida a 5 °C y separada después de 24 horas, en plasma y paquete globular. El plasma se secó por spray y el paquete globular se hemolizó hipotónicamente, para lo cual el paquete celular se diluyó 1:1 con agua y se adicionó cloroformo a la solución de hemoglobina (1:4/v/v) para remover los estromas los cuales fueron eliminados de la suspensión por decantación de la proteína sobrenadante. Enseguida se adicionó el ácido ascórbico a la solución de hemoglobina hasta alcanzar un pH de 4 y se mezcló a alta velocidad. Un volumen de la solución de proteína se mezcló gradualmente con 4 volúmenes de acetona acidificada con HCl al 1 % y se agitó severamente por unos minutos para remover el grupo hemo y precipitar la proteína. La proteína se recolectó por filtración a través de tela de muselina y se lavó continuamente con acetona acidificada

hasta obtener un precipitado casi blanco. (Tybor et al., 1973 y 1975; Rossi-Fanelli et al., 1958)

Algunos investigadores comienzan el proceso de decoloración transformando la hemoglobina del paquete globular en colemoglobina bajo la acción del ácido ascórbico antes de realizar la extracción con acetona ácida; otros han propuesto concentrar la solución de hemoglobina precipitando con NaCl antes del tratamiento con el solvente para reducir el volumen del mismo. Sin embargo, este método ya antiguo no se ha extendido, probablemente por la cantidad de solvente necesario y por los problemas de seguridad alimentaria planteados por la utilización de tales productos, pero también sin duda a causa del sabor y olor más bien desagradable del producto obtenido. (Linden y Lorient, 1996; Ockermann y Hansen, 1994)

Este método resulta muy eficiente, pero la aplicación de métodos que utilizan solventes en tecnología a gran escala resultan demasiado costosos por el uso y la regeneración de estos compuestos. Además los solventes utilizados son altamente inflamables y la remoción de los residuos del solvente del producto final viene a ser una dificultad. (Autio et al., 1985b; Zoon et al., 1990; Ockermann y Hansen, 1994) Otras sustancias que se han usado para este propósito además de la acetona son: metil etil cetona, dimetil formamida (Autio et al., 1985b) y como se ha mencionado el etanol.

Hidrólisis enzimática

Novo Nordisk ha propuesto un método basado en la precipitación del grupo hemo después de una hidrólisis enzimática parcial de la hemoglobina con una proteasa bacteriana alcalina cuyo nombre comercial es Alcalase® 2.4L, el método es el siguiente:

Inmediatamente después de recolectar la sangre debe añadirse un agente anticoagulante. La sangre puede separarse por centrifugación en sus fracciones plasma y paquete globular. Después de la separación, la fracción celular se diluye con agua en una proporción de 1:3, lo que ocasiona una

hemólisis rápida. Posteriormente la hidrólisis se efectúa a un pH de 8.5 con Alcalase® 2.4L al 1.0 % p/p. La hidrólisis se realiza bajo condiciones controladas, hasta obtener un grado de hidrólisis (GH) de un 18 a 20 %. La proteasa bacteriana es producida por *Bacillus licheniformis* y actúa como endopeptidasa.

La hidrólisis se termina añadiendo ácido clorhídrico hasta pH de 4.0 y la mezcla se deja reposar durante 30 min para inactivar la enzima. Puede separarse el hidrolizado de las células sanguíneas y un residuo de color negro que contiene el grupo hemo. Después de la separación el hidrolizado de las células sanguíneas (HCS) se purifica y se puede adicionar carbón activado para perfeccionar el color y el sabor, y por último se neutraliza hasta alcanzar un pH de 6.5 a 7.0. (Novo Nordsisk, S/A)

El método enzimático proporciona un sabor amargo de la fracción hidrolizada de los eritrocitos el cual puede ser eliminado con carbón activado o con ácidos fuertes como el clorhídrico. (Ockermann y Hansen, 1994) El sabor de la proteína es afectado, por la hidrólisis, la tendencia a adquirir el sabor amargo depende del grado de hidrólisis pero también de la estructura de los péptidos producidos. (Novo Nordisk, 1995) El valor nutritivo de los productos hidrolizados puede resultar considerablemente reducido como consecuencia de la destrucción del triptófano, además el contenido de cenizas suele ser elevado. (Ockermann y Hansen, 1994)

La degradación de las proteínas por vía enzimática incrementa la solubilidad de la proteína, además de afectar otras propiedades funcionales como la capacidad emulsificante, espumante, viscosidad, gelificación, y capacidad de retención de agua. (Novo Nordisk, 1995; Cheffel et al., 1989)

Oxidación del grupo hemo

La decoloración de la hemoglobina se puede realizar o se puede obtener por la destrucción oxidativa de la molécula del grupo hemo. El peróxido de hidrógeno es muy eficiente para destruir la molécula del hemo pero cuando

los eritrocitos están como material crudo en la hemoglobina están protegidos del impacto del peróxido de hidrógeno por la actividad de la catalasa. Por lo que la inactivación de la catalasa es un prerrequisito para la decoloración. La actividad de la catalasa puede ser inactivada completamente a altas temperaturas, pero la hemoglobina decolorada esta completamente coagulada y pierde sus propiedades funcionales. La catalasa también se inactiva en una solución ácida, a un pH de 2 a 4.5. (Wismer-Pedersen,1987)

El procedimiento para la decoloración de la sangre por oxidación del grupo hemo según Wismer-Pedersen, es el siguiente:

Los eritrocitos se diluyen con agua hasta tener una concentración de proteína de aproximadamente 7 %; mientras se agita, se adiciona lentamente HCl 4 N hasta tener un pH de 2.5. Después de 20 min la solución se centrifuga a 18 000 x g durante 20 min. El pH del sobrenadante se ajusta de 4 a 5 con la adición de NaOH 2 N, también se agrega una solución de peróxido de hidrógeno al 35 % hasta obtener una concentración de 0.3 %. La solución se incuba a 20 °C, por 20 horas aproximadamente. Después de la incubación el pH de la solución se ajusta a 5 y el aislado de la proteína se seca por liofilización. En algunos experimentos el peróxido de hidrógeno residual se elimina por adición de ácido ascórbico.

Otra forma de decolorar la hemoglobina con peróxido de hidrógeno sugiere hemolizar los eritrocitos con 7 volúmenes de agua y calentar de 50 a 70 °C. Se añade entonces una solución de peróxido de hidrógeno al 3 % que oxida la hemoglobina a metahemoglobina prácticamente incolora o ligeramente verdosa. Una vez completa la reacción la temperatura se reduce a 30 °C y el exceso de peróxido de hidrógeno se elimina con la catalasa; las proteínas decoloradas precipitan en forma de pequeñas esferas que se recogen por filtración.(Ockermann y Hansen, 1994; Wismer- Pedersen, 1987; Linden y Lorient, 1996) El material resultante es prácticamente insípido e insoluble en agua; (Ockermann y Hansen,1994; Linden y Lorient. 1996).

Cuando este material se añade a los embutidos se comporta como un ingrediente inerte, haciendo que los productos sean más blandos y modificando el color desde el tono rosado original a un color marrón o incluso amarillento si se añade a nivel del 10 %. Si se agrega en concentraciones del 1-1.5 %, el sabor y la textura de los embutidos se modifica sólo ligeramente. (Ockermann y Hansen, 1994)

La proteína obtenida por este método puede ser utilizada para aumentar el valor nutricional en algunos productos cárnicos. (Linden y Lorient, 1996)

Cabe hacer la aclaración que el hierro presente no es eliminado, sino sólo cambia su estado de oxidación, efecto que más que benéfico parece resultar problemático. (Rodríguez, 1986)

De los métodos que existen para la decoloración de la hemoglobina, se puede decir que: los procedimientos químicos bajan la solubilidad al pH isoelectrico, pero mantienen las propiedades funcionales, mientras que la decoloración por vía enzimática tiene efectos inversos; (Cheftel et al., 1989) la eliminación del grupo hemo reduce la estabilidad de la proteína globular, que en consecuencia es mucho más sensible a los agentes desnaturizantes y al calor; además esta eliminación o el blanqueo del grupo prostético produce una proteína menos satisfactoria desde el punto de vista nutritivo, reduciéndose el valor biológico y la utilización neta de la proteína. Este fenómeno es menos grave en las globinas decoloradas que en los productos en que se elimina el grupo hemo. (Ockermann y Hansen, 1994)

2.6.1. Propiedades funcionales de la globina

Solubilidad

La solubilidad se ve influenciada notablemente por el pH, obteniéndose la solubilidad mínima en el rango de pH de 7-9. (Tybor et al., 1973 y 1975; Hayakawa et al., 1982; Autio et al. 1984; Shahidi et al., 1984)

La globina es soluble al 10 % en la región del punto isoelectrico (pH 7-9), siendo la hemoglobina soluble al o en un 80 % en ese rango de pH. La

poca solubilidad de la globina a esos pH's ha sido atribuida a la interacción entre grupos hidrófobos exhibidos por la remoción del grupo del hemo. (Morrissey et al., 1991).

Autio et al. (1984) compararon las curvas de solubilidad contra pH, de la globina preparada por el método de cromatografía con CMC con la globina preparada por precipitación con acetona. Ambas preparaciones presentaron una solubilidad mínima a pH 8. Sin embargo, la globina preparada por el método de la acetona era más soluble a pH neutro. Esta diferencia se atribuyó a que la globina preparada por el método de CMC, contenía mayor cantidad de sal, encontrándose que la adición de sal disminuye la solubilidad de la globina en todos los valores del pH. (Autio et al., 1984)

Tybor et al., 1975 reportaron que ninguna temperatura de secado ni la incorporación de la lactosa antes del secado tienen un efecto significativo en la solubilidad de la globina, mientras que Hayakawa et al., (1982) encontraron que la globina seguía siendo altamente soluble (aproximadamente 100 %) cuando se calentaba por encima de 100 °C a un pH menor a 5. Sin embargo, la solubilidad de la globina sometida a tratamiento térmico disminuye en un rango de pH de 5 a 8. (Morrissey et al., 1991)

Propiedades de hidratación

No se han informado estudios fundamentales de las propiedades de hidratación de la globina. Sin embargo, se han usado métodos empíricos para determinar la capacidad de retención agua, (Autio et al., 1984; Shahidi et al., 1984) y se ha encontrado que esta propiedad es mayor en la globina con respecto a la proteína de soya, lactoalbúmina y gluteína (Autio et al., 1984). La capacidad de retención de agua disminuye calentando a temperaturas > 60 °C, al incrementar el pH (sobretudo a valores de pH superiores a 6) y al aumentar la fuerza iónica; por lo tanto la adición de NaCl reduce esta capacidad, especialmente a concentraciones de sal > 0.2 M. (Autio et al., 1984; Morrissey et al., 1991)

Viscosidad

La viscosidad aparente de la globina es altamente dependiente de la temperatura y del pH en un rango de 5 a 6. (Hayakawa et al., 1982) A pH de 5.7-5.8, la viscosidad aparente de una solución de globina incrementa ligeramente al calentarla a 55 °C, alcanzando su máximo a 60 °C y disminuye al aumentar la temperatura. Sin embargo, se observó un gran aumento en la viscosidad cuando una solución de globina al 1 % se calienta por arriba de 80 °C (alcanzando su máximo a 95 °C) en un estrecho rango de pH 5.2-5.4. (Hayakawa et al., 1982) Lo anterior fue confirmado por Autio et al. (1984) quienes no observaron cambio alguno en la viscosidad como función de la temperatura a pH's menores a 5 y mayores de 6. Sin embargo, observaron un aumento excesivo en la viscosidad cuando soluciones al 5 % de globina a pH's de 5.2 a 5.8, se calentaron a 95 °C. Bajo estas mismas condiciones pero con la adición de NaCl 0.2 M la viscosidad aparente fue casi nula. (Autio et al., 1984)

Hayakawa et al. (1982) midieron la viscosidad de la globina y observaron que aumentó dramáticamente cuando la proteína se calentaba por arriba de 80 °C y mostraron la marcada dependencia de la concentración a 90 °C. La viscosidad intrínseca aumentó de 10 mL /g a 60 °C a 60 mL /g a 80 °C. El cambio en viscosidad coincidió con la transición de las partículas globulares ($PM = 8 \times 10^5$) a 60 °C a los agregados globulares ($PM = 10^8$) a los 80 °C. Hayakawa et al. (1983) especularon que la asociación por el calentamiento de la globina ocurre debido al desplegamiento de las moléculas de la globina nativa que espontáneamente forman agregados globulares que se extienden y se asocian para formar fibras de macroagregados y finalmente una matriz de gel.

Gelatinización

Se ha considerado que las soluciones de globina calentadas no gelifican. (Morrissey et al., 1991) Sin embargo, la globina preparada por el método de Sato et al., (1981) forma un gel transparente a concentraciones > 3 %, a un pH aproximado de 5, cuando se calienta a 80 °C. (Hayakawa et al., 1982;

Morrissey et al., 1991) Por esto se ha sugerido que a altas concentraciones de globina, se forman geles debido a un enredo de fibras, que forman macroagregados. Las propiedades de gelificación de la globina han sido estudiadas por Autio et al., (1984 y 1985a) La fuerza de los geles incrementa al aumentar la temperatura (60-95 °C) y la concentración de proteína (1.4-5.0 %) en un pH de 5.4 a 6.4 y en ausencia de NaCl. El pH de gelificación es dependiente de la concentración de proteína y de sal. Los geles que se prepararon con soluciones al 2 % y 4 % de proteína, sin adición de NaCl presentan una fuerza máxima a pH's de 6.2 y 5.2, respectivamente. (Morrissey et al., 1991)

Se ha reportado que la globina preparada por el método de acetona acidificada no forma geles después del calentamiento. Aunque también, se ha reportado que la globina preparada de acuerdo a este método puede formar geles a altas concentraciones de globina (7 %) (Liu et al., 1996)

En el Instituto Nacional de Investigación sobre Alimentos de Japón, se estudiaron las propiedades de agregados de hidrolizados de globina obtenida por el método de Tybor; la hidrólisis de la proteína fue realizada mediante el calentamiento a 95 °C por 15 minutos y la adición de 0.8 M de ácido cítrico. En estudios anteriores, se había encontrado que los agregados de globina tienen mayor solubilidad y mejor capacidad para la formación de geles que la globina sin hidrolizar. Estos resultados también sugieren que la hidrólisis ácida es un método eficiente para modificar y dar nuevas propiedades funcionales a la proteína. (Liu et al., 1996)

Propiedades espumantes

La capacidad espumante de la globina es mayor a la de la albúmina de huevo y tiene un máximo a pH 6 y a una concentración de la globina de 1.7 % p/v. (Tybor et al., 1975) Al parecer la estabilidad de la espuma de la globina tiene un máximo a pH de 6 a 8 y es comparable con la de albúmina de huevo. (Morrissey et al., 1991; Shahidi et al., 1984) Rodríguez, P. en 1986, también se encontró que la globina de bovino aislada por el método de acetona ácida

es un excelente agente espumante.

Propiedades emulsificantes

La capacidad emulsificante (CE) es definida como la máxima cantidad de aceite que puede emulsificar una proteína bajo condiciones establecidas.

La globina tiene mayor capacidad emulsificante que el concentrado de proteína de soya, el harina de semilla de algodón o la leche en polvo descremada; pero menor que el plasma (Morrissey et al., 1991; Nakamura et al., 1984) En emulsiones cárnicas la contribución a la CE por la adición de globina es menor en un 10% en comparación con la adición de plasma o proteínas cárnicas. Aunque, la contribución de la globina puede mejorar cuando se usa en combinación con el plasma en una proporción de 4:1, produciéndose una salchicha aceptable según un panel sensorial. (Caldironi y Ockermann, 1982)

La CE de la globina aumentó al incrementarse la concentración de proteína hasta 0.4 g /100 mL y ya no cambió al aumentar esta concentración. (Tybor et al., 1973 y 1975; Shahidi et al., 1984; Nakamura et al., 1984) Se ha sugerido que cuando las concentraciones de globina exceden los 0.4 g por 100 mL, ocurre un mezclado inadecuado durante la preparación de la emulsión debido a la alta viscosidad de la dispersión. La capacidad de la globina de estabilizar emulsiones aceite en agua es afectada seriamente por el pH. (Morrissey et al., 1991; Autio et al., 1984; Shahidi et al., 1984 y Nakamura et al., 1984)

La actividad emulsificante (EA) es el área interfacial (m^2) creada por peso de proteína (g) y obtuvo los valores mínimos en un rango de pH de 7 a 8 donde la solubilidad de la globina es muy baja. (Tybor et al., 1973; Autio et al., 1984; Nakamura et al., 1984) La actividad emulsificante es muy buena en el rango de pH de 3-6 y por arriba de pH 9. (Nakamura et al., 1984) Esta actividad disminuye con la adición de NaCl al 2 %. El pH y el NaCl afectan las interacciones electrostáticas y son responsables de la agregación de la proteína y la pérdida de solubilidad en punto del isoelectrico y como una consecuencia, la adsorción de la proteína puede reducirse. (Morrissey et al., 1991)

Para incrementar la solubilidad de la globina en la zona isoelectrica, se pueden aplicar dos métodos: la modificación química con anhídrido acético y la hidrólisis con pepsina. La acetilación con anhídrido acético aumenta significativamente la carga neta negativa, causando la expansión molecular, mejorando notablemente la EA de la globina a pH de 6 a 9. (Nakamura et al., 1984) La actividad disminuye rápidamente a pH's menores de 6, debido a la baja solubilidad de las proteínas acetiladas en la región ácida. Los hidrolizados pépticos de globina, que son totalmente solubles en la región del punto de isoelectrico no muestran un aumento en EA, lo que también se ha observado en los hidrolizados de las proteínas del suero. (Nakamura et al., 1984 y Morrissey et al., 1991)

En 1986, Rodríguez encontró que la globina de bovino es un excelente agente emulsificante.

2.6.2. Utilización de la globina

Al igual que el plasma, la globina ha sido utilizada para sustituir la carne en los embutidos (Autio et al., 1990; Caldironi y Ockerman, 1982) pero dada su menor capacidad de emulsificación respecto al plasma ha sido incluida en menores cantidades. (Valdés, 1998) También se ha utilizado globina como ingrediente en la preparación de quesos de imitación (Liu et al., 1996)

En 1984, Shahidi et al., encontraron que la globina obtenida por el método de acetona ácida forma emulsiones estables tipo mayonesa por más de 8 semanas mantenidas a 4 °C.

Novo Nordisk propone un producto obtenido por medio de hidrólisis enzimática el cual es apropiado para producir salmueras de curado de contenido proteico para su introducción en productos cárnicos curados mediante inyección, agitación o fricción. Además, este producto posee un efecto ligante del agua en la carne curada al aplicarse en dosificaciones bajas, representando una alternativa a los polifosfatos.

Y por último la globina obtenida por el método de decoloración por oxidación del grupo hemo se sugiere puede ser utilizada para enriquecer el contenido proteico de productos cárnicos. (Wismer-Pedersen, 1987)

3. MÉTODOS Y MATERIALES

3.1. Estudios preliminares sobre las propiedades de la hemoglobina y del grupo hemo

Recolección de las muestras

En esta parte experimental se utilizó sangre de conejo la cual se recolectó en tubos de ensaye que contenían una solución de citrato de sodio al 20 % para impedir la coagulación; la concentración final del anticoagulante fue de 0.35 a 0.7 %, la solución se mezcló ligeramente con la sangre para evitar la ruptura de los eritrocitos.

La sangre con anticoagulante se separó en una centrifuga *MSE* a una velocidad de 3 000 r.p.m. por 15 min, obteniendo las fracciones plasma y paquete globular. Al efectuar la separación el plasma permanece en la parte superior y el paquete globular en la inferior.

En cada uno de los siguientes puntos se utilizó el paquete globular obtenido como se ha mencionado.

3.1.1. Espectro de absorción de la hemoglobina

El paquete globular separado del plasma se diluyó 1:200 (v/v) en agua destilada, se homogeneizó la solución y posteriormente se realizó un barrido de absorción en un espectrofotómetro *Bausch & Lomb Spectronic 20*, en un rango de longitud de onda de 340 a 600 nm. La longitud de onda a la que se midió la absorbancia se varió cada 10 nm.

3.1.2. Efecto del pH en la solubilidad de la hemoglobina

Se prepararon varias soluciones de paquete globular tomando un mL de este y llevándolo a un volumen final de 200 mL, antes de aforar cada muestra se ajustó a un pH distinto (de 2 a 11); a cada solución se le midió la absorbancia a una longitud de onda de 430 nm, para lo cual se realizó una dilución de las soluciones 1:2 (v/v). Se relacionó la absorbancia a 430 nm con la solubilidad de la hemoglobina.

El pH de las muestras se ajustó con NaOH y/o HCl 0.5 N y se utilizó agua destilada en las diluciones.

3.1.3. Efecto del pH en la solubilidad del grupo hemo

Utilizando el paquete globular, la hemoglobina fue separada en globina y el grupo hemo por el método de extracción del grupo prostético con acetona ácida según Tybor et al. (1973, 1975) y Rossi-Fanelli et al. (1958). Después de la extracción, el grupo hemo se encontraba disuelto en el solvente por lo que este último fue separado mediante destilación en un sistema de reflujo. Los residuos de acetona se eliminaron dejando secar el producto a 25°C.

Por último se trató de disolver el grupo hemo en agua destilada a diferente pH (de 2 a 13), para obtener una concentración de 5 mg/mL en cada muestra y se observó que cantidad de hem se disolvía en cada una de las soluciones. El pH se ajustó con HCl y/o NaOH 0.1 N, en un potenciómetro *Beckman* Φ 72 *pH*Meter.

3.1.4. Comportamiento del grupo hemo en diferentes solventes

El grupo hemo obtenido como se mencionó anteriormente se intentó disolver en los siguientes compuestos: dimetil formamida (DMF), acetona, metanol, etanol, ácido acético, butanol, cloroformo, éter, xileno, tetracloruro de carbono y agua; se observó la solubilidad que presentaba en cada uno de ellos. La concentración del grupo hemo fue de 1 mg/ mL de solvente.

3.2. Valoración de los distintos métodos de decoloración de la hemoglobina

3.2.1. Precipitación del grupo hemo con carboximetil celulosa (CMC)

El paquete globular se separó del plasma, en una ultracentrífuga *RC-5 Sorvall Instruments Dupont* bajo las condiciones antes indicadas, se hemolizó el paquete globular con agua destilada 1:5 p/p y se adicionó HCl 1M, hasta

obtener un pH de 1.41. Posteriormente se agregó una solución de carboximetilcelulosa (CMC) de viscosidad media al 0.06 % en una relación de 1:3 v/v para precipitar el grupo hemo. La solución permaneció por 15 min y finalmente el precipitado (complejo hemo-CMC) se separó de la solución de globina por medio de centrifugación a 11 000 r.p.m. por 30 min a 10 °C.

El procedimiento se repitió variando la concentración de la carboximetilcelulosa (0.3 %), y la relación de 1:5 (v/v), además la hemólisis se realizó con una parte de solución de paquete globular en dos partes de agua destilada (p/p) y el pH al que se realizó la precipitación del grupo hemo fue de 1.5. (Autio et al., 1985)

3.2.2. Precipitación del grupo hemo con carboximetil celulosa (CMC) y efecto de la temperatura

El paquete globular se diluyó en agua destilada, hasta obtener una concentración de hemoglobina de 5 g/100 mL, el pH de la solución se ajustó a un valor inicial de 1.50 con HCl 1N. La solución se calentó de 74 a 78°C por 10 min en un agitador magnético con calentamiento *Thermolyne Cimarec 2*. Posteriormente se mezcló un igual volumen de solución de CMC de baja viscosidad al 0.72 % con la solución de hemoglobina y se ajustó inmediatamente a un pH final de 2.25. Después se agitó (agitador magnético *Thermolyne Cimarec 2*) por 30 min a 25 °C y por último se centrifugó la mezcla a 3500 r.p.m. por 10 min en una centrifuga *MSE*. El sobrenadante correspondió a la solución de globina. (Hayakawa, 1986)

3.2.3. Precipitación del grupo hemo con Alginato de sodio

El paquete celular se diluyó en agua desionizada, hasta obtener una concentración de hemoglobina del 0.3 %. Además se prepararon soluciones de alginato de sodio y cloruro de sodio, ambas a una concentración de 2.5 % p/v, las cuales se adicionaron a 20 mL de solución de hemoglobina hasta alcanzar una concentración de 0.107 % y 0.348 % respectivamente en la solución final, se ajustó el pH a 2.25 y el volumen a 25 mL con agua

desionizada. Esta solución se mantuvo a 25 °C, con agitación constante por 20 min, en un agitador magnético *Thermolyne Cimarec 2* y posteriormente se centrifugó a 8700 r.p.m. 15 min, en una ultracentrifuga *RC-5 Sorvall Instruments Dupont* con lo que se obtuvo una porción sobrenadante la cual correspondió a la proteína en solución y un precipitado formado por el complejo del alginato de sodio con el grupo hemo. El pH se ajustó con soluciones de HCl y/o NaOH 0.5 N en un potenciómetro *Beckman ϕ 72 pH Meter*. (Zoon et al.,1990)

3.2.4. Precipitación de la globina con acetona ácida

El paquete celular separado del plasma, se diluyó 1:1 con agua destilada para hemolizar las células, ya hemolizado se agregó cloroformo a la solución de hemoglobina (1:4/ v/v) y se dejó por 5 min para remover los estromas, los cuales fueron eliminados de la suspensión por decantación de la proteína sobrenadante. Posteriormente se adicionó una solución de ácido ascórbico al 10 % a la solución de hemoglobina hasta un pH de 3.99 y se mezcló a alta velocidad, en un mixer *Lightnin Model L* por 30 min, esto generó mucha espuma por lo que se adicionó una gota de antiespumante de silicón. Un volumen de la solución de proteína se mezcló gradualmente con 4 volúmenes de acetona acidificada con HCl al 1 % y se agitó nuevamente en el mixer por unos minutos para remover el grupo hemo y precipitar la proteína. La proteína se recolectó, por filtración en tela de muselina y se lavó con acetona acidificada continuamente hasta obtener un precipitado casi blanco. El precipitado se secó a 25 °C para eliminar residuos del solvente. (Tybor et al., 1973 y 1975; Rossi-Fanelli et al., 1958)

3.2.5. Oxidación de la hemoglobina con peróxido de hidrógeno

Al paquete globular se le adicionó agua destilada en relación 1:1 para hemolizar los eritrocitos, se disminuyó el pH de la solución con HCl 1M hasta alcanzar un pH de 2.5 con ayuda de un potenciómetro *Beckman ϕ 72 pH Meter*. Finalmente se agregó peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 30 %

hasta obtener una concentración final del agente oxidante del 0.3 %. La solución permaneció en reposo por 24 h. Transcurrido el tiempo se observó la decoloración de la muestra. Posteriormente se repitió el experimento bajo las mismas condiciones pero la concentración final del H₂O₂ fue de 3%.

De las técnicas de decoloración antes descritas, la oxidación con peróxido de hidrógeno, resultó ser el método más adecuado para ser realizado en rastros TIF de México. Por lo que la siguiente etapa del proyecto consistió en tratar de mejorar la técnica de decoloración. Además en la siguiente parte experimental se utilizó sangre de cerdo que es la que se pretende utilizar a nivel industrial.

Se recolectaron 3 L de sangre de cerdo del rastro TIF de Cuautitlán Itzcalli, en un recipiente plástico con capacidad de 5 L, el cual contenía 150 mL de una solución de citrato de sodio al 13.3 %, como anticoagulante y NaCl al 0.82 % para no alterar la isotonicidad de la solución. La separación de las fracciones sanguíneas se realizó en una ultracentrífuga *Sorvall Instruments Dupont RC-5* a una velocidad de 3 000 r.p.m. por 15 minutos; obteniendo 1.45L de paquete globular y 1.55L de plasma, correspondiente al 48 y 52 % respectivamente.

El paquete globular separado del plasma se conservó mediante liofilización, para lo cual se repartió en matraces Erlenmeyer de 250 mL los cuales se distribuyeron en una liofilizadora *Freeze dryer 5 Labconco*.

El secado en frío se realizó por 15 días (liofilizando durante el día y congelando durante la noche). El % de humedad alcanzado en el paquete globular después de la liofilización fue de 7.36.

3.3. Optimización de la decoloración de la hemoglobina con peróxido de hidrógeno

3.3.1. Efecto del pH en la decoloración de la hemoglobina

El paquete globular liofilizado se disolvió en agua destilada para preparar varias soluciones, cada una de las cuales fue ajustada a un pH diferente (de 1 a 13), y se les adicionó H_2O_2 al 30 % hasta obtener una concentración final en la solución del 2 %. La concentración final de las soluciones del paquete globular liofilizado fue de 1:20 p/p ó 50 mg/mL.

Después de 24 h de agregado el peróxido de hidrógeno, la absorbancia de las soluciones se midió a una longitud de onda de 430 nm en un espectrofotómetro *Bausch & Lomb Spectronic 20* para lo cual se realizó una dilución 1:100 (v/v) de la solución. El pH fue ajustado con HCl y/o NaOH 1N en un potenciómetro *Beckman ϕ 72 pH Meter*.

Al encontrar que la máxima decoloración de la hemoglobina se presentaba en una rango de pH de 2 a 4.5, se decidió ampliar ese rango, estudiándolo de 0.5 a 0.5 unidades de pH, siguiendo la metodología antes descrita.

3.3.2. Efecto del tiempo y la concentración del peróxido de hidrógeno en la decoloración de la hemoglobina

Se preparó una solución con el paquete globular liofilizado, para lo cual se disolvió en agua destilada y se ajustó el pH a 3.5, se dividió en seis partes iguales y se adicionó H_2O_2 al 30 % a cada parte hasta obtener concentraciones finales en las soluciones de 0.35,0.6,1.0,1.5,2.0, y 2.5 % respectivamente. La concentración de la solución del paquete globular liofilizado fue de 1:20 p/v ó 50 mg/mL.

Después de 24, 49 y 71 h de la adición del peróxido de hidrógeno, se tomaron muestras de las soluciones, las cuales se diluyeron 1:100 (v/v) y se tomó la lectura de la absorbancia para cada muestra a una longitud de onda de 430 nm.

3.3.3. Efecto del tiempo y la temperatura en la decoloración de la hemoglobina

Se disolvió el paquete globular liofilizado en agua destilada, se le ajustó el pH a 3.5, con HCl 1N y se le adicionó H₂O₂ al 30 % hasta obtener una concentración final en la solución del 2 %. La concentración de la solución del paquete globular liofilizado fue de 1:20 p/v ó 50mg/ mL. La muestra se dividió en tres partes y cada parte se mantuvo a una temperatura diferente: temperatura ambiente, 29° y 36 °C.

Se tomaron lecturas de la absorbancia para cada tipo de muestra a una longitud de onda de 430 nm, cada hora, de la hora cero a la hora 12 y posteriormente a las 24 h. Para poder realizar las mediciones se diluyeron las muestras en agua destilada (1:100 v/v).

3.3.4. Espectro de absorción de la hemoglobina con y sin tratamiento de decoloración con peróxido de hidrógeno

El paquete globular liofilizado se disolvió en agua destilada, se le ajustó el pH a 3.5, se dividió en dos partes; a una parte se le adicionó H₂O₂ al 30 % hasta obtener una concentración final en la solución del 2 % y a la otra parte se le agregó agua destilada. Ambas partes alcanzaron una concentración final del paquete globular liofilizado de 1:20 p/v ó 50 mg/mL ó 5 %. Después de 24 h de la adición del peróxido de hidrógeno, cada muestra se diluyó 1:100 para realizar el barrido del espectro de absorción de las soluciones. La lectura de la absorbancia se tomó a intervalos de 10 nm de 340 a 600 nm utilizando un espectrofotómetro *Bausch & Lomb Spectronic 20*.

3.3.5. Valoración del % de peróxido perdido durante el tratamiento de oxidación de la hemoglobina

Se preparó una solución del paquete globular liofilizado, el pH se ajustó a 3.5 con HCl 1N y se realizó el tratamiento de oxidación con peróxido de hidrógeno al 30 %. Las concentraciones finales del peróxido de hidrógeno y

de la hemoglobina liofilizada en la solución fueron del 2 y 10 % respectivamente.

La cantidad de peróxido de hidrógeno presente en la solución de hemoglobina durante el tratamiento de oxidación se valoró a las 0,20, 1, 3,5 y 24 h después de la adición del agente oxidante, con una solución de KMnO_4 0.1 N previamente normalizada. Para la valoración se pesaron aproximadamente 0.5 g de muestra que se diluyó con agua destilada a 50 mL y se homogenizó. Se mezclaron 20 mL de la solución anterior con 20 mL de ácido sulfúrico 0.1N y finalmente se tituló con el permanganato de potasio.

En donde:

1 mL de permanganato de potasio 0.1 N equivale a 1.701 mg de peróxido de hidrógeno.

3.4. Análisis proximal del producto obtenido por decoloración con H_2O_2

Antes de estudiar las propiedades funcionales del producto obtenido, se estudió su composición, realizando las determinaciones de proteína, humedad, cenizas y la cantidad de hierro existente.

3.4.1. Proteína cruda

Se determinó por el método de Kjeldahl en matraces para digestión y equipo de destilación del mismo nombre.

3.4.2. Humedad

Se analizó por el método de secado. Las muestras permanecieron en un horno *felisa Equipar* de 100 a 110 °C hasta que mantuvieron un peso constante.

3.4.3. Cenizas totales

Las muestras se calcinaron con un mechero y posteriormente se mantuvieron en una mufla *Thermolyne 1500 Furnace Sybron* a 500 °C, hasta que presentaron un peso constante.

3.4.4. Determinación del hierro antes y después del tratamiento de decoloración con peróxido de hidrógeno

En este análisis se determinó la cantidad de hierro presente en el producto obtenido por el método de decoloración con peróxido de hidrógeno y en el paquete globular liofilizado. Las muestras se calcinaron con un mechero y posteriormente se mantuvieron en una mufla hasta la formación de cenizas; para estas determinaciones se utilizaron soluciones de o-fenantrolina, clorhidrato de hidroxilamina, buffer de acetatos y como estándar sulfato ferroso amónico según Hart y Fisher,1984; Pearson,1976.

3.5. Propiedades funcionales del producto obtenido por decoloración con H₂O₂

3.5.1. Solubilidad

Se prepararon varias soluciones, para cada una se pesaron 0.1 g de hemoglobina tratada con peróxido de hidrógeno, se disolvieron en 50 mL de agua destilada y se ajustaron a un pH diferente cada una (de 1 a 12), todas las muestras se aforaron a 100 mL, se agitaron durante 5 minutos y se les midió nuevamente el pH. Las soluciones se calentaron por 30 minutos a 37.5 °C en un baño de agua *Precision GCA Corporation*, posteriormente se agitaron 30 minutos a baja velocidad en un agitador *Eberbach Corporation* y por último se centrifugaron a 4 000 r.p.m., 20 minutos en una microcentrifuga *eppendorf 5415 C*.

La cantidad de proteína soluble se determinó por el método de Lowry utilizando para la curva patrón suero de albúmina bovina (BSA).

3.5.2. Viscosidad

Con la hemoglobina oxidada se prepararon dos series de soluciones, cada muestra de las series tenía una concentración de la hemoglobina tratada del 1 % (p/v) y un pH diferente (de 3 a 9); para la preparación de estas muestras se utilizó agua destilada como disolvente. Una serie de muestras se calentó a 70 °C por 30 minutos en un baño de agua y a la otra serie no se le aplicó ningún tratamiento térmico. Las muestras calentadas se dejaron enfriar toda la noche y las lecturas de la viscosidad para ambos tipos de muestra se realizó al día siguiente.

La viscosidad se midió en un viscosímetro *Brookfield LV spindle set* a 29°C. Las mediciones se realizaron en 5 tiempos para cada muestra a intervalos de 30 s por 2.5 min y las lecturas registradas fueron el promedio.

3.5.3. Gelatinización

Se prepararon dos series de soluciones de hemoglobina tratada con peróxido de hidrógeno, una de ellas con una concentración de proteína del 5 % y la otra del 10 % (p/v); ambas series tenían muestras a diferentes pH's (de 3 a 10). Todas las muestras se calentaron a 90 °C por 30 minutos en un multiblock *Lab-line*, después se mantuvieron a temperatura ambiente hasta enfriarse. ya frías permanecieron en refrigeración toda la noche. Al día siguiente se observó si las muestras gelatinizaron. El pH se ajustó con soluciones de HCl y/o NaOH 1N.

3.5.4. Emulsificación

Formación de la emulsión

Las emulsiones se prepararon por el método de Pearce y Kinsella (1978). Un volumen de 50 mL de una solución al 0.1 % (p/v) de hemoglobina tratada con peróxido de hidrógeno y 17 mL de aceite de maíz *Maceite* fue homogeneizado por 1 minuto en una licuadora *Osterizer* a una velocidad de 6 para producir la emulsión. La solución de hemoglobina antes de ser

homogeneizada se enfrió en un baño de hielo hasta alcanzar los 4 °C.

A partir de la formación de la emulsión se determinaron los siguientes parámetros:

1. Índice de actividad emulsificante (EAI).
2. Índice de estabilidad emulsificante (ESI).

Después de la homogeneización se tomaron inmediatamente del fondo del recipiente 50 μ L de la emulsión (0 min) y se agregaron a 5 mL de solución de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 0.1 % (p/v) homogeneizando por unos segundos en un vortex tipo mixer *Thermolyne*. La absorbancia de la solución de SDS se midió a una longitud de onda de 500 nm en un espectrofotómetro *Bausch & Lomb Spectronic 20*. Lo anterior se repitió a los 10 min después de la homogeneización.

Durante la formación de la emulsión la temperatura incrementa mucho, por lo cual después de homogeneizar las muestras, el vaso de la licuadora fue colocado nuevamente en un baño de hielo antes de la toma de la siguiente muestra. Durante este lapso (10 min) la temperatura de la emulsión no excedió los 23 °C.

El EAI y el ESI de la proteína se calcularon con las siguientes ecuaciones:

$$EAI (m^2 /g) = 2 T / \phi C$$

Donde:

C = Concentración de la solución de proteína.

T = Turbidimetría.

ϕ = Volumen parcial/ volumen total.

$$ESI \text{ (min)} = T_0 \times t / T'$$

Donde:

T_0 = Turbidimetría a los 0 min después de la homogeneización.

T' = Cambio de la turbidimetría entre 0 y 10 min.

t = intervalo de tiempo entre 0 y 10 min.

Turbidimetría = 2.303 X Absorbancia.

λ = 500 nm.

(Pearce y Kinsella, 1978)

Este método se repitió bajo las mismas condiciones, pero en este caso la proteína utilizada fue BSA (suero de albúmina bovina); la cual es un buen agente emulsificante, por lo que se utilizó como referencia para comparar a la proteína obtenida en el método de decoloración.

3.6. Definición del proceso sugerido para la decoloración de la hemoglobina

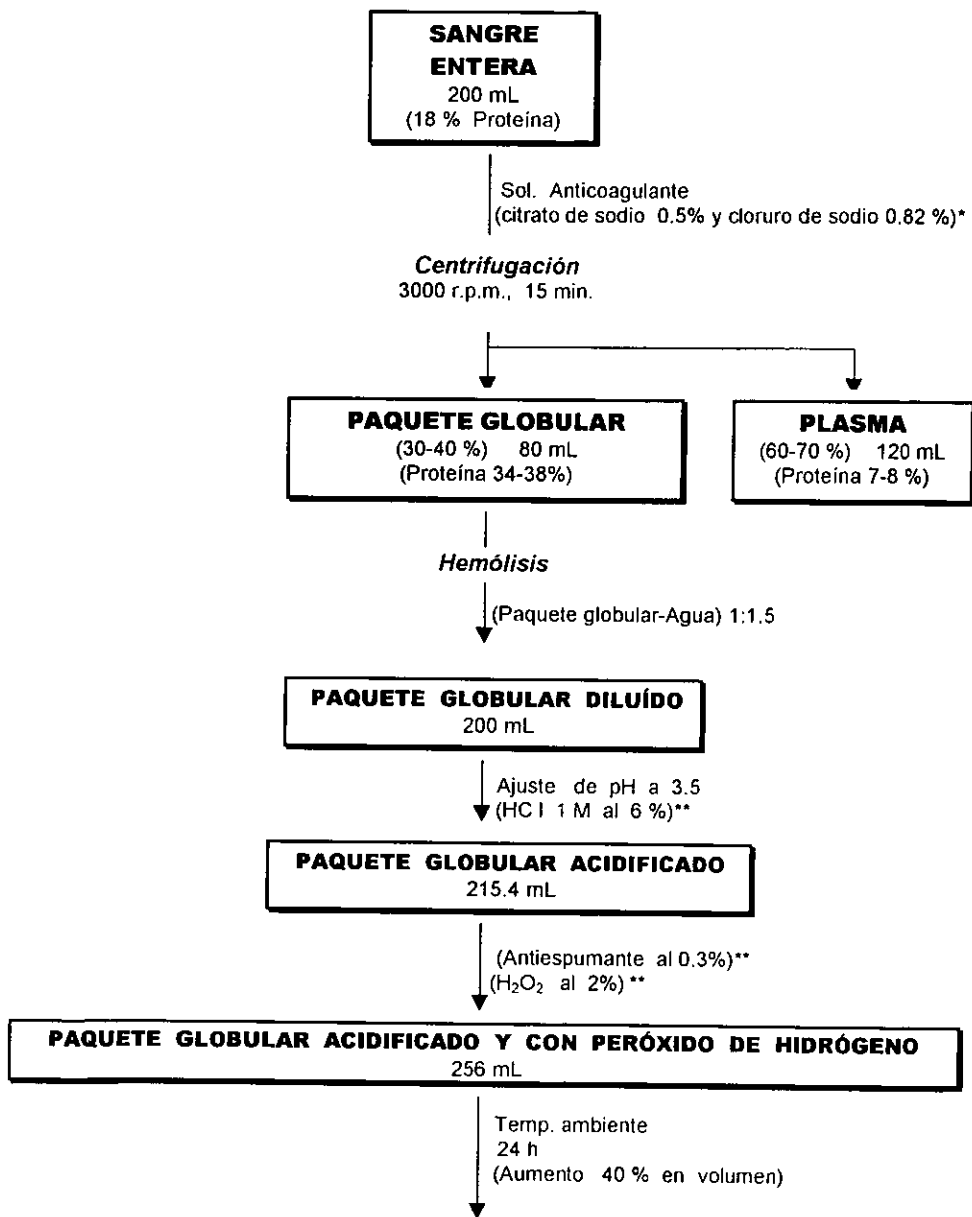
A partir de los resultados obtenidos, el proceso que se propone es el siguiente:

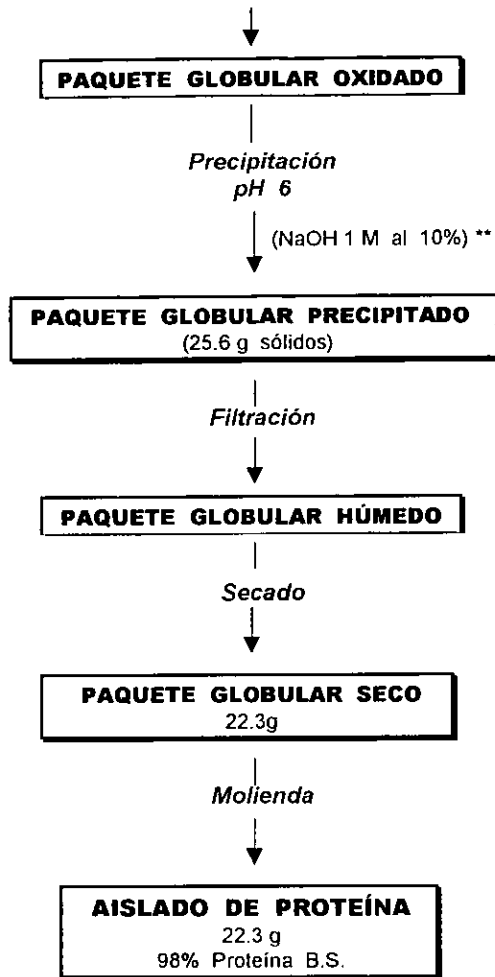
La sangre recolectada se mezcla inmediatamente con una solución anticoagulante, compuesta por citrato de sodio y cloruro de sodio. La concentración mínima adecuada de anticoagulante debe ser de 0.3 %, el cloruro de sodio se adiciona para evitar que los eritrocitos estallen por la pérdida de la isotonicidad de la solución. Después se centrifuga a 3000 r.p.m. durante 15 min para separar las fracciones: plasma y paquete globular; ya separadas a esta última fracción se le adiciona agua para hemolizar los eritrocitos, en una proporción de 1:1.5. El pH de la solución

se ajusta a 3.5 con HCl 1M, se mantiene el agitación constante y se agrega antiespumante de silicón, por que al agregar el peróxido de hidrógeno se genera mucha espuma, en seguida se adiciona el agente oxidante al 30%; hasta obtener una concentración final de este en la solución del 2%. Se mezcla todo perfectamente y se mantiene a temperatura ambiente por 24 h, transcurrido ese tiempo se precipita la proteína a pH de 6 con NaOH 1M, se filtra y se deja secar para posteriormente molerse y obtener un polvo fino.

A continuación se muestra el diagrama de flujo para la decoloración de la hemoglobina por medio del proceso antes descrito para industrializar sangre de cerdo. (Fig. 3)

Fig. 3. Proceso sugerido para la decoloración de la hemoglobina





* Concentración final en sangre.

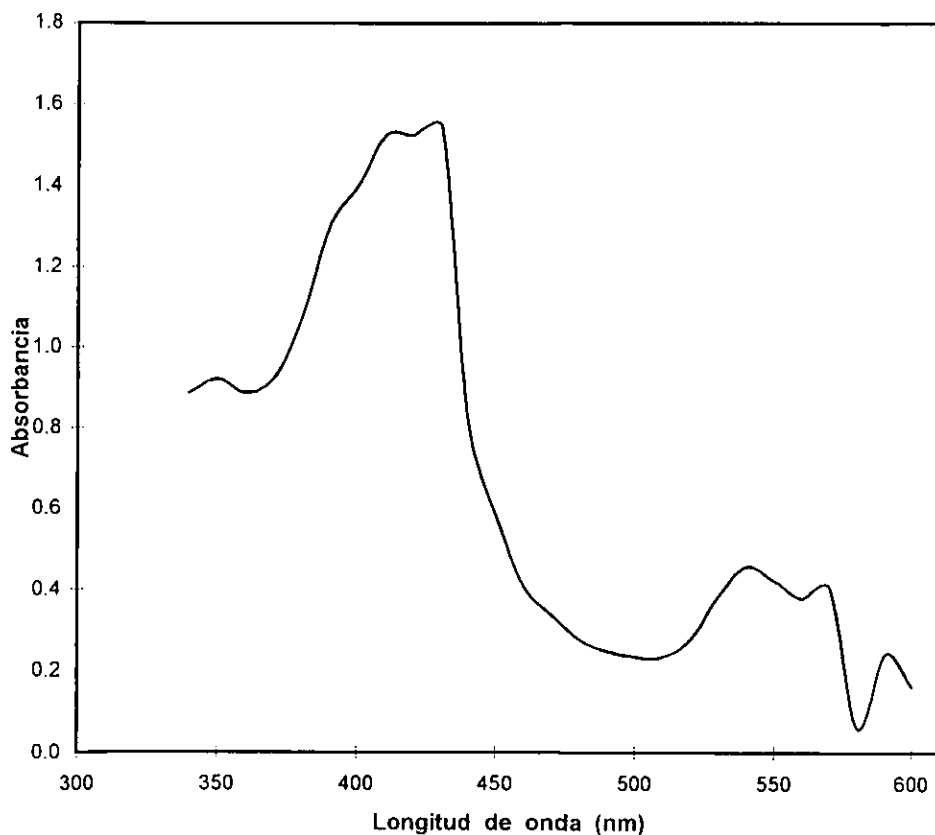
**Concentración final en paquete globular acidificado y con peróxido de hidrógeno.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Estudios preliminares de las propiedades de la hemoglobina y del grupo hemo

4.1.1. Espectro de absorción de la hemoglobina

Fig. 4.- Espectro de absorción de la hemoglobina.



La longitud de onda de la hemoglobina presenta un máximo de absorción a 430 nm, (Fig.4) lo cual concuerda con lo que se ha reportado anteriormente

(Cheftel et al., 1989; Katz, 1994; Zoon, 1990). La absorción a esta longitud de onda se debe al grupo hemo, el cual es una molécula de porfirina, formada por cuatro pirroles que contienen dobles ligaduras. Cuando la radiación electromagnética pasa a través del hemo, este absorbe parte de la radiación; la cantidad de radiación absorbida va a depender de la longitud de onda de la radiación y de la estructura del compuesto. Tomando en cuenta que a 430 nm se presentó la máxima absorción, las determinaciones siguientes se realizaron a esa longitud de onda.

4.1.2. Efecto del pH en la solubilidad de la hemoglobina

La solubilidad de la proteína a distintos pH's se puede observar en la *tabla 7*:

Tabla 7.

pH	Solubilidad
3	XXX
4	XXXX
6	XX
8	X
9	XXXXX
11	XXXX

Donde:

XXXXX = Altamente soluble,

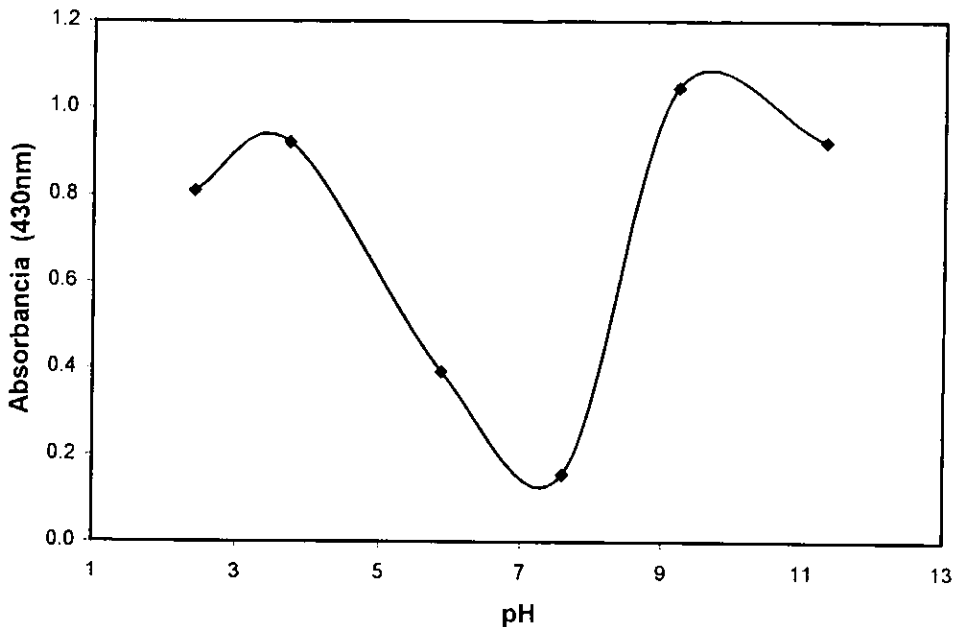
XXXX = Soluble,

XXX = Medianamente soluble,

XX = ligeramente soluble,

X = Insoluble.

Fig. 5.-Efecto del pH en la solubilidad de la hemoglobina.

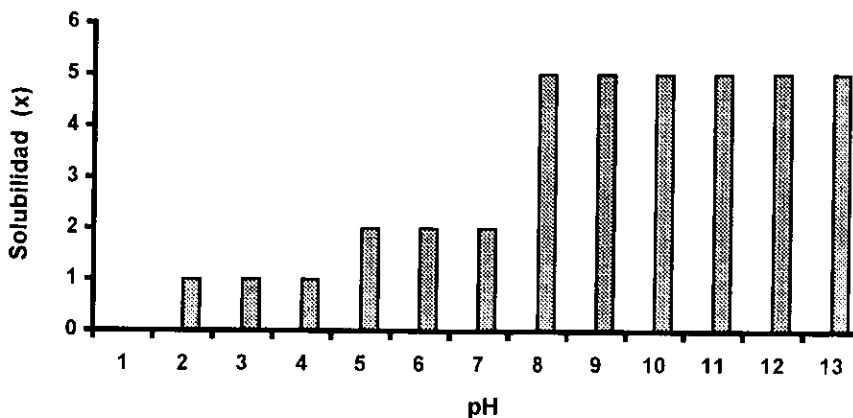


La solubilidad de la proteína es casi nula a pH neutros, debido a la cercanía del punto isoelectrico (6.8). La solubilidad empieza a aumentar al alejarse de esa zona y de nuevo empieza a disminuir a pH's extremos.(Fig 5)

4.1.3. Efecto del pH en la solubilidad del grupo hemo

La solubilidad que presentó el grupo hemo a diferentes pH's fue la mayor a pH's alcalinos, menor a pH's cercanos a la neutralidad y mucho menor a pH's ácidos. Fig. 6

Fig. 6.- Efecto del pH en la solubilidad del grupo hemo.



Donde:

5X = Altamente soluble, 2X = Medianamente soluble, 1X = Ligeramente soluble

4.1.4. Comportamiento del grupo hemo en diferentes solventes

La solubilidad que presentó el grupo hemo en algunos compuestos fue la siguiente: la máxima solubilidad se obtuvo en dimetil formamida (DMF) y en la acetona y fue disminuyendo en el siguiente orden: metanol, etanol, ácido acético, butanol, cloroformo, éter, xileno, tetracloruro de carbono y por último en el agua fue totalmente insoluble.

El grupo hemo es un compuesto orgánico por lo cual no es soluble en solventes altamente polares y con una constante dieléctrica elevada como el agua (80); en disolventes no polares como en el cloroformo, éter, tetracloruro de carbono y xileno la solubilidad es muy poca. En cambio en solventes polares pero con una constante dieléctrica moderadamente elevada como la DMF, acetona (21.4), metanol (33), etanol (24), ácido acético y butanol (17.1), el grupo hemo presenta la más alta solubilidad. *Tabla 8*

Tabla 8.

SOLVENTE	SOLUBILIDAD
Dimetilformamida (DMF)	XXXXXX
Acetona	XXXXXX
Metanol	XXXX
Etanol	XXXX
Ácido acético	XXX
Butanol	XXX
Cloroformo	XX
Éter	XX
Xileno	XX
Tetracloruro de carbono	X
Agua	X

Donde:

XXXXXX = Altamente soluble

XXXX = Soluble

XXX = Medianamente soluble

XX = Ligeramente soluble

X = Insoluble

4.2. Comparación de los métodos de decoloración de la hemoglobina

4.2.1. Decoloración con carboximetilcelulosa (CMC)

En la decoloración de la proteína mediante este método, se obtiene una solución de color café oscuro la cual corresponde a la globina en solución y un precipitado de color café intenso, que esta formado por la CMC y el grupo hemo. Cuando la solución de hemoglobina se calienta, la solución de globina que se obtiene es de color café ligeramente más claro que el caso anterior.

A pH's muy ácidos la unión que existe entre el grupo hemo y la globina puede romperse, pudiendo separar el hem de la solución de globina por medio de la formación de un complejo con carboximetilcelulosa (CMC), este compuesto se elimina de la solución mediante centrifugación, dando como resultado la decoloración de la proteína, aunque la disminución del color no es completamente satisfactoria. Para obtener decoloraciones más eficaces, la proteína se calentó a 70 °C para desnaturalizarla y desplegar su estructura, facilitando con ello la liberación del grupo prostético de la globina y por lo tanto aumentando la eficiencia de la decoloración.

En ambos tratamientos la CMC no solo atrapa el grupo hemo, también presenta cierta afinidad por la proteína lo cual repercute en el rendimiento.

4.2.2. Decoloración con alginato de sodio

En este método se obtiene una solución de globina muy clara, casi translúcida.

Al igual que la carboximetilcelulosa, el alginato de sodio forma un complejo con el grupo hemo, efectuándose una decoloración muy efectiva de la solución de la hemoglobina, pero las concentraciones a la que es efectivo el método son muy pequeñas, lo cual lo hace ineficiente para procesar grandes cantidades de sangre. Además al igual que la CMC, el alginato de sodio no solo acarrea el grupo hemo sino también globina, lo cual disminuye el rendimiento y por lo tanto aumenta los costos de producción.

4.2.3. Decoloración con acetona ácida

En este procedimiento se obtiene la proteína precipitada la cual es blanca o ligeramente color crema, esto depende de la cantidad de acetona utilizada, a mayor cantidad de solvente mejor es la decoloración.

Los disolventes ejercen una influencia muy marcada en la estabilidad y la solubilidad de las proteínas, de tal manera que la constante dieléctrica del medio en que se disuelven es un factor determinante. La fuerza de

atracción entre dos moléculas de proteína aumenta si se coloca en un disolvente con un valor bajo de su constante dieléctrica, como es el caso de la acetona, la cual no sólo provoca la precipitación de la globina sino que además es un buen disolvente del grupo hemo, por esto, éste es el método más efectivo para la decoloración de la hemoglobina; la proteína que se obtiene como se mencionó es de color blanco o casi blanco y según estudios realizados tiene muy buenas propiedades funcionales, por lo que sería un método muy adecuado para aprovechar las proteínas del paquete globular, sino fuera por las grandes cantidades de solvente que son utilizadas para la decoloración.

Los costos de producción de la globina por este método serían muy elevados, debido a como se ha mencionado son necesarias grandes cantidades de solvente para decolorar la proteína, además de la regeneración del compuesto y la necesidad de trabajar a bajas temperaturas por ser una sustancia altamente inflamable; estos factores hacen que la implantación de este proceso en los rastros TIF de México no sea factible.

4.2.4. Decoloración con peróxido de hidrógeno

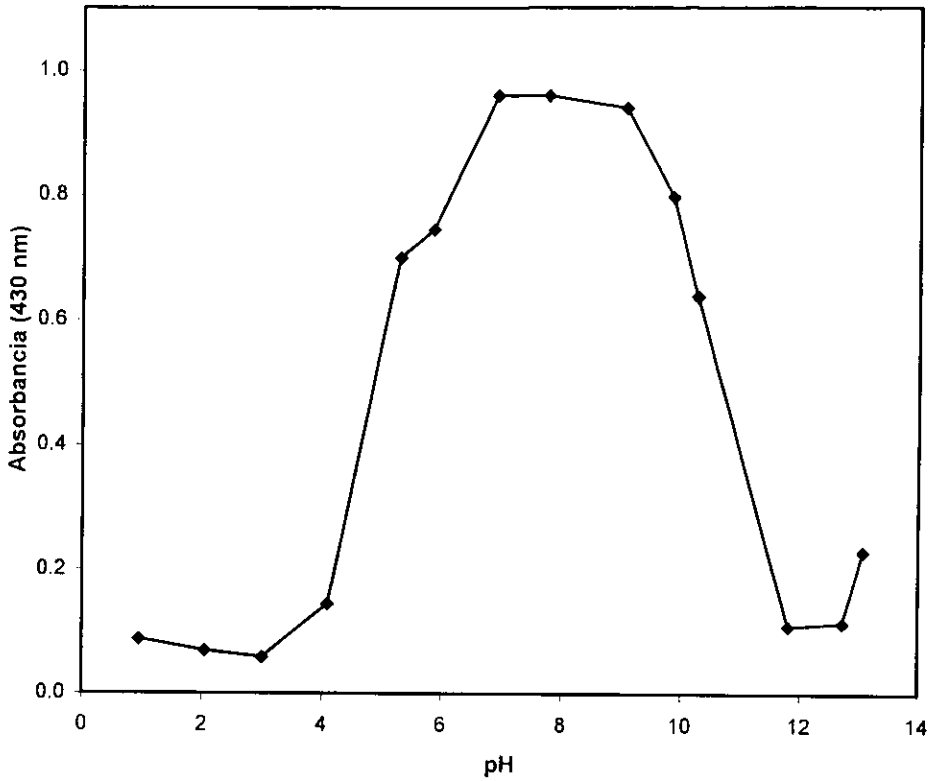
La decoloración producida en la proteína con el peróxido de hidrógeno a una concentración 0.3 % en la solución es muy poca, pero cuando se aumenta esta concentración hasta 3 %, el producto obtenido tiene mejor aspecto. Este método es fácil de realizar y aunque el color de la proteína disminuye en gran medida, la decoloración no es totalmente satisfactoria por lo cual en los experimentos siguientes se trató de optimizar las condiciones de reacción.

4.3. Optimización de la decoloración de la hemoglobina con peróxido de hidrógeno

4.3.1. Efecto del pH en la decoloración

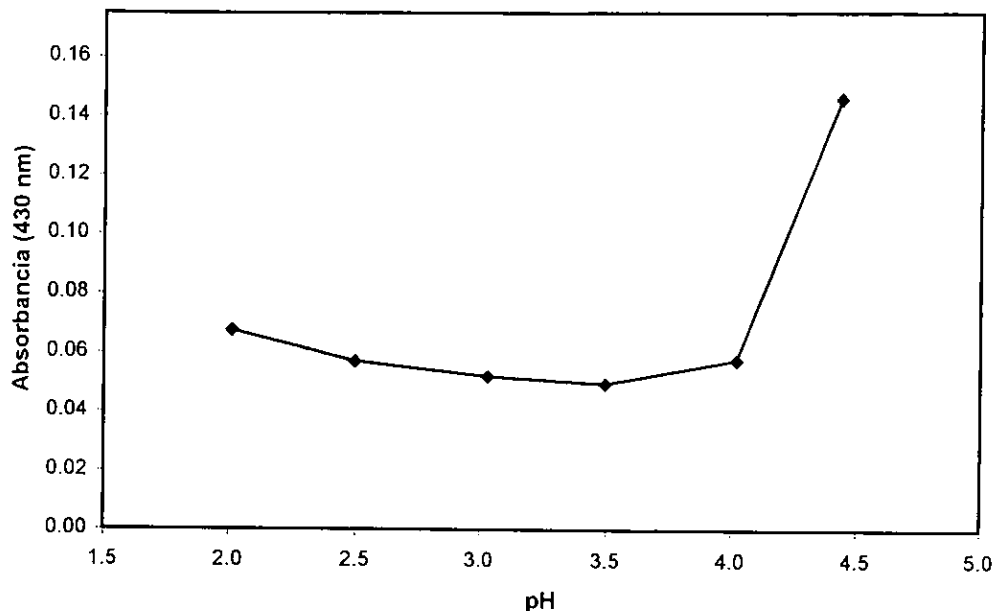
El pH de la solución de hemoglobina influye de manera importante en la decoloración con peróxido de hidrógeno. La decoloración se ve favorecida a pH's muy ácidos y a pH's alcalinos pero de menor manera en estos últimos. (Fig. 7) En la sangre se encuentra la enzima catalasa, la cual actúa sobre el H_2O_2 dando como productos $\frac{1}{2} O_2$ y H_2O y tiene un pH óptimo de acción de 7.6, es por eso que a pH's cercanos a este punto (6-10) la decoloración de la hemoglobina fue nula o casi nula debido a la máxima actividad de la enzima en ese rango de pH. La hemoglobina puede ser decolorada a pH's ácidos, menores o iguales a 4 debido a que existe una inhibición de la enzima, por lo cual el peróxido de hidrógeno puede actuar como agente oxidante a ese rango de pH sin que sea consumido por la catalasa. A pH de 5 la actividad de la catalasa empieza a incrementarse, debido a la cercanía del pH óptimo y por lo cual hay una ligera decoloración de la proteína. A pH de 11 la actividad de la catalasa empieza a disminuir, a pH's de 12 a 13 la actividad de la catalasa es mínima, debido seguramente a la desnaturalización de la enzima que puede ocurrir a pH's demasiado ácidos o demasiado básicos; esta desnaturalización ocasiona un cambio en la estructura de la proteína que la hace incapaz de actuar sobre el sustrato, por la pérdida de la actividad biológica.

Fig. 7.- Efecto del pH en la decoloración de la Hb con peróxido de hidrógeno al 2%.



Al ampliar el rango de pH en la zona que mejor se decolora la hemoglobina, se puede observar que a pH de 3.5 se encuentra el pH de máxima decoloración; lo cual se visualiza mejor al obtener el producto. (Fig. 8)

Fig. 8.-Efecto del pH (2 a 4.5) en la decoloración de la Hb con peróxido de hidrógeno al 2%.

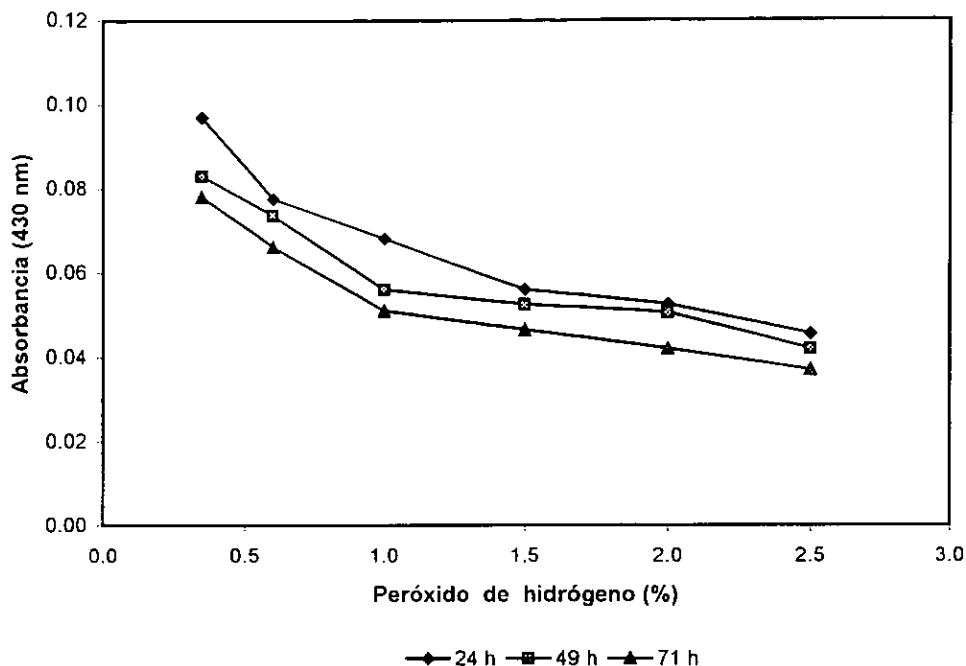


4.3.2. Efecto del tiempo y la concentración de peróxido de hidrógeno en la decoloración

Al aumentar el tiempo de reacción del agente oxidante, aumenta la decoloración de la hemoglobina. A las 71 h la decoloración de la hemoglobina es mayor que a las 49 h y que a las 24 h, pero se ha visto que es suficiente un tratamiento de decoloración de 24 h para obtener un producto aceptable, el cual es de color amarillo.

La concentración mínima de peróxido de hidrógeno necesaria para que se realice una buena decoloración bajo este método es del 2%. (Fig. 9)

Fig. 9.-Efecto del tiempo y la concentración del peróxido de hidrógeno en la decoloración de la Hb.



4.3.3. Efecto del tiempo y de la temperatura en la decoloración

La decoloración de la hemoglobina aumenta a medida que transcurre el tiempo de oxidación con el peróxido de hidrógeno. La decoloración de esta proteína es dependiente del tiempo al igual que de la temperatura. Una temperatura ligeramente elevada favorece la decoloración de la hemoglobina, acelerando la reacción de oxidación, pudiéndose alcanzar mayores decoloraciones en tiempos más cortos; aunque altas temperaturas pueden causar desnaturalización proteica y por lo tanto la disminución en la solubilidad. También se ha reportado que la incubación con peróxido de hidrógeno puede destruir aminoácidos azufrados en particular a temperaturas

cercanas a 50 °C, especialmente metionina. (Wismer-Pedersen, 1987) Es por eso que en el método que se propone para la decoloración, la temperatura utilizada es de 20 °C a 25 °C. (Tabla 9)

Tabla 9. Efecto del tiempo y la temperatura en la decoloración de la Hb con peróxido de hidrógeno

Tiempo (h)	Temperatura (°C)		
	Ambiente	29	36
	Absorbancia (430 nm)		
0	0.6676	0.6676	0.6676
1	0.0942	0.0770	0.0683
2	0.0835	0.0709	0.0638
4	0.0668	0.0633	0.0550
6	0.0605	0.0615	0.0530
8	0.0580	0.0585	0.0530
24	0.0501	0.0513	0.0422

4.3.4. Espectro de absorción de la hemoglobina con y sin tratamiento de oxidación con peróxido de hidrógeno

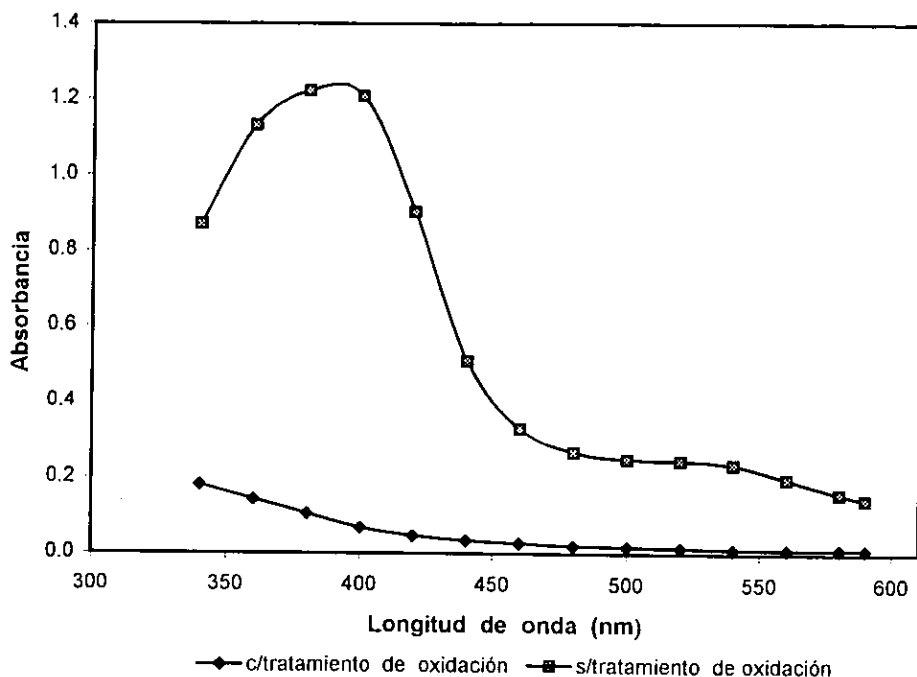
Al medir la absorbancia de soluciones de hemoglobina a pH de 7.35 (Fig. 4) y a pH de 3.5 (Fig. 10), ambas muestras sin ningún tratamiento de oxidación; se observa un cambio en la longitud de onda a la que se tiene el máximo de absorción. La hemoglobina a pH normal presenta el máximo de absorción a 430 nm y a pH ácido el máximo de absorción se desplaza a los 380 nm.

Cuando a la hemoglobina se le ha efectuado un tratamiento de oxidación con peróxido de hidrógeno al 2 % la absorción que se registra en el espectro es muy poca, teniendo un máximo a 340 nm. (Fig. 10)

Antes del tratamiento de decoloración la hemoglobina absorbía en gran medida porque el grupo hemo es un anillo de porfirina compuesto por pirroles, que en su estructura presentan dobles ligaduras las cuales hacen posible que la molécula sea colorida por el efecto de la resonancia.

Al aplicar el tratamiento de oxidación el peróxido de hidrógeno actúa sobre la molécula del hemo rompiendo o destruyendo esta estructura, lo cual provoca la pérdida de la resonancia en la molécula.

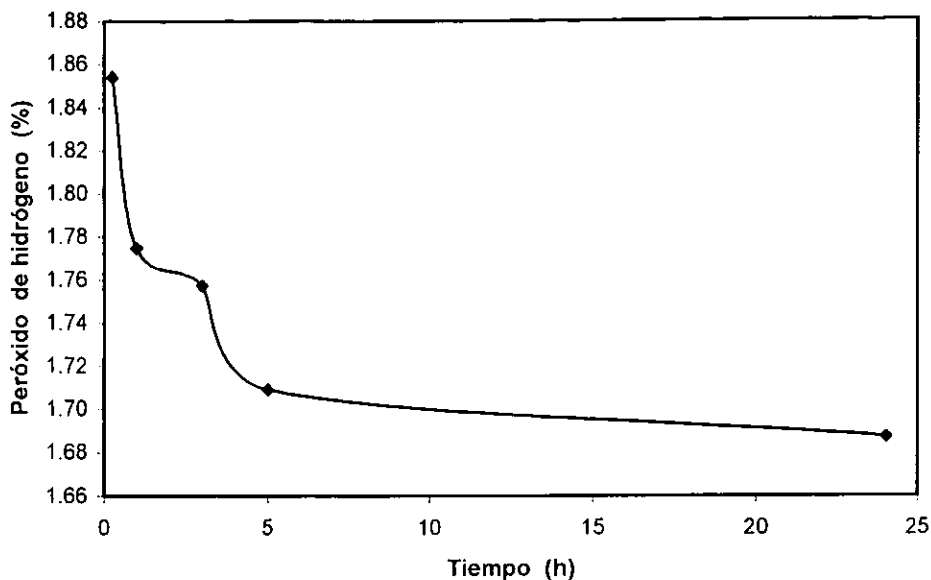
Fig. 10.-Espectro de absorción de la Hb con y sin tratamiento con peróxido de hidrógeno al 2%.



4.3.5. Degradación del peróxido de hidrógeno en la decoloración

La cantidad de peróxido de hidrógeno degradado después de 24 h de efectuada la reacción de decoloración es muy poco (aproximadamente el 0.17 %, lo cual corresponde al 9 % de la concentración inicial). Lo cual hace pensar que se necesitan concentraciones elevadas de este compuesto para poder llevarse a cabo la reacción, aunque este compuesto no se utilice totalmente. (Fig. 11)

Fig. 11.-Degradación del peróxido de hidrógeno.



4.4 Análisis proximal

4.4.1. Proteína, cenizas y humedad

El producto obtenido tiene una elevada cantidad de proteína y una pequeña cantidad de cenizas. (Tabla 10) El rendimiento es de 85 %, el cual se puede considerar como aceptable.

Tabla 10. Análisis proximal de la hemoglobina tratada con peróxido de hidrógeno al 2%

Componente	Base húmeda	Base seca
	(%)	
Humedad	6.630	-
Cenizas	1.290	1.380
*Proteína	92.08	98.62

*Los valores de proteína se obtuvieron con $f = 6.407$

4.4.2. Contenido de hierro

El porcentaje de hierro en la hemoglobina sin tratamiento de oxidación es un poco menor con respecto a la hemoglobina tratada (Tabla 11). La cantidad mayor de hierro en esta última puede ser debido a que durante el tratamiento a pH ácido la hemoglobina liberó el grupo hemo, después en el tratamiento de oxidación este grupo se fragmento y la hemoglobina fue decolorada, pero al momento de precipitar la proteína y filtrarla, esta se perdió en pequeña cantidad; al obtener porcentajes, el de la proteína disminuyó y el del hierro aumento aunque la cantidad de hierro seguía siendo la misma que al inicio.

Tabla 11. % de hierro en la hemoglobina con y sin tratamiento de oxidación con peróxido de hidrógeno

Muestra	% de hierro
Hemoglobina con tratamiento	0.3325
Hemoglobina sin tratamiento	0.2709

Propiedades funcionales del producto obtenido por decoloración con peróxido de hidrógeno

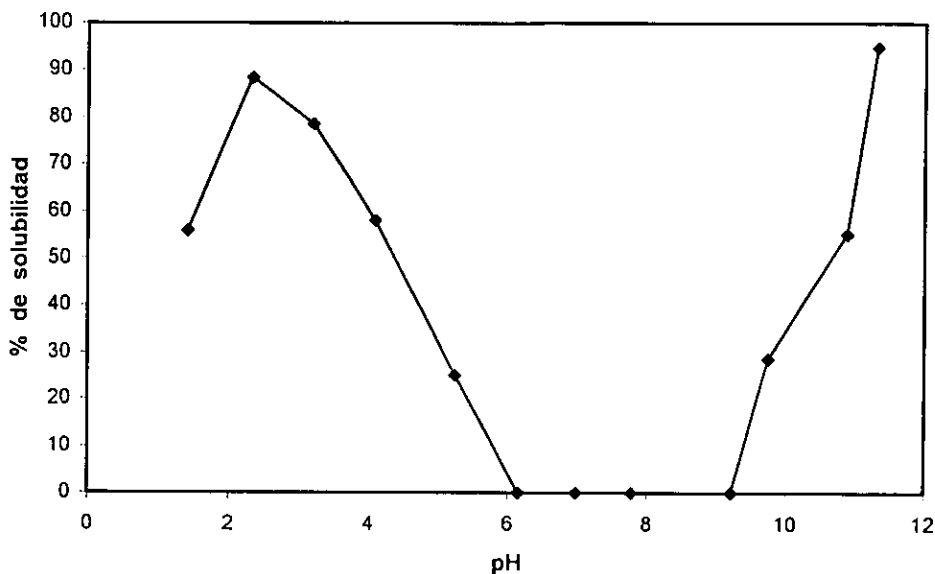
Durante el tratamiento de decoloración la hemoglobina estuvo expuesta a la acción de agua oxigenada, ácidos y álcalis lo que ocasionó su desnaturalización, afectando las características y propiedades que presentaba la proteína en su forma nativa.

4.5.1. Solubilidad

La solubilidad de la proteína está muy influenciada por el pH del medio, los cambios de este afectan la ionización y la magnitud de la carga neta de las moléculas de proteína, alterándose las fuerzas de atracción y repulsión.

La solubilidad en la zona cercana a la neutralidad y a pH ligeramente básico es nula (6-9), en esos puntos las fuerzas de repulsión son mínimas, lo que hace que las proteínas tiendan a agregarse dando como resultado la precipitación; la máxima solubilidad ocurre a pH de 2 y a pH de 11. (Fig. 12)

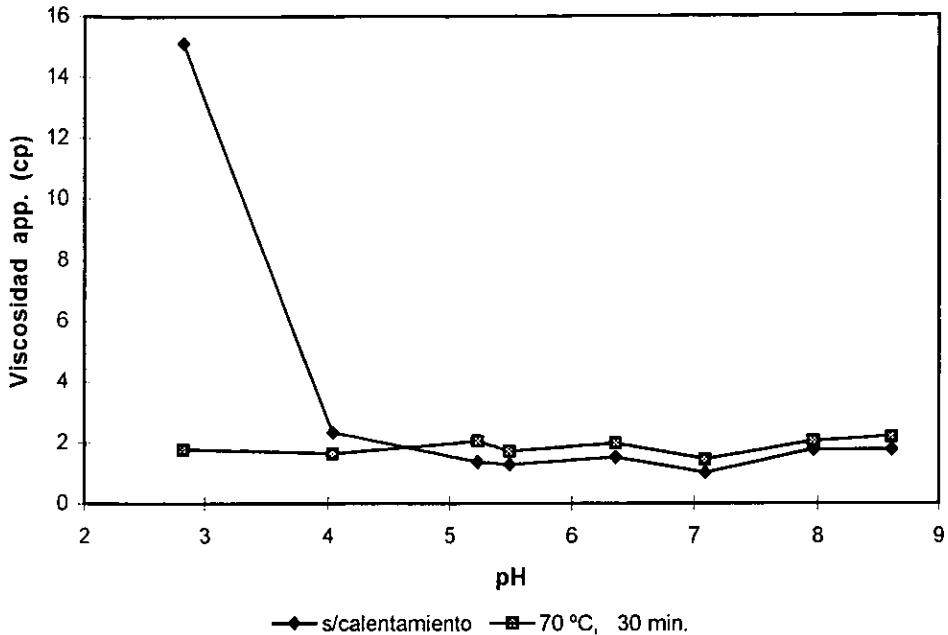
Fig.12.-Efecto del pH en la solubilidad de la Hb tratada con peróxido de hidrógeno.



4.5.2. Viscosidad

La viscosidad aparente de las soluciones de hemoglobina tratada con peróxido de hidrógeno es muy baja; el calentamiento solamente produce un pequeño incremento de esta propiedad y a pH de 2 a 4 tiene un efecto inverso. (Fig. 13)

Fig. 13. -Efecto del pH en la viscosidad de la Hb tratada.



La proteína al desnaturalizarse sufrió cambios en su conformación, lo cual ocasiona que las interacciones proteína - proteína y proteína - solvente sean mínimas, por lo que no se puede formar una matriz proteica que sea capaz de retener agua, dando como resultado una baja viscosidad en las soluciones preparadas con esa proteína.

4.5.3. Gelatinización

Las muestras no gelatinizaron en ninguno de los dos tratamientos estudiados, a pesar de que se utilizaron altas concentraciones de proteína (5 y 10 %). En cambio en estudios realizados por Autio et al., 1984 y 1985, con la globina obtenida por el método de precipitación del grupo hemo con

carboximetilcelulosa, la proteína forma un gel transparente a concentraciones menores a las utilizadas en este experimento (2 a 4%). Aunque también se ha reportado que esta proteína no forma geles; por lo tanto no se puede afirmar que debido al tratamiento de decoloración la proteína no gelifica.

4.5.4. Emulsificación

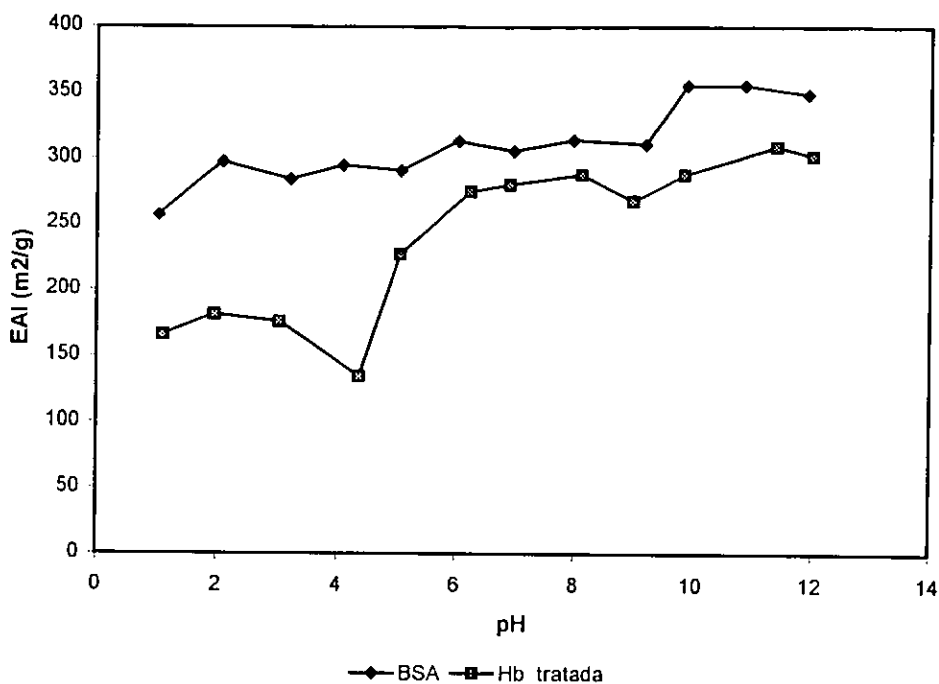
Debido a que los valores de EAI son afectados por diversos factores, tales como el volumen de la emulsión, tipo de aparato utilizado para la formación de ésta, velocidad y duración de la operación, además del tipo y la cantidad de aceite empleados; los valores presentados no pueden ser comparados con algún estudio anterior, por lo que se utilizó para comparar con la hemoglobina oxidada, suero de albúmina bovina (BSA) que es un buen agente emulsificante. (Fig. 14)

La actividad emulsificante del BSA aumenta al incrementarse el pH, lo cual también ocurre con la hemoglobina tratada con peróxido de hidrógeno pero en el rango de pH de 1 a 4 presenta el EAI más bajo, debido probablemente a los cambios sufridos en la conformación de la proteína.

A pH's altos la actividad emulsificante para ambas proteínas es elevada, lo cual puede ser debido a que las estructuras de estas moléculas están desplegadas excesivamente y pueden interactuar fácilmente tanto con la fase acuosa como con la fase oleosa.

En general los valores de EAI son mayores para el BSA que para la hemoglobina tratada aunque no en gran medida, por lo que se puede decir que la hemoglobina tratada presenta buenos valores de EAI, considerando que el BSA es un excelente agente emulsificante.

Fig. 14.- Efecto del pH en la actividad emulsificante.

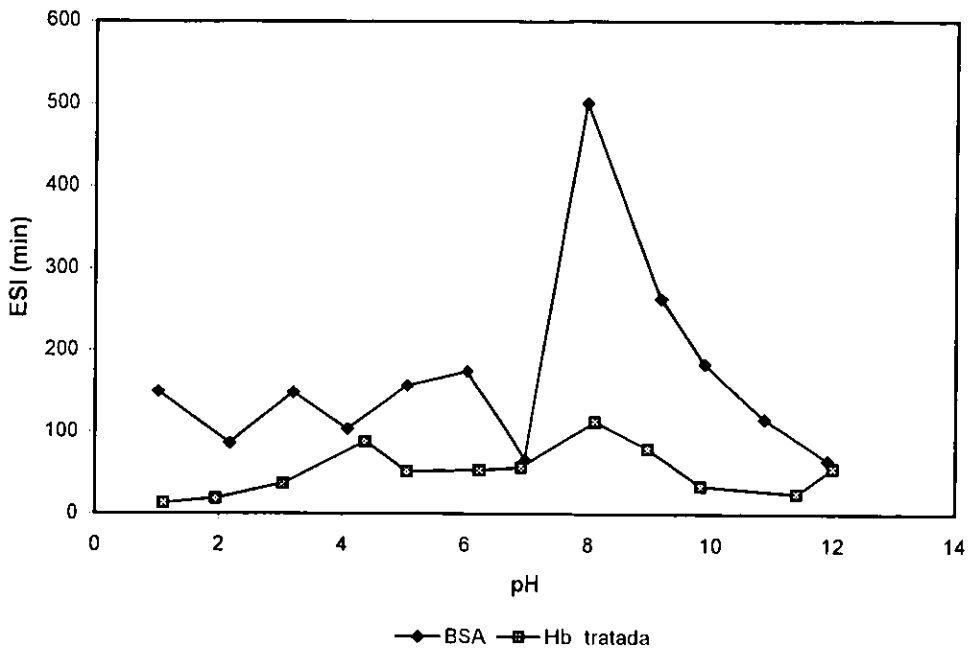


Las propiedades emulsificantes dependen en gran medida del balance de aminoácidos hidrófobos e hidrófilos que cada proteína contiene; la parte hidrofóbica de las proteínas se orienta hacia la fase oleosa y la parte polar hacia el agua de la fase acuosa.

En la formación y en la estabilidad de las emulsiones el pH es un factor importante, debido a los grupos ionizables carboxilo y amino que contienen los aminoácidos de las proteínas, los cuales tienen la capacidad de desarrollar una carga positiva o negativa según el pH del medio.

El índice de actividad emulsificante a todos los valores de pH es mayor aunque no en gran medida, en la BSA en comparación con la hemoglobina tratada con peróxido de hidrógeno, por lo que puede considerarse una buena actividad emulsificante para la proteína en estudio, tomando en cuenta que la BSA es un excelente agente emulsificante,

Fig. 15.- Efecto del pH en la estabilidad de la emulsión.



Comparando el ESI de las emulsiones de hemoglobina tratada con emulsiones de suero de albúmina bovina, estas últimas presentan una estabilidad mucho mayor. (Fig. 15) La baja estabilidad de la hemoglobina tratada es debida probablemente a los cambios generados en la conformación de la proteína durante el tratamiento de decoloración.

5. CONCLUSIONES

- El método que en este estudio resultó ser el más eficiente para la decoloración de la hemoglobina es la extracción del grupo hemo con acetona ácida, pero su implantación a gran escala resultaría muy costosa.
- El método de decoloración de la hemoglobina más factible técnica y económicamente es la decoloración con peróxido de hidrógeno, lo cual se visualiza fácilmente al comparar precios, cantidades de reactivos y condiciones de reacción.
- La decoloración de la hemoglobina con peróxido de hidrógeno es dependiente del pH, tiempo y temperatura.
- La decoloración de la hemoglobina aumenta al aumentar la concentración de peróxido de hidrógeno, pero no de manera notoria.
- La decoloración con peróxido de hidrógeno puede ser debido a un cambio en la estructura del grupo hemo que elimina la resonancia de la molécula.
- Las propiedades funcionales de la proteína se pierden en gran medida por efecto del tratamiento con peróxido de hidrógeno.
- La producto obtenido se sugiere puede ser utilizado para enriquecer el contenido proteico de alimentos como embutidos, o bien en galletas en las cuales además de aumentar la cantidad de proteína serían una fuente de hierro.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Autio, K., Kiesvaara, M., Mälkki, Y., and Kanko, S. (1984). Chemical and functional properties of blood globin prepared by a new method. *J. Food Sci.* 49:859-862.
2. Autio, K., Lyytikäinen, H., Mälkki, Y., and Kanko, S. (1985). Penetration studies of blood globin gels. *J. Food Sci.* 50: 615-617.
3. Autio, K. and Mietsch, F. (1990). Heat-induced gelation of myofibrillar proteins and sausages: effect of blood plasma and globin. *J. Food Sci.* 55: 1494-1496.
4. Autio, K., Kiesvaara, M., Mälkki, Y., and Kanko, S. (1985). Method for dividing blood hemoglobin into heme and globin. *U.S Patent* 4,518,525, Appl. May. 21
5. Benesch, R. and Kwong, S.(1995). Coupled reactions in hemoglobin. Heme-globin and dimer-dimer association. *J. Biol Chem.* 270: 13785-13786.
6. Bourgeois, C.M; Corcuff, N; Joannick, P; Quebriac, O. (1986). Procède de decoloration chimique du sang et du cruor et produit riche en proteines obtenu a partir de ce procède. *Patente* (FR2568102A1).
7. Caldinori, H. A. and Ockermann, H. W. (1982). Incorporation of blood proteins into sausage. *J. Food Sci.* 47: 405-408.
8. Cheftel, J.C., Cuq, D., Lorient, J.L. (1989). *Proteínas alimentarias*. Ed. Acribia. Zaragoza, España. pp:221-233.
9. Confederación Nacional Ganadera. Mayo (1995). *Información Económica Pecuaria*. Dirección de Estudios Económicos y Comercio Internacional.
10. De Buyser and Dirk, R. (1999) Protein product from blood and/or hemoglobin. *U.S. Patent* 5 880 266. Appl. March 9.
11. Dickinson, E. and Stainsby, G. (1987). Progress in the formulation of food emulsions and foams. *Food Technology.* 41: 74-81.
12. Duarte, T. R., Carvalho, S. M., and Sgarbieri, V.C. (1999). Bovine blood components: fractionation, composition and nutritive value. *J. Agric. Food Chem.* 47:231-236.

13. Fennema, O. R. (1993). *Química de los Alimentos*. 2ª edición, Ed. Acribia. Zaragoza, España. pp:339, 345-347, 620-627.
14. Fernando, T. (1981). Concentration of animal blood by ultrafiltración. *Biotech. and Bioeng.* 23:19-27.
15. Fritz y Mayer. (1950). *Química de las materias colorantes naturales*. Ed. Aguilar. Madrid, España. pp: 299-301.
16. Gabay, T; and Ginsburg. (1993). Hemoglobin denaturation and iron release in acidified red blood cell lysate. A possible source of iron for intraerythrocytic malaria parasites. *Experimental parasitology.* 77:261-272.
17. Gracey, J. E. (1989). *Higiene de la carne*. 8ª edición. Ed. Interamericana. España. pp:82,83,98,99.
18. Haque, Z. and Kinsella, J. E. (1998). Emulsifying properties of food proteins: bovine serum albumin. *J. Food Sci.* 53: 416-420.
19. Hargrove, M; Barrick, D; and Olson, J. (1996). The association rate constant for heme binding to globin is independent of protein structure. *Biochemistry.* 35: 11293-11299.
20. Hart, F.L. and Fisher, H. J. (1984) *Análisis moderno de los alimentos*. Ed. Acribia. Zaragoza, España. pp: 23-25, 148-150.
21. Hayakawa, S., Ogawa, T., and Sato, Y. (1982). Some functional properties under heating of the globin prepared by carboxymethyl cellulose procedure. *J. Food Sci.* 47: 1415-1418
22. Hayakawa, T., Matsuura, Y., Nakamura, R., and Sato, Y. (1986). Effect of heat treatment on preparation of colorless globin from bovine hemoglobin using soluble carboxymethyl cellulose. *J. Food Sci.* 51: 786-796.
23. Haurowitz, F. (1963) *The chemistry and function of proteins*. Academic Press Inc. 2ª edition. pp: 184-196.
24. Herrera, E. (1986). *Bioquímica*. Ed. Interamericana. México. pp: 737-745.
25. Hinojosa, S. Y López, P. (1981) Obtención de plasma sanguíneo de bovinos y porcinos y su empleo en la fortificación de pastas alimenticias. *Tesis Profesional*. Facultad de Química. UNAM

26. Katz, D., White, S., Huang, W., Kumar, R., and Christianson, D. (1994). Structure determination of aquomet porcine hemoglobin at 2.8Å resolution. *J. Mol. Biol.* 244: 541-553.
27. Lawhon, J.T. and Cater, C.M. (1971). Effect of processing method and pH of precipitation on the yields and functional properties of protein isolates from glanless cottonseed. *J. Food Sci.* 36: 372-378.
28. Ledward, D.A. (1984) Haemoproteins in meat and meat product. In: *Developments in Food Proteins-3*. Hudson, B. J. F. USA. pp:36,39,48.
29. Li-Chan, E., Nakai, S., and Wood, D. F. (1984). Hydrophobicity and solubility of meat proteins and their relationship to emulsifying properties. *J. Food Sci.* 49:345-350.
30. Linden, G; and Lorient, D. (1996). *Bioquímica agroindustrial*. Ed. Acibia. Zaragoza, España pp:230-237.
31. Liu, X. Q., Yonekura, M., Tsutsumi, M., and Sano, Y. (1996). Physicochemical properties of aggregates of globin hydrolysates. *J. Agric. Food Chem.* 44: 2957-2961.
32. Maclean, N. (1979). *Hemoglobina*. Ed. Omega. Barcelona, España 4-38.
33. Mann, I. (1978). *Los subproductos animales su preparación y su aprovechamiento. Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación*. Italia. pp:69-87.
34. Marta, M., Patamia, M., Lupi, A., Antenucci, M., Di Iorio, M., Romeo, S., Petruzzelli, R., Pomponi, M., and Giardina, B. (1996). Bovine Hemoglobin cross-linked through the β chains. *J. Biol Chem.* 271:7473-7478.
35. Morrissey, P.A., Mulvihill, D.M. and O'Riordan, D. (1991) *Functional properties of blood proteins*. En: *Developments in Food proteins-7*. Hudson, B. J. F. USA, pp:125-158.
36. Nakamura, R., Hayakawa, S., Yasuda, K., and Sato, Y. (1984). Emulsifying properties of bovine blood globin: a comparison with some proteins and their improvement. *J. Food Sci.* 49: 102-104.
37. Novo Nordisk. S/A. Decoloración de sangre de matadero mediante la aplicación de Alcalase® 2.4L. *Hoja de aplicación*. pp:1-7.
38. Novo Nordisk. (1993). Alcalase® Food Grade. *Hoja de aplicación* 318c-GB. pp:1-4

39. Novo Nordisk. (1995). Enzymatic hydrolysis of proteins using Novo Nordisk proteases. *Hoja de aplicación B 163h-GB*. pp:1-4.
40. Ockerman, H.W and Hansen, C. L. (1994). *Industrialización de subproductos de origen animal*. Ed. Acribia. Zaragoza, España, pp:239-63.
41. Parés, D., Saguer, J., Suñol, J. J. and Carretero, C. (1998). Functional properties of heat induced gels from liquid and spray-dried porcine blood plasma as influenced by pH. *J. Food Sci.* 63: 958-961.
42. Pearce, K.N. and Kinsella, J.E.(1978). Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique. *J. Agric. Food Chem.* 26: 716-723.
43. Pearson, D. (1976) *The Chemical Analysis of Foods*. 7th edition, Ed. Churchill Livgstone, London. pp: 19-20.
44. Piña, O., Schimidhofer, T., Fisher, A. and Jurgen, S.(1994). *Tecnología e higiene de la carne*. Ed. Acribia. Zaragoza, España. pp:72-79.
45. Qi, M., Hettiarachchy, N.S., and Kalapathy, U. (1997). Solubility and emulsifying properties of soy protein isolates modified by pancreatin. *J. Food Sci.* 62:1110-1115.
46. *Recommended Dietary Allowances*. (1989). 10th Edition. National Research Council. Washington. pp: 67.
47. Rodríguez, P. F. (1986). Obtención de globina de bovino; posibles alternativas de uso como aditivo alimentario. *Tesis profesional Facultad de Química. UNAM*. pp:12-20, 94.
48. Rossi-Fanelli, A., Antonini, E. and Caputo, A. (1958). Studies on the structure of hemoglobin. Physicochemical properties of human globin. *Biochim. Biophys. Acta*, 30:608-615.
49. Satterlee, L. D. (1975) Improving utilization of animal by-products for human foods. A review. *J. Animal Sci.* 41:2 687-697.
50. Sato, Y., Hayakawa, S., and Hayakawa, M. (1981). Preparation globin trough carboxymetyl cellulose chromatography. *J. Food Technol.* 16:81-91.
51. Shahidi, F., Naczki, M., Rubin, L. J., and Diosady, L. L. (1984). Functional properties of blood globin. *J. Food Sci.* 49:370-372

52. Stryer, L. (1995) *Bioquímica*. 4ª Edición, Ed. Reverté. Barcelona, España. pp: 145-157,735.
53. Tybor, P.T; Dill, C. W. And Landmann, W. A. (1973). Effects of decolorization and lactose incorporation on the emulsification capacity of spray-dried blood protein concentrates. *J. Food Sci.* 38:4-6.
54. Tybor, P.T., Dill, C.W., and Landmann, W.A. (1975). Functional properties of proteins isolated from bovine blood by a continuous pilot process. *J. Food Sci.* 40:155-159.
55. Váldez, R. D. (1998) Recuperación de las proteínas del plasma de sangre de cerdo, conservación e incorporación en queso tipo manchego. *Tesis profesional*. Facultad de Química. UNAM.
56. Wismer-Pedersen (1987). Decoloration of blood by hem oxidation. *Proceedings of the European meeting of Meat Research Workers*; Helsinki, Finland, 2-7 Aug, Nº 33., Vol. 1, 3:6, pp. 119-123.
57. Zoon, L. Y., Min, W. R., and Nakai, S. (1990). Preparation of colorless globin from bovine hemoglobin using sodium alginate. *J. Food Sci.* 55:577-578.