

**Títol del treball: Estabilització d'un colorant alimentari derivat d'hemoglobina per deshidratació – encapsulació.**

---

**Estudiant: Andrea Morales Vicén.**

**Grau en Biotecnologia**

**Correu electrònic: [andreaa.194@hotmail.com](mailto:andreaa.194@hotmail.com)**

**Tutor: Dra. Maria del Carmen Carretero Romay**

**Cotutor\*: Dra. Maria Vilanova Bruges**

**Empresa / institució: Laboratoris de Tecnologia dels Aliments (EPS).**



# ÍNDIX

1. RESUM.....	2
1.1. Català.....	2
1.2. Castellano .....	3
1.3. English .....	4
2. INTRODUCCIÓ.....	6
2.1. Indústria dels subproductes.....	6
2.2. La sang com a subproducte.....	7
2.3. La sang com a colorant alimentari .....	8
2.4. Procés d'assecamment.....	9
3. OBJECTIUS .....	10
4. METODOLOGIA.....	10
4.1. Obtenció de la fracció cel·lular.....	10
4.2. Obtenció de la fracció hemolitzada .....	11
4.3. Derivatització de l'hemoglobina .....	11
4.4. Deshidratació per atomització .....	12
4.5. Mètodes per la caracterització del producte obtingut. ....	13
4.5.1. Color .....	13
4.5.2. Activitat de l'aigua.....	14
4.5.3. Humitat.....	14
4.5.4. Cendres.....	14
4.5.5. Nitrogen total i quantitat de proteïna.....	15
4.6. Anàlisi qualitatiu de l'aplicabilitat del producte .....	15
4.7. Estudi d'estabilitat.....	16
5. RESULTATS I DISCUSSIÓ .....	16
5.1. Caracterització de la matèria primera.....	16
5.2. Composició del colorant.....	17
5.3. Color i estabilitat del color .....	18
5.4. Proves d'aplicabilitat .....	20
6. CONCLUSIONS .....	23
7. BIBLIOGRAFIA .....	24

# 1. RESUM

## 1.1. Català

La gran demanda d'aliments i de nivells de nutrició adequats, així com la disminució de la disponibilitat de matèries primeres són temes que actualment requereixen de la nostra atenció. Tanmateix, la preocupació creixent per l'augment de la contaminació i dels milers de tones de residus que acaben vessats al medi ambient han esdevingut matèries d'importància en quant a que fer i com solucionar el problema de les deixalles. Particularment, la indústria de la carn, que és una de les indústries que aconsegueix un menor rendiment (malgrat la seva grandària i la quantitat de vendes que realitza) és la que necessita un major esforç pel que fa a la reducció de costos, mitjançant la renovació dels seus mètodes i processos de planta, la recuperació dels residus i la reutilització d'aquests, reconvertint els residus en productes útils per al consum humà i/o animal.

La sang que resta després del sacrifici del bestiar és un dels subproductes dels quals s'investiga la revalorització degut a les seves propietats nutritives, per la gran quantitat de proteïnes que conté i sobretot per contenir ferro del tipus hemo, el qual genera un valor afegit en el producte final al que s'afegeix aquest subproducte.

El present treball té com a objectiu principal la millora de l'estabilitat d'un colorant en pols, prèviament desenvolupat pel grup de recerca de Tecnologia dels Aliments de l'INTEA, produït a partir d'hemoglobina procedent de sang de porcs aptes pel consum, derivatitzada prèviament al seu asseccament; així com la caracterització del producte obtingut.

El sistema d'assecatge utilitzat en aquest treball, l'assecatge per atomització o *spray dryer*, permet obtenir un producte en pols que presenta un bon manteniment del color durant el procés; l'encapsulament del derivat d'hemoglobina, obtingut durant el mateix asseccament en esprai, hauria de millorar l'estabilitat del producte durant el seu emmagatzematge i també permetre la seva utilització en productes d'un ample interval de pH.

Els resultats obtinguts mostren que, malgrat la variabilitat esperable en la matèria primera i el procés d'asseccament, s'obté un producte homogeni i amb molt bon color. El producte presenta baix percentatge d'humitat residual i baixa activitat de l'aigua. La quantitat de cendres, així com l'alt percentatge de proteïnes que presenta el colorant suggereixen que el producte té un alt valor nutritiu i, a més del seu potencial com a colorant, podria ser utilitzat com a suplement en dietes pobres en nutrients.

Respecte els resultats obtinguts en la determinació del color, caracteritzat mitjançant els paràmetres CIEL\*a\*b\* i de l'estabilitat durant el temps es pot concloure que l'ús de l'encapsulant, permet una millora en la qualitat del color, que manté les seves característiques durant el procés d'asseccament, i també una bona estabilitat durant l'emmagatzematge en refrigeració reflectits en la lluminositat, i l'elevat valor de la coordenada del color vermell (a\*).

Les proves de concepte en gelatines han pretès reproduir l'aplicació del producte en pols, emulant el destí final del colorant sobre els aliments.

Els resultats obtinguts en les mostres de pH lleugerament àcids respecte les de pH 4.5 o inferior, on el color esdevé marró de manera immediata, ens permeten concloure que el colorant en pols actual només seria aplicable a productes de pH neutre o lleugerament àcid ( $\geq 5$ ).

## 1.2. Castellano

La gran demanda de alimentos y de niveles de nutrición adecuados, así como la disminución de la disponibilidad de materias primas son temas que actualmente requieren de nuestra atención. Sin embargo, la preocupación creciente por el aumento de la contaminación y de los miles de toneladas de residuos que acaban en el medio ambiente se han convertido en materias de importancia en cuanto a qué hacer y cómo solucionar el problema de los desechos. Particularmente, la industria de la carne, que es una de las industrias que presenta un menor rendimiento (a pesar de su tamaño y la cantidad de ventas que realiza) es la que requiere de un mayor esfuerzo en cuanto a la reducción de gastos mediante la renovación de sus métodos y procesos de planta, la recuperación de los residuos y la reutilización de los mismos, reconvirtiendo los residuos en productos útiles para el consumo humano y animal.

La sangre que queda después del sacrificio del ganado es uno de los subproductos investigados para su revalorización gracias a sus características nutritivas, por la gran cantidad de proteínas que incluye y sobre todo por contener hierro del tipo hemo, el cual genera un valor añadido en el producto final al que se le añade este subproducto.

El presente trabajo tiene como objetivo principal la mejora en la estabilidad de un colorante en polvo, previamente desarrollado por el grupo de investigación de Tecnología de los Alimentos del INTEA, producido a partir de hemoglobina procedente de sangre de cerdo apto para el consumo, y previamente derivatizada antes del secado, así como la caracterización del producto final.

El sistema de secado usado en este trabajo, el secado por atomización o *spray dryer*, permite obtener un producto en polvo que presenta un buen mantenimiento del color durante el proceso; el encapsulamiento del derivado de hemoglobina, obtenido durante el mismo secado en espray, debería mejorar la estabilidad del producto durante su almacenaje y también permitir su utilización en productos de intervalo amplio de pH.

Los resultados obtenidos muestran que, a pesar de la variabilidad esperable en la materia prima y el proceso de secado, se obtiene un producto homogéneo y de buen color. El producto presenta un bajo porcentaje de humedad residual y una baja actividad del agua. Las cenizas, así como el alto porcentaje de proteínas que presenta el colorante sugieren que el producto contiene un alto valor nutritivo y, además de su potencial como colorante, podría ser utilizado como suplemento de dietas pobres en nutrientes.

Respecto a los resultados obtenidos en la determinación del color, caracterizado a partir de los parámetros CIEL\*a\*b\* y de la estabilidad durante el tiempo se puede concluir que el uso del encapsulante, permite una mejora en la calidad del color, que mantiene sus características durante el proceso de secado, así como una buena estabilidad durante el almacenaje reflejados en su luminosidad y en el elevado valor de la coordenada de color rojo (a\*).

Las pruebas de concepto en gelatinas han pretendido reproducir la aplicación del producto en polvo, emulando el destino final del colorante sobre los alimentos. Los resultados obtenidos en las muestras de pH ligeramente ácidos respecto las de pH 4.5 o inferior, donde el color de la emulsión se torna marrón de manera casi inmediata, nos permiten concluir que el colorante en polvo actual sólo sería aplicable como colorante rojo en productos de pH neutro o ligeramente ácido ( $\geq 5$ ).

### **1.3. English**

The high demand of food, adequate nutrition levels, as well as the decreasing on the availability of raw materials, are topics that nowadays require our attention. However, the growing concern about the increasing on pollution and the thousands of tons of waste that end up in our environment have become important matters. What can we do and how can we solve the problem of waste? Specifically, the meat industry, which is one of the industries that has a lower yield (despite its size and the amount of gross sales carried out), is the one that requires more effort in terms of reducing expenses; by renewing its methods and plant processes, waste recovery and the reuse of the leftovers, they can transform the waste into useful products for human and animal consumption.

The blood that remains after slaughter of livestock is one of the products that is currently under investigation for its recovery and exploitation, thanks to its nutritional characteristics, its high content in proteins and specially because of the heme iron that it contains.

The aims of this work were the characterization and the improvement of the stability of a food colorant, which had been previously developed by the Food Technology research group of INTEA. The colorant consisted on a haemoglobin-based powder derived from hygienically collected porcine blood suitable for human consumption purposes.

The drying system used in this work, called spray drying, provides a powdered product that maintains an acceptable red colour during all the process but tends to worsen during storage. The encapsulation of the haemoglobin derivative, which can be achieved simultaneously to the dehydration during the spray-drying process, should allow an improvement in stability and expand the pH range at which it can be applied.

Taking into consideration the results of this work, despite the variability due to the raw materials and the drying process, the obtained product was sufficiently homogeneous and showed a good colour. The product has low moisture content and water activity. The amount of ash, as well as the high percentage of proteins, suggests that the product shows a high nutritional value and can be used as a supplement in diets that are poor in nutrients.

Regarding the results related to the colour, characterized by CIEL\*a\*b\* parameters, it can be deduced that the use of the encapsulating agent improved the colour quality, aiding at maintaining the characteristics during the drying process, and providing a good stability through refrigerated storage, noticeable from its high brightness (L\*) and redness (a\*) coordinates.

The concept tests were carried out on gelatine matrices used as model systems. These tests attempted to reproduce the behaviour of the colorant powder applied in foods. The results obtained on samples at slightly acidic pH, compared to the samples at  $\text{pH} \leq 4.5$  where the colour of the gels turned brown immediately, showed that currently the product can be used as red dye only on products with neutral or slightly acidic pH ( $\geq 5$ ).

## 2. INTRODUCCIÓ

### 2.1. Indústria dels subproductes

Segons la legislació de la Comissió Europea, un subproducte és una substància o objecte, resultant d'un procés de producció, l'objectiu principal del qual no és la producció d'aquest element (By-products - European Commission", 2016). La majoria dels subproductes de la indústria càrnica es produeixen durant el sacrifici del bestiar i consisteixen en la porció d'un animal sacrificat que no pot ser venut com carn o utilitzar-se en productes carnis. Aquest tipus de residus inclouen els ossos, els tendons, la pell, el contingut del tracte gastrointestinal, la sang i els òrgans interns. A la *taula 1* es troben les proporcions entre la carn i els subproductes de diversos animals (ABPs, *Animal By-Products*), que ens donen una aproximació de la quantitat de subproductes que produeix cada cap de bestiar.

**Taula 1.** Estimació de la proporció de carn consumible i subproductes que conté cada animal utilitzat en la Indústria alimentària. Font: (Leoci, 2014).

Espècies ramaderes	Per consum humà	ABP's (comestibles i no comestibles)
Boví	55	45
Aviram	70	30
Porcí	60	40
Oví i Cabrum	50	50

Cal tenir en compte però que les espècies mostrades a la *taula 1* no són utilitzades a tots els països, ja que per exemple a l'Índia el bestiar boví es considera sagrat i no es pot consumir o en els països musulmans la carn de porc es troba vetada (Jayathilakan, Sultana, Radhakrishna, & Bawa, 2011). Tanmateix cal tenir present que una gran part dels subproductes no són adequats pel consum humà, com són les plomes o el cuir provinent de la pell del bestiar, les banyes, etc. El destí final d'aquests subproductes no consumibles pot anar destinat a pinsos pel consum animal, cosmètics, biogàs o fins i tot productes farmacèutics.

La producció global d'ABPs derivats de carn i altres productes animals mou aproximadament 60 milions de tones de producte a l'any. S'ha estimat que d'aquesta quantitat de producte, només a la Unió Europea, uns 10 milions de tones no destinades a consum humà provenen d'animals sans (Meeker & Hamilton, 2006). En l'escorxador, s'elimina una quantitat considerable del total consumible de l'animal, i es descarta com a residu. Una classificació incorrecta podria ser la causa de dany ambiental o costos innecessaris per a les empreses o els escorxadors.

Els ABPs que no poden ser destinats en el mercat del consumidor, que no poden ser utilitzats com a fertilitzant, no són adequats per la producció de biogàs o per generar compost, es poden considerar com a residus de risc per la salut pública i animal. Un ús inadequat de subproductes històricament ha resultat en brots de malalties greus, com l'Encefalopatia espongiforme bovina, el brot de grip aviària o la pesta porcina clàssica.



## 2.2. La sang com a subproducte

La sang de procedència animal és una gran font de proteïnes i ferro, així com d'altres ions minerals. En el procés de recol·lecció de la sang per a ús alimentari és indispensable partir d'animals sans que han de passar les inspeccions, ha de ser recollida en condicions especials i no pot patir contaminacions degudes a la tècnica del dessagnat, del sistema de drenatge, etc.

La majoria de productes derivats de la sang animal provenen de la fracció plasmàtica d'aquesta, la qual mostra activitat gelificant, solubilitzant i emulsificant, d'entre altres.

En la indústria alimentaria la sang dels animals s'utilitza amb tota mena d'usos, sobretot com a colorant o saboritzant, però trobem d'altres usos, resumits a continuació:

- La sang i els seus derivats són potencialment utilitzables com a font de pèptids antioxidants, antihipertensius, i pèptids antibacterians, així com s'han aïllat proteïnes que han demostrat efectes beneficiosos com a analgèsics o anticonceptius.
- La botifarra negra i la "morcilla" són aliments acceptats a diverses cultures, on el color negre que pren l'hemoglobina de la sang al ser cuinada, que en altres aliments seria indicatiu de que el menjar s'ha malmès, és característic d'aquest aliment.
- Com a aglutinant, ja que la seva estructura macromolecular presenta la capacitat de formar matrius que mantenen aromes naturals i nutrients, així com retenir eficientment grans quantitats d'aigua.
- La sang conté components que poden actuar com a adhesius naturals de carn i altres productes. De la sang animal es poden extreure components com la trombina i el fibrinogen, que combinades produeixen la fibrina. Una utilitat seria unir talls de carn de peces individuals amb la finalitat de formar talls més grans; si s'afegeix transglutaminasa a la barreja (present també en sang), aquesta unirà la fibrina al col·lagen present en la carn, unint els talls de carn (Lennon, McDonald, Moon, Ward, & Kenny, 2010). Un exemple seria la confecció de salsitxes sense "pell", suficientment cohesionades com per mantenir els talls de carn units.
- Per la seva composició aminoacídica la sang pot ser utilitzada com a font de proteïnes diària, sobretot en països poc desenvolupats, i especialment com a complement alimentari en infants malnodrits, afavorint el desenvolupament físic i mental gràcies a que la sang d'animal sol ser un recurs barat, disponible i que ha mostrat efectes positius en animals amb carències nutritives (Oshodi, Beames, & Nakai, 1997).
- Com a colorant alimentari, sobretot per productes carnis d'origen boví i porcí.

La sang que no anirà destinada a consum humà, pot anar dirigida a alimentació de bestiar, assecant-la i incorporant-la en les racions que prenen els animals com a aliment, aportant estabilitat als greixos que contenen els pinsos d'engreix.

El percentatge de pes que representa la sang dels mamífers sobre el pes total és d'entre un 5 i un 7%, un percentatge que es veu disminuït si se li elimina l'aigua (la sang es compon en un 91% d'aigua i un 8% de proteïnes), però que continua representant una part considerable de la massa total del animal.

Si tenim en compte que només es recupera un 50% de la sang en l'escorxador (la resta queda retinguda als capil·lars, a les peces de carn, i als òrgans de l'animal), i que d'aquest percentatge només entre un 5-8% pot ser correctament recollit (mitjançant la tècnica del dessagnat, de manera higiènica i evitant contaminacions), la resta, que comprèn entre un 42-45%, si no és correctament recuperada i eliminada pot ser causa de problemes de contaminació ambiental (Wismer-Pedersen, 1988).

Amb la creixent demanda de menjar dels països desenvolupats, en un futur no serà possible afrontar l'eliminació dels contaminants que produeixen aquestes grans quantitats de proteïna animal, i per tant és necessari buscar solucions en les què tant el medi ambient com els consumidors surtin beneficiats (Bah, Bekhit, Carne, & McConnell, 2013).

### **2.3. La sang com a colorant alimentari**

L'aparença superficial i el color en els productes carnis són els dos primers paràmetres de qualitat avaluats pels consumidors. Aquests es consideren factors crítics per l'acceptació dels consumibles per part del usuari.

Per a la indústria de la carn, l'ús de la sang ha esdevingut indispensable com a subproducte, ja que se la considera com una font rica en ferro del tipus hemo, com un additiu molt nutritiu i funcional.

Afegida en estat líquid, la sang no se sol utilitzar extensament ja que què aporta negror als productes carnis, degut a la seva ràpida oxidació i la pèrdua de vermellor. D'entre les maneres de solucionar el problema de la pèrdua de color trobem mètodes com la decoloració mitjançant la disrupció del grup hemo (Brückner, 1991) (malgrat que aquest procediment genera aromes no desitjats que malmeten l'aliment); altre possible solució seria afegir monòxid de carboni (CO), i convertir la solució d'hemoglobina en carboxihemoglobina, un producte molt més estable, que permet mantenir el color fins i tot després de sotmetre'l a una pasteurització (Fontes, Gomide, Fontes, Ramos, & Ramos, 2010). Malauradament, la preservació amb CO no manté el color més enllà d'un període de 4 dies en refrigeració, i a més està prohibit l'ús de CO en aliments per la seva toxicitat.

Un dels estats més interessants de preservació de la sang com a colorant alimentari és la hemoglobina en pols; aquesta s'aconsegueix mitjançant una deshidratació per atomització (Toldrà, 2002) que ajuda a mantenir les característiques del color, així com redueix la quantitat d'aigua en el producte millorant la seva estabilitat. La línia de la recerca es troba ara en la millora del colorant en els processos de conservació, emmagatzematge i aplicabilitat.

Aconseguir un colorant estable a partir de la sang, seria una bona forma de valoritzar la fracció cel·lular que acostuma a presentar dificultats en la seva aplicació, pel que sovint esdevé un residu que cal destruir.

## 2.4. Procés d'asseccament

La deshidratació d'un producte es dona mitjançant un procés on es converteix una solució de dos o més components en estat líquid a pols. Aquesta evaporació es dona eliminant el dissolvent de la solució. D'entre els diversos mètodes d'asseccament trobem els forns, els liofilitzadors o els evaporadors rotatoris, que produeixen productes en pols, però les partícules que generen presenten formes i mides irregulars a més de sotmetre als productes a elevades temperatures durant el tractament, que poden perjudicar la seva qualitat.

Els primers processos d'asseccament per "spray drying" daten d'entre 1860 i 1872, on va sorgir el primer disseny patentat (USA patent no 125,406), i no va ser fins 50 anys després que va aparèixer el primer model comercial. La idea bàsica d'aquest procés és la producció de partícules que, dispersades per acció d'un fluid d'alimentació, es separen i evaporen el seu dissolvent, sense sotmetre'l a escalfament, ja que la calor aportada s'inverteix en l'evaporació de l'aigua. La *figura 1* correspon al spray dryer utilitzat durant les pràctiques.

Aquesta dispersió s'aconsegueix a partir de la barreja d'un gas calent amb un fluid atomitzat, el qual esdevé gotes amb una alta relació superfície/massa. Tot això succeeix a la cambra d'asseccatge, on el dissolvent s'evaporarà ràpidament i uniforme gràcies al contacte directe entre les gotes de producte i el gas escalfat.

El desenvolupament de la tècnica se sol donar a partir del tractament dels punts crítics del procés, que permeten una millora en la qualitat del pols i en la reducció dels costos. Cal doncs conèixer extensament el procés i establir un protocol de control exhaustiu. Aquests punts són:

- Preparació de l'alimentació: el fluid d'alimentació ha de ser homogeni, bombejable i lliure d'impureses.
- Atomització: és el punt més crític, on es transforma l'emulsió alimentada en gotes. Es controla la mida de les partícules i per tant l'asseccament.
- Asseccament: cal mantenir les fases en equilibri constant, on l'aigua pugui ser ràpidament evaporada de les partícules per difusió del líquid en la superfície del pols.
- Refredament i emmagatzematge de la pols ("The Spray Drying Process", 2016).



**Figura 1.** Imatge del Mini Spray Dryer B-290 de Büchi utilitzat durant aquestes pràctiques. ("Mini Secador por aspersion B-290 - buchi.com", 2016)

### 3. OBJECTIUS

The main objective of this study is to improve the stability throughout time of a red colorant, previously developed by the Food Technology research group of INTEA, made from the derivatization of porcine haemoglobin with nicotinamide, sucrose and a modified polysaccharide encapsulation agent.

The ultimate goal of this research is to obtain a natural red colorant for the food industry, based on the recovery and exploitation of an abundant by-product, so is porcine blood from slaughterhouses.

The principal objective is composed by the following specific purposes:

- Characterization of the final product by analysing water activity, ashes and moisture contents, the amount of proteins as well as the colour parameters, by means of the CIEL\*a\*b\* system.
- Study of colour stability during refrigerated storage.
- Qualitative analysis of the applicability of the product at different pHs.

### 4. METODOLOGIA

La sang utilitzada en aquest treball procedia d'un escorxador industrial localitzat a Riudellots de la Selva, Girona, on la sang es recull de manera higiènica, se li afegeix Polifosfat sòdic a l'1% com a anticoagulant i es conserva en contenidors refrigerats. Les mostres es recollien el mateix dia que es processaven, en recipients estèrils dels contenidors de l'escorxador, els recipients es mantenen refrigerats fins al processament de les mostres als laboratoris de l'Institut de Tecnologia Agroalimentària (INTEA), a la Universitat de Girona.

Es van fer quatre repeticions de l'obtenció del colorant i les determinacions de composició, color i estabilitat, per tal de tenir resultats concloents.

Cal tenir en compte que hi ha certa variabilitat en les característiques de la matèria primera i també en el resultat dels tractaments aplicats.

Per garantir la fiabilitat de les repeticions, els quatre tractaments es van realitzar sobre mostres de sang recollides en idèntiques condicions però dies diferents.

#### 4.1. Obtenció de la fracció cel·lular

Per separar la fracció cel·lular del plasma es realitzava una centrifugació de la sang en condicions 5-10 °C a 4080 RPM/2830 RCF durant 15 minuts en una centrífuga de tipus discontinu (Dupont Co. Newton, Connecticut, USA). Les condicions de centrifugació permetien una correcta separació del plasma (fase lleugera) i la fracció cel·lular (fase densa).

Per separar aquestes dues fases es duia a terme una decantació manual del plasma i una posterior filtració de la fracció cel·lular per eliminar possibles coàguls i impureses.

## 4.2. Obtenció de la fracció hemolitzada

La fase densa obtinguda en la decantació es sotmetia a un tractament d'hemòlisis, per aconseguir trencar la membrana dels eritròcits i així obtenir l'hemoglobina lliure. El procés d'hemòlisi es duia a terme en un homogeneïtzador de vàlvules d'alta pressió (FPG 4755 Stansted Fluid Power Ltd., Essex, Regne Unit) en condicions de 5 bars de pressió d'alimentació i 20 MPa de pressió d'homogeneïtzació.

## 4.3. Derivatització de l'hemoglobina

En estudis anteriors (Saguer et al., 2003) s'ha determinat que cal ajustar el pH de la sang hemolitzada a 8, ja que aquest és el valor que ha donat millor resultat en l'efecte de la Nicotinamida per a la prevenció de l'oxidació de l'hemoglobina durant l'asseccament. L'ajust de pH es realitzava amb l'ajuda d'un pH-metre en continu (CRISON, GPL 22, Alella, Barcelona, Espanya) en agitació (PSelecta, Agimatic-E, Barcelona, Espanya) amb hidròxid sòdic NaOH 0.1M.

Per evitar l'oxidació de l'hemoglobina, a part de la Nicotinamida (Acros organics, New Jersey, USA) s'afegeixen altres compostos amb capacitat per estabilitzar el  $Fe^{2+}$ , com la sacarosa (sucre comercial) i un agent encapsulant (EX2). Per aquests experiments s'afegien a 200 mL de solució d'hemoglobina hemolitzada 20 g de sacarosa, 0.2 g d'agent encapsulant i 7 g de Nicotinamida, deixant un marge entre addicions de 2-5 minuts.

Previ al següent pas i un cop afegits tots els additius, l'hemoglobina derivatitzada es mesclava amb una batidora per aconseguir una mescla homogènia i oxigenar l'hemoglobina, i així aconseguir que la forma majoritària fos l'oxihemoglobina, de coloració vermella intensa.

Aquest pas és clau en el procés, ja que el color final del colorant depèn de l'estat de la molècula d'hemoglobina (figura 2). En condicions normals l'hemoglobina es troba en un equilibri dinàmic dels seus diferents estats, com a oxihemoglobina ( $O_2Hb$ ), hemoglobina (Hb) i metahemoglobina (MHb).

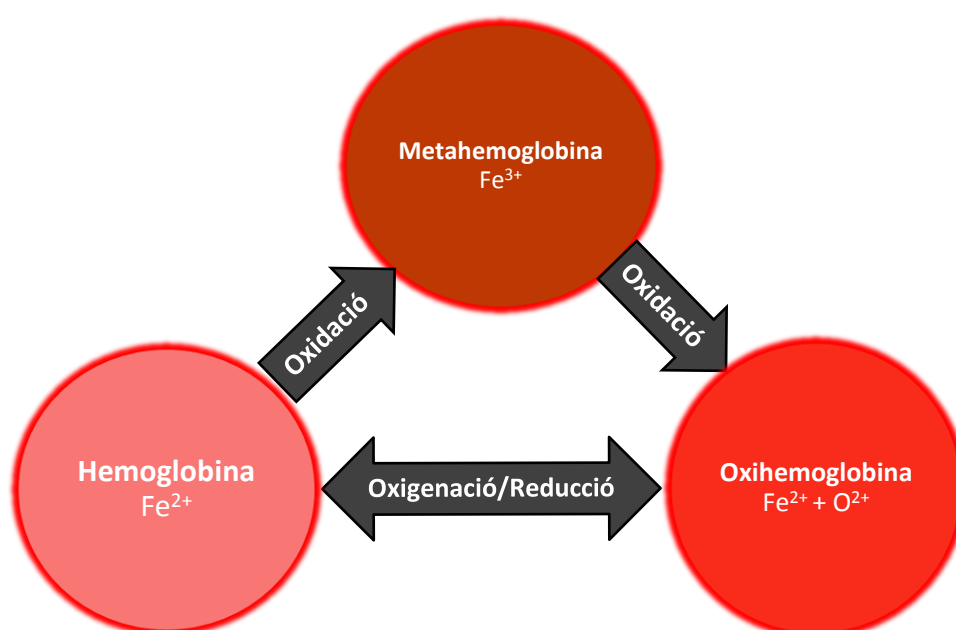


Figura 2. Canvis de color de l'hemoglobina en funció de l'estat del ferro. Font: elaboració pròpia.

#### 4.4. Deshidratació per atomització

L'hemoglobina derivatitzada era deshidratada per atomització en un equip de laboratori (Büchi Mini Spray Dryer B-290), amb condicions de temperatura d'entrada de l'aire per a la deshidratació (inlet) de 120 °C, de temperatura de sortida del producte (outlet) fixada en 70 °C (oscil·lació màxima de 70-76 °C), la bomba peristàtica al 40% de capacitat que equival a un flux de 800 mL/h i l'aspiració al 100%.

La deshidratació per atomització es basa en la polvorització del producte i la posterior deshidratació mitjançant l'escalfament ràpid d'aquest, que permet la vaporització de l'aigua que conté el producte (figura 3). Gràcies a les condicions de l'assecatge i la velocitat a la que es duu a terme aquest el producte no perd les qualitats organolèptiques i manté el color vermell, que posteriorment serà analitzat qualitativament i quantitativa.



**Figura 3.** Colorant en pols a partir de sang de porc pel mètode de deshidratació per atomització obtingut als laboratoris de l' INTEA. Font: elaboració pròpia.

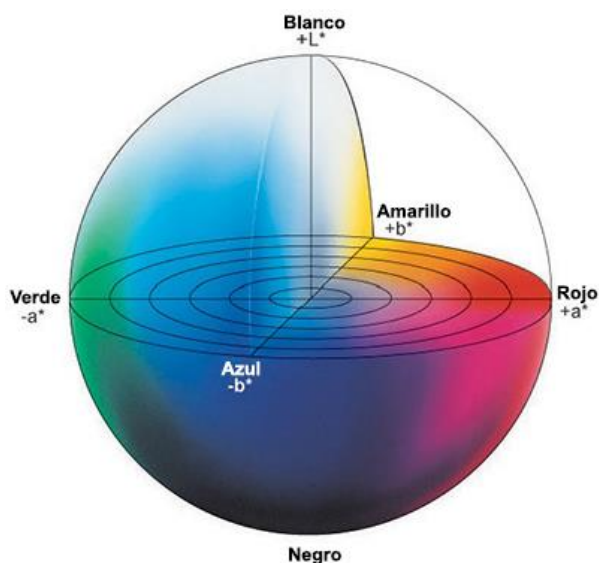
## 4.5. Mètodes per la caracterització del producte obtingut.

En el següent apartat es descriuran les tècniques emprades en l'anàlisi qualitatiu i quantitatiu del producte: valor de l'activitat de l'aigua, % d'humitat, cendres i proteïna, i color.

### 4.5.1. Color

El color és un paràmetre físic relacionat amb les diferents longituds d'ona corresponents a la zona del visible de l'espectre electromagnètic, i que el nostre ull pot percebre. El mètode utilitzat per a la determinació del color de les mostres és el sistema CIE Lab (CIE  $L^*a^*b^*$ ), ja que té l'avantatge de ser un mètode de percepció uniforme, es basa en la teoria del color que indica que els colors no poden ser vermells i verds, o grocs i blaus alhora.

Aquest mètode doncs és una transformació matemàtica del sistema colorimètric publicat pel CIE (Internacional Commission of Illumination) en 1931. La localització de qualsevol color en el espai del model (figura 4) és determinat per les coordenades del color:  $L^*$  (lluminositat, on el valor de 0 és el negre i el de 100 el blanc),  $a^*$  (coordenada vermell/verd, on els valors positius corresponen al color vermell i els negatius al color verd), i  $b^*$  (coordenada groc/blau, on els valors positius i negatius representen la quantitat de groc o blau, respectivament). Aquestes coordenades són adimensionals, però els eixos es defineixen com tri-dimensionals (Hui, 2006).



**Figura 4.** Esfera colorimètrica CIE 1976  $L^*a^*b^*$  basada en un model de 3 dimensions. *Commission Internationale d'Eclairage*, 1979.

En el cas del colorant d'hemoglobina porcina, els paràmetres d'interès són l' $a^*$ , o intensitat de vermell, i la  $L^*$ , que indica lluminositat.

Per realitzar la determinació del color es va utilitzar un colorímetre portàtil (Minolta Co, Ltd., Osaka, Japó) que presenta una àrea de mesura de 8 mm de diàmetre i una geometria d'il·luminació difusa/angle de visió de  $0^\circ$  amb un il·luminat D65. El calibratge del colorímetre es realitzava abans de prendre les mesures amb una placa ceràmica de referència de color blanc.

Les mesures del colorant en pols es van realitzar per triplicat i en les gelatines per duplicat, degut a que en pols apareix una variabilitat major a l'hora de prendre la mesura.

#### 4.5.2. Activitat de l'aigua

L'activitat de l'aigua ( $a_w$ ) ve determinada per la pressió de vapor parcial de l'aigua que conté una substància respecte la pressió de vapor estàndard de l'aigua pura a la mateixa temperatura. Aquest paràmetre és àmpliament utilitzat per a estimar la capacitat de conservació dels aliments a temperatures determinades, ja que amb  $a_w$  elevades solen ser més susceptibles al desenvolupament de microorganismes no desitjat.

La determinació de l'activitat de l'aigua del nostre producte es va realitzar amb un higròmetre elèctric que mesura el vapor d'aigua alliberat pel producte en una cambra. Aquesta humitat es captada per un sensor de clorur de Liti que li produeix un canvi de conductivitat, la variació del qual es troba directament relacionada amb la humitat relativa de l'aire i per tant, la del nostre producte.

La mesura es va realitzar a 20 °C amb un higròmetre Novasina Lab MASTER- $a_w$  (Novasina, Suïssa).

#### 4.5.3. Humitat

La humitat d'una substància es defineix com la quantitat d'aigua present en aquesta. El contingut d'humitat és un factor de qualitat de la conservació de productes, i pot ser una dada crítica en productes als quals la humitat és representativa del seu estàndard de qualitat.

La mesura de la humitat es basa en la pèrdua de pes del producte sota condicions d'alta temperatura. Per duplicat i en gresols de vidre resistents a alta temperatura s'escalfava la mostra a una temperatura de 105 °C durant 24h en una estufa de convecció (Selecta, CONTERM 52L, 2000200, Barcelona). La diferència de pes de la mostra abans i després de assecat-la es deu a la pèrdua d'aigua per deshidratació. La mesura es duia a terme en una balança de precisió de 0,1mg (GR-200-EC, A&D Instruments LTD., Japan).

#### 4.5.4. Cendres

Les cendres en els aliments són les restes constituïdes per residus inorgànics (sals minerals, per exemple) que queden després de sotmetre a combustió la matèria orgànica. És un paràmetre d'importància des del punt de vista econòmic i de la qualitat i característiques organolèptiques i nutricionals.

Amb la mateixa mostra utilitzada per a realitzar la determinació de la humitat es realitza una calcinació del producte en una mufla, a 550 °C, i una posterior quantificació mitjançant gravimetria.



#### 4.5.5. Nitrogen total i quantitat de proteïna

Per analitzar la quantitat de nitrogen total en el producte i estimar la quantitat de proteïna es va realitzar una determinació mitjançant el mètode *Kjeldahl* ("SD-Kjeldahl Method", 2016), que determina la quantitat de nitrogen en mesclades de substàncies que contenen sals d'amoni, nitrat, o compostos de nitrogen orgànic. Per preparar les mostres per la digestió, es va pesar amb precisió de 0.1 mg, 0.1 g de colorant aproximadament i es va col·locar sobre paper de cel·lulosa degradable, que no interfereix en la valoració. La determinació de nitrogen total es va realitzar per duplicat.

El mètode *Kjeldahl* consisteix de tres passos, que han de dur-se seqüencialment:

1. La mostra és digerida mitjançant l'addició de 15 mL d'àcid sulfúric i un posterior escalfament a una temperatura de 375 °C en un digestor (Gerhart KB20, Alemanya) en presència d'una pastilla de catalitzador (MERCK, 47.7% Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 47.7% K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2.8% TiO<sub>2</sub>, 1.8% CuSO<sub>4</sub>), el qual ajuda en la conversió del nitrogen a ions d'amoni (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>).
2. Aquests ions amoni són convertits a gas amoníac, escalfats i destil·lats, on seguidament seran solubilitzats en una solució d'àcid bòric al 4% i 2 gotes d'indicador mixt (vermell de metil i blau de metilè RV, Panreac, Barcelona). La destil·lació es realitza en un destil·lador automàtic (Buchi K314 distillation unit, Alemanya), on s'addiciona NaOH fins a observar totalment el canvi de color que indica el pH bàsic.
3. La valoració es realitza en relació a la quantitat d'amoníac dissolt en el flascó. El nitrogen present a la mostra inicial es pot determinar segons la quantitat de solució àcida valorant (HCl 0.1006 N) utilitzant l'equació 1.

**Equació 1.** Càlcul per la valoració de Nitrogen orgànic total de les mostres de colorant mitjançant el mètode Kjeldahl. El factor de conversió del Nitrogen utilitzat (6.25) depèn de la composició en aminoàcids de les proteïnes pròpies del producte. En aquest cas, correspon al factor de "proteïnes crues" ("Nitrogen conversion factor", 2016).

$$\frac{(V_{mL} \times N_{HCl}) \times \frac{1eq}{1000eq} \times 14.01g/eq}{xg(sample)} \times 100 = \% \text{ of Nitrogen} \times 6.25(\text{protein factor})$$

#### 4.6. Anàlisi qualitatiu de l'aplicabilitat del producte

Després de l'obtenció dels colorants en pols i posteriorment al seu emmagatzematge en fred, es van realitzar proves de concepte amb els colorants en gelatina (Rousselot, Sobel Company, Girona). L'objectiu era observar l'estabilitat del color durant el temps a diferents pH, ja que interessa mantenir un color vermell uniforme a diferents intervals de pH.

Per les proves amb gelatina es va determinar una concentració del 5% de gelatina amb un 0,1% de concentració del colorant, i es van realitzar les proves per cada tampó per triplicat en el primer experiment i per duplicat en el segon, degut a l'homogeneïtat de les mostres.

Per preparar les gelatines es van utilitzar aigua destil·lada (pH=6), tampó citrat-fosfat (pH=5), i tampó acètic-acetat (pH=4,3), el qual va ser descartat posteriorment i substituït pel tampó citrat-fosfat ajustat amb HCl 0.5 M, degut a la capacitat segrestant del citrat que pot beneficiar a l'estabilitat del ferro.

A l'hora de preparar la dissolució, es va preparar 2.5 g de gelatina en 50 mL de tampó, prèviament escalfat al microones fins a arribar a una temperatura de 70-80 °C.

Les solucions s'agitaven fins a la total dissolució de les gelatines, i quan aquestes tenien una temperatura aproximada de 40 °C, s'afegien 0.2 g de colorant en 40 mL de la mescla. Aquesta temperatura era la adequada per a tenir una bona dissolució del colorant sense malmetre el color.

Quan la mostra es trobava totalment dissolta i presentava un aspecte homogeni, s'abocava en plaques de petri i s'emmagatzemava en nevera.

#### 4.7. Estudi d'estabilitat

Tant les mostres del colorant en pols com les gelatines es van emmagatzemar en fred per a les posteriors proves de seguiment. Les mostres eren analitzades pel color en els dies 1, 2, 8 i 14 per a comprovar l'estabilitat del color i les gelatines eren analitzades en els dies 1, 2, 3, 7 i 14 en la primera prova i 1, 2, i 7 en el segon experiment, degut a que no es van observar canvis en la primera prova i a partir del dia 8 es començaven a observar fongs en les plaques de petri.

## 5. RESULTATS I DISCUSSIÓ

### 5.1. Caracterització de la matèria primera

La sang utilitzada per a l'experimentació d'aquest treball prové d'un escorxador industrial de la província de Girona, NORFRISA (Riudellots de la Selva) la qual es recollida del tanc refrigerat de magatzematge en recipients estèrils i amb la precaució de mantenir les característiques de la sang estables fins la seva utilització en els laboratoris de l'INTEA.

Aquesta sang va ser caracteritzada als laboratoris pels paràmetres de percentatge d'humitat i cendres després de ser hemolitzada, per a poder valorar el procés d'assecatge de la matèria primera i mesurar els components no combustibles de la sang (minerals com el ferro, potassi, magnesi, calci o sodi).

Així doncs, es van obtenir valors d'humitat de 67.523% i de cendres del 0.270%. Cal tenir en compte que la humitat de la sang porcina es troba al voltant del 80% i que el percentatge de cendres varia segons l'alimentació que ha tingut l'animal de la qual prové, però en el nostre cas treballem amb la part més concentrada, que és la fracció cel·lular (Madrid Vicente, 1999).

## 5.2. Composició del colorant

En obtenir el producte, es realitzaven proves per caracteritzar el colorant en pols. A la *taula 2*, es poden observar els valors obtinguts amb la desviació estàndard de cada mostra per a observar la variabilitat entre les diferents mesures realitzades.

**Taula 2.** Paràmetres obtinguts de composició en percentatge i activitat de l'aigua del colorant en pols. Les diferents mostres (M1, M2, M3 i M4) corresponen a les diferents repeticions. Es mostren els valors de les mitjanes de les mesures realitzades i la desviació estàndard ( $\pm$ ) d'aquestes, així com la mitjana global dels diferents paràmetres.

	$a_w$	Humitat	Cendres	Proteïna
M1	0,235 $\pm$ 0,008	5,7939 $\pm$ 0,0587	1,1028 $\pm$ 0,5208	72,59 $\pm$ 0,34
M2	0,225 $\pm$ 0,006	7,1402 $\pm$ 0,0490	1,9836 $\pm$ 0,1014	73,26 $\pm$ 0,12
M3	0,253 $\pm$ 0,009	6,4721 $\pm$ 0,3703	3,2309 $\pm$ 0,0430	73,51 $\pm$ 1,64
M4	0,229 $\pm$ 0,018	4,7439 $\pm$ 0,0320	2,5569 $\pm$ 0,1303	78,14 $\pm$ 1,12
Mitjana global	0,235 $\pm$ 0,012	6,0375 $\pm$ 1,0227	2,2185 $\pm$ 0,9017	74,37 $\pm$ 2,54

Els paràmetres resumits a la *taula 2* ens indiquen diferents característiques fisicoquímiques del producte, les quals ens donen una aproximació de la seva composició. Es pot observar que globalment no apareixen desviacions que indiquin diferències molt significatives de manera que podem afirmar que les repeticions són comparables.

L'activitat de l'aigua en tots els casos es troba al voltant del mateix valor, la desviació estàndard entre les diferents mesures i les repeticions és molt baixa i per tant no trobem diferències entre elles. Per sota de rangs d' $a_w$  de 0.60 es coneix que no hi ha proliferació microbiana, ja que no hi ha aigua disponible per al creixement de microorganismes i per tant, es garanteix una estabilitat enfront el deteriorament causat per reaccions biològiques. També es redueix el risc de degradació per reaccions fisicoquímiques.

En els valors d'humitat podem observar que es troba en valors baixos i per tant podem afirmar que la deshidratació per *spray-dryer* s'ha donat correctament. Les diferències observades s'expliquen per la variabilitat del mètode de deshidratació.

El percentatge de cendres d'aquest producte corrobora la gran quantitat de minerals que conté la sang de porc, i ens indica que aquest producte conté un alt nivell nutricional afegit. Les diferències en quant a la desviació estàndard entre les diferents mesures són baixes i entre replics no superen el valor de 0.9 punts.

L'anàlisi de les proteïnes en el producte va mostrar força homogeneïtat amb excepció de la mostra 4, que coincideix amb la que té menys humitat, fet que justifica en part aquesta diferència. Els percentatges obtinguts ens indiquen un alt contingut proteic en el producte.

### 5.3. Color i estabilitat del color

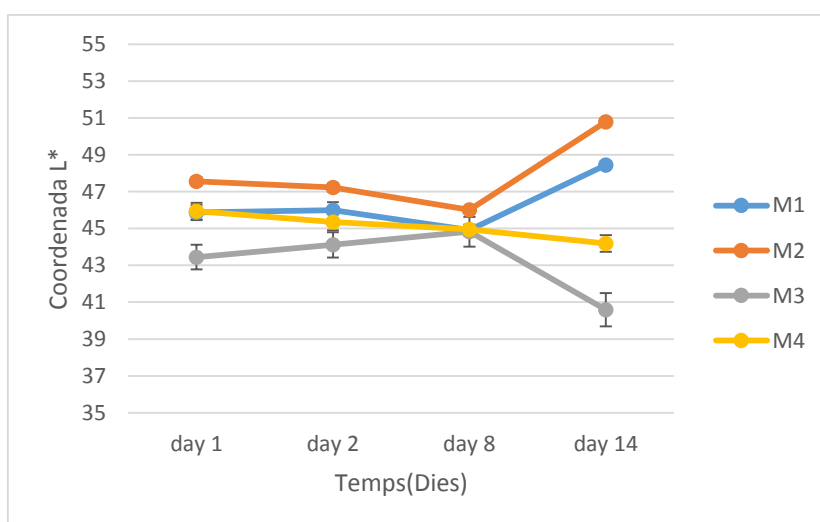
Per determinar el color de les mostres es va realitzar una anàlisi mitjançant el mètode CIEL\*a\*b\* de les mostres de colorant, posteriorment al tractament i la deshidratació del producte. A la *taula 3* s'observen els valors obtinguts.

**Taula 3.** Mitjana dels paràmetres L\*a\*b\* de les diferents repeticions realitzades i la seva desviació estàndard ( $\pm$ ), així com la mitjana global dels diferents paràmetres.

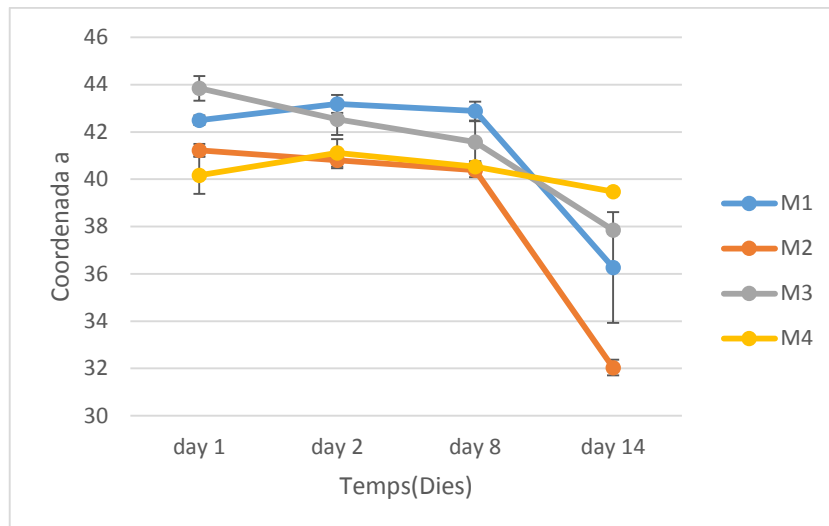
	a*	b*	L*
M1	42,49 $\pm$ 0,20	21,01 $\pm$ 0,04	45,87 $\pm$ 0,40
M2	41,21 $\pm$ 0,27	20,83 $\pm$ 0,21	47,56 $\pm$ 0,23
M3	43,84 $\pm$ 0,53	22,07 $\pm$ 0,27	43,45 $\pm$ 0,67
M4	40,17 $\pm$ 0,79	19,98 $\pm$ 0,45	45,94 $\pm$ 0,45
Mitjana global	41,93 $\pm$ 1,59	20,97 $\pm$ 0,86	45,71 $\pm$ 1,70

El color obtingut és molt bo, presenta un vermell intens, reflectit en l'alt valor de la coordenada a\*.

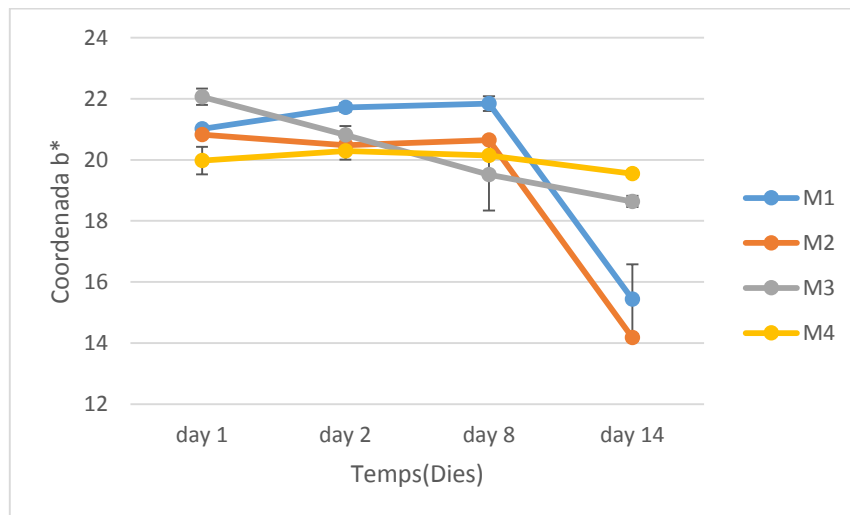
A partir de les mostres obtingudes, es va realitzar un seguiment durant 14 dies per a determinar l'estabilitat del colorant. En les *figures 5, 6 i 7* es pot observar la variació dels paràmetres L\*a\*b\* durant els dies 1, 2, 8 i 14.



**Figura 5.** Evolució de la coordenada L\* durant els 14 dies de seguiment per les diferents repeticions. Es mostren les mitjanes dels diferents anàlisis de color, així com la seva desviació estàndard ( $\pm$ ).



**Figura 6.** Evolució del paràmetre a\* durant els 14 dies de seguiment del colorant per les diferents repeticions. Es mostren les mitjanes dels diferents anàlisis de color, així com la seva desviació estàndard ( $\pm$ ).



**Figura 7.** Evolució de la coordenada b\* durant els 14 dies de seguiment del colorant per les diferents repeticions. Es mostren les mitjanes dels diferents anàlisis de color, així com la seva desviació estàndard ( $\pm$ ).

En les tres gràfiques es pot observar una estabilitat del color fins al dia 8, a partir d'aquest temps hi ha una davallada de la lluminositat ( $L^*$ ) i de la intensitat de vermell i groc ( $a^*$  i  $b^*$ ). Al gràfic 1 podem observar que les mostres M1 i M2 presenten al dia 14 un augment de la coordenada  $L^*$ , però això pot ser degut a la pèrdua global d'intensitat del color.

Els paràmetres d'importància en aquest producte però són la coordenada  $L^*$  i la coordenada  $a^*$ . Aquests ens indiquen que visualment el producte presenta una lluminositat elevada d'entre 43 i 47 punts en els dies 1 i 2 de la presa de mostres, sobre un màxim de 100 punts, i una intensitat de vermell d'entre 40 i 44 punts sobre un màxim de +60 punts.

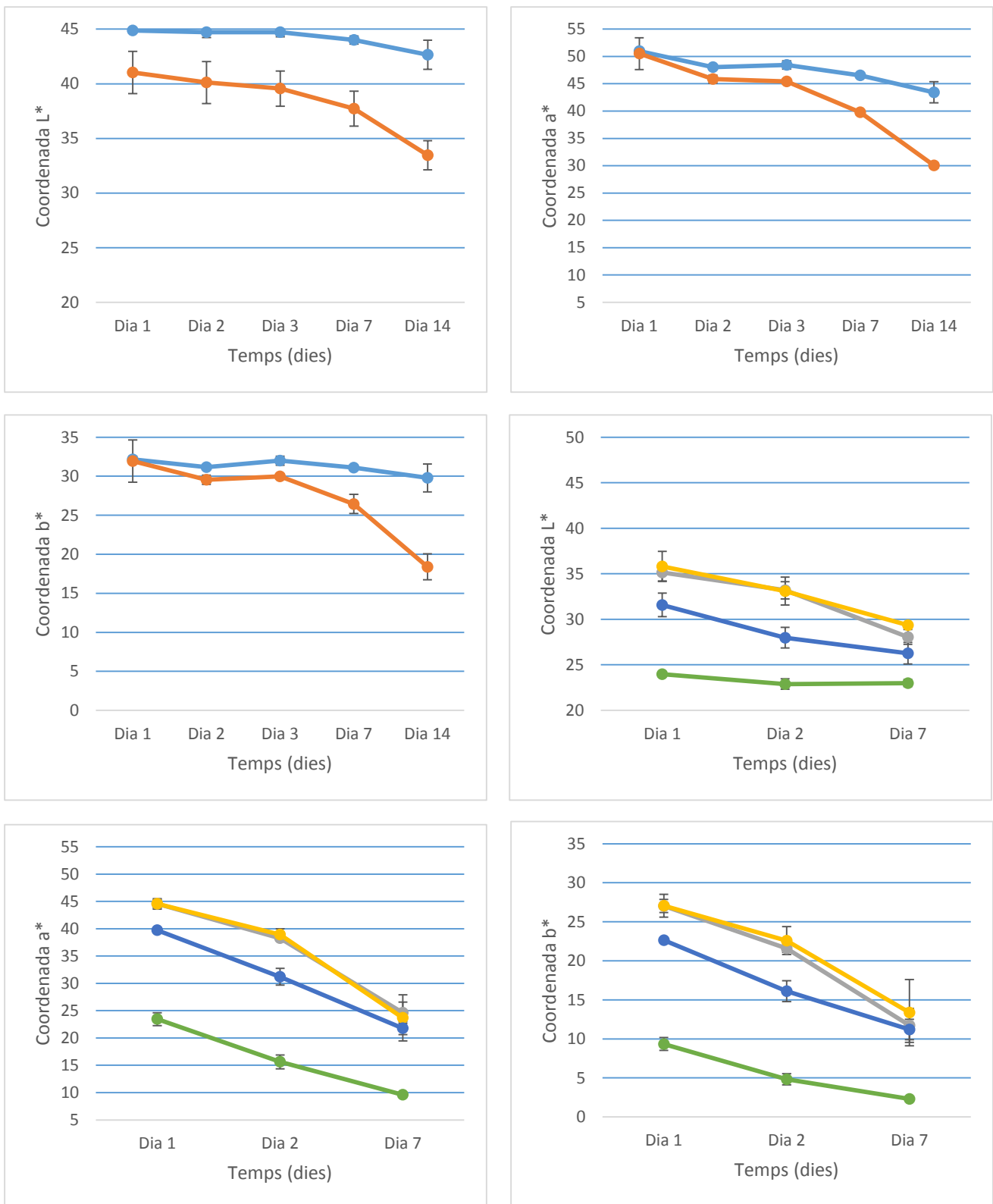
El conjunt d'aquests resultats permet confirmar que la utilització de sacarosa enlloc de glucosa durant la derivatització del producte millora l'aparença del colorant, tal i com s'havia trobat en el treball de Salvador, Toldrà, Parés, Carretero, & Saguer (2009). Tanmateix es pot concloure que l'encapsulat utilitzat per la producció del colorant (EX2) és millor a l'hora del manteniment i estabilitat del color en la pols, comparat amb els resultats anteriors.

Cal puntualitzar que durant les vacances de Nadal, temps durant el qual les mostres es trobaven emmagatzemades en fred, la nevera del laboratori on es van realitzar les proves es va espaiar i les mostres van romandre aproximadament una setmana a temperatura ambient, encara que posteriorment es va comprovar que les mostres en pols no havien perdut massa lluminositat ni color, en comparació amb les que havien estat tot el període en condicions de refrigeració.

#### 5.4. Proves d'aplicabilitat

Un cop es va obtenir el colorant i es va valorar la seva estabilitat es va optar per realitzar unes proves de concepte en gelatines. Aquestes ens van realitzar a diferents pH per a observar l'estabilitat del color en condicions de pH lleugerament i fortament àcid (pH 6, 5, 4.6, 4.5, 4.4 i 4.3).

En la *figura 8* es poden observar les gràfiques de les coordenades  $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$  per als diferents dies de mostreig. Les mostres de pH més àcid van analitzar-se només fins al dia 7 i no fins al 14 com les mostres de pH 6 i 5 perquè van aparèixer fongs a les plaques de petri que s'utilitzaven per mantenir la gelatina i la diferència entre la mostra del dia 7 i la del 14 en les de pH neutre semblava no variar en excés, així com ja es van obtenir resultats en la mostra del dia 7 que eren concloents.



—●— pH 6 —●— pH 5 —●— pH 4.6 —●— pH 4.5 —●— pH 4.4 —●— pH 4.3.

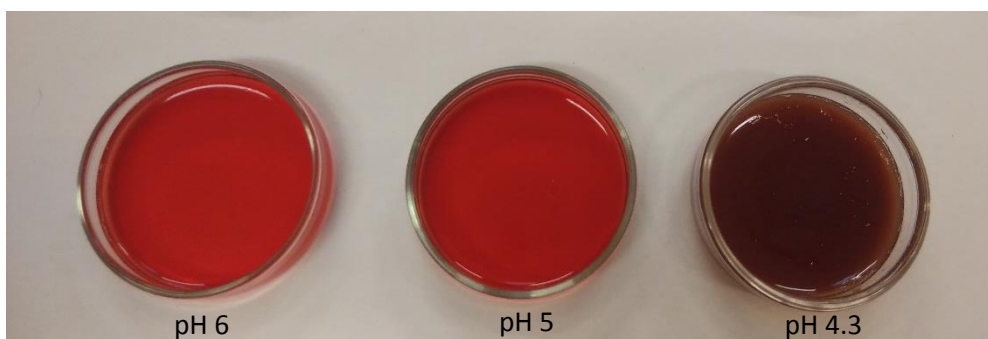
**Figura 8.** Evolució dels paràmetres L\*, a\* i b\* durant 14 dies per les mostres de pH 6 i 5 i durant 7 dies per les mostres a pH 4.6, 4.5, 4.4 i 4.3. Es mostren les mitjanes de cada mostra així com la seva desviació estàndard ( $\pm$ ).

En l'anàlisi de gelatines la importància també rau en els paràmetres  $L^*$  i  $a^*$  del mètode CIEL\*a\*b\*, encara que es van analitzar tots tres per separat.

La coordenada  $L^*$  que correspon a la lluminositat de la mostra és la coordenada que es manté més estable de totes les proves, amb una desviació estàndard baixa que indica que no apareixen diferències significatives entre les diferents rèpliques de cada prova de pH.

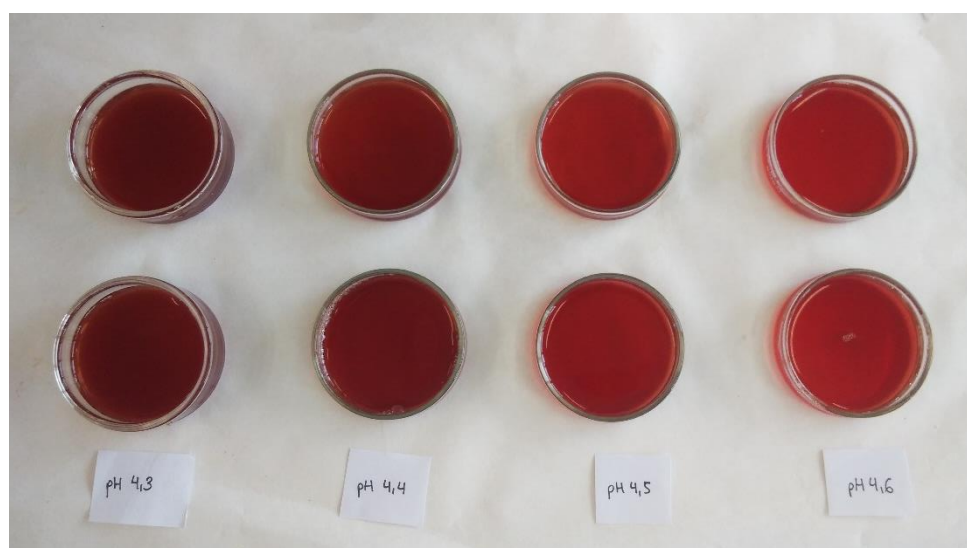
Els paràmetres  $a^*$  i  $b^*$  mantenen la mateixa tendència en tots els intervals de pH i les desviacions es mantenen baixes per a totes les mostres.

Es pot observar que les mostres d'interval de pH de 6 i 5 es mantenen a coordenades de  $L^*$  i  $a^*$  molt més estables que no les de l'interval de pH de 4.6 fins a 4.3; en la *figura 9* es pot observar que a pH inferior a 5 s'obté un color molt més marró que en els pH menys àcids, a causa de la desnaturalització de les proteïnes de la sang que es dona en aquests pH, que afavoreix l'oxidació del  $Fe^{2+}$ .



**Figura 9.** Proves d'aplicabilitat amb gelatines a pH 6, 5 i 4.3. La imatge mostra el color dels gels en el dia 1 del seguiment. Font: elaboració pròpia.

En les mostres de pH menys àcides (pH 6 fins a pH 4.5) el color inicial tendeix a ser molt més lluminós i intens en el vermell, contràriament amb el que trobem a pH més àcids (pH 4.4 i 4.3), que inicialment provenen de coordenades de CIEL\*a\*b\* més properes a zero (figura 10), i color evidentment marró.



**Figura 10.** Proves d'aplicabilitat amb gelatines a pH 4.6, 4.5, 4.4 i 4.3. La imatge mostra el color dels gels en el dia 1 del seguiment. Font: elaboració pròpia.



Inicialment es van realitzar els tampons per als pH més àcids amb tampó acètic-acetat, però va ser substituït en les mostres de pH 4.6-4.3 pel tampó citrat-fosfat ja que el citrat presenta una activitat segrestant del ferro de la sang que podria ser positiva per l'estabilitat de les mostres, aquest canvi va contribuir a millorar el color a fins a pH 4.5.

## 6. CONCLUSIONS

1. The use of sucrose, nicotinamide and the encapsulation component EX2 improved the final colour of the dye powder and its stability over time.
2. The spray-drying process promoted the stability of the powder in terms of remaining water (final moisture content) and water activity ( $a_w$ ), which decreased until values that can inhibit the microbial activity.
3. The evolution of the colour parameters in the dried product indicates that food colouring had a good stability during 8-days refrigerated storage.
4. The concept tests showed that the colour was stable at slightly acidic pH ranges, and maintained appropriate and homogeneous hue and redness. At pH below 4.5, the colour became brown, due to the protein denaturation and iron oxidation, thus this product would not be adequate for acidic foods.

## 7. BIBLIOGRAFIA

Bah, C., Bekhit, A., Carne, A., & McConnell, M. (2013). Slaughterhouse Blood: An Emerging Source of Bioactive Compounds. *Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety*, 12(3), 314-331. <http://dx.doi.org/10.1111/1541-4337.12013>

Brückner, J. (1991). H. W. Ockerman und C. L. Hansen: *Animal By-Product Processing*. 366 Seiten, zahlr. Abb. und Tab. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, und Ellis Horwood, Chichester 1988. Preis: 250,- DM; 88,- £. *Food / Nahrung*, 35(1), 113-113. <http://dx.doi.org/10.1002/food.19910350138>

By-products - European Commission. (2016). [Ec.europa.eu](http://ec.europa.eu). Retrieved 12 May 2016, from [http://ec.europa.eu/environment/waste/framework/by\\_products.htm](http://ec.europa.eu/environment/waste/framework/by_products.htm)

Fontes, P., Gomide, L., Fontes, E., Ramos, E., & Ramos, A. (2010). Composition and color stability of carbon monoxide treated dried porcine blood. *Meat Science*, 85(3), 472-480. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.02.018>

Hui, Y. (2006). *Handbook of food science, technology, and engineering*. Boca Raton: Taylor & Francis.

Jayathilakan, K., Sultana, K., Radhakrishna, K., & Bawa, A. (2011). Utilization of byproducts and waste materials from meat, poultry and fish processing industries: a review. *J Food Sci Technol*, 49(3), 278-293. <http://dx.doi.org/10.1007/s13197-011-0290-7>

Leoci, R. (2014). *Animal by-Products (ABP): origins, uses, and European regulations*. Universitas Studiorum.

Madrid Vicente, A. (1999). *Aprovechamiento de los subproductos cárnicos*. Madrid, España: Editorial Mundi-Prensa.

Meeker, D. & Hamilton, C. (2006). An overview of the rendering industry. In: *Essential rendering*. National Renderers Association.

Mini Secador por aspersión B-290 | buchi.com. (2016). [Buchi.com](http://www.buchi.com). Retrieved 12 May 2016, from <http://www.buchi.com/es-es/products/spray-drying-and-encapsulation/mini-secador-por-aspersi%C3%B3n-b-290>

Nitrogen conversion factor. (2016). [Encyclopedia.com](http://www.encyclopedia.com). Retrieved 12 May 2016, from <http://www.encyclopedia.com/doc/1039-nitrogenconversionfactor.html>

Lennon, A., McDonald, K., Moon, S., Ward, P., & Kenny, T. (2010). Performance of cold-set binding agents in re-formed beef steaks. *Meat Science*, 85(4), 620-624. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.03.014>

Oshodi, A., Beames, R., & Nakai, S. (1997). In vitro protein digestibility, amino acid profile and available iron of infant-weaning food prepared from maize flour and bovine blood. *Food Research International*, 30(3-4), 193-197. [http://dx.doi.org/10.1016/s0963-9969\(97\)00033-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0963-9969(97)00033-1)

Patent information services from the U.K. patent office. (1994). *World Patent Information*, 16(2), 125. [http://dx.doi.org/10.1016/0172-2190\(94\)90028-0](http://dx.doi.org/10.1016/0172-2190(94)90028-0)

SD-Kjeldahl Method. (2016). Brooklyn.cuny.edu. Retrieved 12 May 2016, from [http://www.brooklyn.cuny.edu/bc/ahp/SDKC/Chem/SD\\_KjeldahlMethod.html](http://www.brooklyn.cuny.edu/bc/ahp/SDKC/Chem/SD_KjeldahlMethod.html)

Saguer, E., Altarriba, S., Lorca, C., Parés, D., Toldrà, M., & Carretero, C. (2003). Colour Stabilization of Spray-Dried Porcine Red Blood Cells Using Nicotinic Acid and Nicotinamide. *Food Science And Technology International*, 9(4), 301-307. <http://dx.doi.org/10.1177/108201303036092>

Salvador, P., Toldrà, M., Parés, D., Carretero, C., & Saguer, E. (2009). Color stabilization of porcine hemoglobin during spray-drying and powder storage by combining chelating and reducing agents. *Meat Science*, 83(2), 328-333. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.06.001>

Samuel Peroy, R. (1872). Improvement in drying and concentrating liquid substances by atomizing. *Estats Units*. <http://www.google.com/patents/US125406>

Toldrà, M. (2002). Revaloració de la fracció cel·lular de la sang de porc procedent d'escorxadors industrials. (Doctorat). Institut de Tecnologia Agroalimentària (INTEA), Universitat de Girona.

The Spray Drying Process. (2016). Eurotherm by Schneider Electric | Temperature Control, Process Control, Measurement and Data Recording Solutions. Retrieved 12 May 2016, from <http://www.eurotherm.com/spray-drying>

Wismer-Pedersen, J. (1988). Use of haemoglobin in foods—A review. *Meat Science*, 24(1), 31-45. [http://dx.doi.org/10.1016/0309-1740\(89\)90005-3](http://dx.doi.org/10.1016/0309-1740(89)90005-3)